

# 化学品毒性鉴定技术规范

2005年6月

# 目 录

一、总则	3
二、试验方法	
(一) 第一阶段试验	15
1、急性吸入毒性试验	16
2、急性经皮毒性试验	20
3、急性经口毒性试验	23
4、急性眼刺激性/腐蚀性试验	26
5、皮肤刺激性/腐蚀性试验	32
6、皮肤变态反应试验（皮肤致敏试验）	36
(二) 第二阶段试验	54
1、鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验（Ames 试验）	55
2、体外哺乳动物细胞染色体畸变试验	62
3、体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验	68
4、体内哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验	75
5、哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验，或 精子畸形试验	79 87
6、啮齿类动物显性致死试验	90
7、免疫毒性评价试验方法	95
8、亚急性吸入（14/28 天）毒性试验	104
9、亚急性经皮（21/28 天）毒性试验	110
10、亚急性经口（28 天）毒性试验	115
(三) 第三阶段试验	121
1、亚慢性吸入毒性试验	122
2、亚慢性经皮毒性试验	126
3、亚慢性经口毒性试验	130

4、致畸试验·····	136
5、两代繁殖毒性试验·····	142
6、迟发性神经毒性试验·····	147
<b>(四) 第四阶段试验·····</b>	<b>153</b>
1、慢性吸入毒性试验·····	154
2、慢性经皮毒性试验·····	160
3、慢性经口毒性试验·····	166
4、致癌试验, 或·····	172
慢性毒性/致癌性合并试验 ·····	180
5、毒物代谢动力学试验 ·····	189
6、接触人群调查与观察 (参考国内外有关专著或教科书)	
<b>(五) 参考试验·····</b>	<b>196</b>
1、皮肤变态反应试验-局部淋巴结法·····	197
2、大肠杆菌回复突变试验·····	202
3、酵母菌基因突变试验·····	210
4、体外哺乳动物细胞正向基因突变试验·····	214
5、果蝇伴性隐性致死试验·····	220
6、枯草杆菌基因重组试验·····	224
7、体外哺乳动物细胞程序外 DNA 合成 (UDS) 试验·····	232
8、体内哺乳动物外周血细胞微核试验·····	238
9、体外哺乳动物姊妹染色单体交换 (SCE) 试验·····	244
10、体内哺乳动物骨髓细胞姊妹染色体交换 (SCE) 试验·····	250
11、繁殖/生长发育毒性筛选试验·····	256
12、亚急性毒性合并繁殖/发育毒性筛选试验·····	262
13、一代繁殖试验·····	269
14、神经毒性筛选组合试验·····	274

# 总则

## General Principles

## 1 依据

根据《中华人民共和国职业病防治法》、《作业场所使用有毒物品劳动保护条例》、《危险化学品安全管理条例》、《职业卫生技术服务机构管理办法》、《化学品毒性鉴定管理规范》制定本规范。

## 2 范围

本规范规定了化学品毒性鉴定的毒理学检测程序、项目和方法，适用于化学品毒性鉴定和评价。

## 3 规范性引用文件

GB 14924-2001 实验动物与饲料标准

GB 14925-2001 实验动物 环境及设施

OECD Guideline for Testing of Chemicals (1981 ~ 2002)

USA Code of Federal Regulations, Title 40, Volume 28

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (1996 ~ 2000)

## 4 术语解释

**化学品 (Chemicals):** 本规范所称化学品，系指工业用和民用的化学原料、中间体、产品等单分子化合物、聚合物以及不同化学物组成的混合剂与产品。不包括法律、法规已有规定的食品、食品添加剂、化妆品、药品等。

**急性吸入毒性 (Acute Inhalation Toxicity):** 实验动物短时间 (24h内) 持续吸入一种可吸入性受试样品后，在短期内出现的健康损害效应。

**半数致死浓度 (Median Lethal Concentration, LC<sub>50</sub>):** 指在一定时间内经呼吸道吸入受试样品后引起受试动物发生死亡概率为50%的浓度。以单位体积空气中受试样品的质量(mg/m<sup>3</sup>)来表示。

**急性经皮毒性 (Acute Dermal Toxicity):** 实验动物短时间 (24h内) 经皮肤接触受试样品后，在短期内出现的健康损害效应。

**急性经口毒性 (Acute Oral Toxicity):** 一次或在24h内多次经口给予实验动物受试样品后，动物在短期内出现的健康损害效应。

**半数致死剂量 (Median Lethal Dose, LD<sub>50</sub>):** 在一定时间内经口或经皮给予受试样品后，使受试动物发生死亡概率为50%的剂量。以单位体重接受受试样

品的质量(mg/kg bw或g/kg bw)来表示。

**皮肤刺激性 (Dermal Irritation):** 皮肤涂敷受试样品后局部产生的可逆性炎性变化。

**皮肤腐蚀性 (Dermal Corrosion):** 皮肤涂敷受试样品后局部引起的不可逆组织损伤。

**眼刺激性 (Eye Irritation):** 眼球表面接触受试样品后产生的可逆性炎性变化。

**眼腐蚀性 (Eye Corrosion):** 眼球表面接触受试样品后引起的不可逆性组织损伤。

**皮肤致敏 (过敏性接触性皮炎) (Skin Sensitization, Allergic Contact Dermatitis):** 皮肤对一种物质产生的免疫源性皮肤反应。对于人类这种反应可能以瘙痒、红斑、丘疹、水疱、融合水疱为特征。动物的反应不同,可能只见到皮肤红斑和水肿。

**亚急性经口毒性 (Subacute Oral Toxicity):** 实验动物在 14~28 天内,每日经口接触受试样品后所引起的健康损害效应。

**亚急性经皮毒性 (Subacute Dermal Toxicity):** 实验动物在 14~28 天内,每日经皮接触受试样品后所引起的健康损害效应。

**亚急性吸入毒性 (Subacute Inhalation Toxicity):** 实验动物在 14~28 天内,每日经呼吸道接触受试样品后所引起的健康损害效应。

**致突变性 (Mutagenicity):** 受试样品引起原核或真核细胞、或实验动物遗传物质发生结构和/或数量改变的效应。

**免疫毒性 (Immunotoxicity):** 受试样品引起机体免疫功能抑制或异常增强的效应。

**神经毒性 (Neurotoxicity):** 受试样品对神经系统功能或结构的损害效应。

**亚慢性经口毒性 (Subchronic Oral Toxicity):** 实验动物在其部分生存期(不超过 10%寿命期)内,每日经口接触受试样品后所引起的健康损害效应。

**亚慢性经皮毒性 (Subchronic Dermal Toxicity):** 实验动物在其部分生存期(不超过 10%寿命期)内,每日经皮接触受试样品后所引起的健康损害效应。

**亚慢性吸入毒性 (Subchronic Inhalation Toxicity):** 实验动物在其部分生存期(不超过 10%寿命期)内,每日经呼吸道接触受试样品后所引起的健康损害效应。

**蓄积毒性 (Cumulative Toxicity):** 受试样品在体内蓄积引起的有害效应, 蓄积有两种形式: (1) 物质蓄积, 即长期反复接触受试样品时, 由于吸收速度超过消除速度导致的该物质在体内逐渐增多; (2) 功能蓄积, 即受试样品虽然在体内的代谢和排出速度较快, 但其造成的损伤恢复慢, 在前一次的损伤未恢复前又发生新的损伤, 如此残留损伤的累积称为功能蓄积。

**致畸性 (Teratogenicity):** 受试样品在胚胎发育期引起胎仔永久性结构和功能异常的效应。

**生殖毒性 (Reproduction Toxicity):** 受试样品对亲代繁殖功能或能力的影响和/或对子代生长发育的损害效应。

**生长发育毒性 (Developmental Toxicity):** 妊娠动物接触受试样品而引起的子代在出生以前、围产期和出生以后所显现出的机体缺陷或功能障碍。

**无可见有害作用水平 (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL):** 在规定的试验条件下, 用现有的技术手段或检测指标未观察到任何与受试样品有关的毒性作用的最大染毒剂量或浓度。

**最低可见有害作用水平 (Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL):** 在规定的试验条件下, 受试样品引起实验动物形态、功能、生长发育等发生有害改变的最低染毒剂量或浓度。

**慢性毒性 (Chronic Toxicity):** 实验动物在其正常生命期的大部分时间内接触受试样品所引起的健康损害效应。

**致癌作用 (Carcinogenesis):** 受试样品引起肿瘤发生率和/或类型增加、潜伏期缩短的效应。

**基线剂量 (Benchmark Dose, BMD):** 由于 NOAEL 和 LOAEL 都是实验中的具体剂量值, 易受每组样本含量大小和组间距宽窄等因素影响, 故设定基线剂量, 可选择 ED<sub>1</sub> (概率为 1% 的受试个体出现效应的剂量), 或选择 ED<sub>5</sub> (概率为 5% 的受试个体出现效应的剂量) 或 ED<sub>10</sub> (概率为 10% 的受试个体出现效应的剂量) 的 95% 可信限下限。

**毒物代谢动力学 (Toxicokinetics):** 定量研究毒物在体内吸收、分布、生物转化、排泄等过程随时间变化的动态规律的学科。

**安全系数 (Safety Factor, SF):** 在以动物试验数据外推到人, 或以小范围人群调查结果判断所评价的化学品对大范围人群的有害作用时, 为排除所涉及的不确定因素而设定的系数, 用于制定化学品控制标准, 以保证接触人群的安全。

**危险性参考剂量 (Risk Reference Dose, RfD):** 危险度达到可接受程度的剂量。

**危险性参考浓度 (Risk Reference Concentration, RfC):** 危险度达到可接受程度的浓度。

**日允许摄入量 (Acceptable Daily Intake, ADI):** 终身每日摄入化学物而不引起可检出的健康损害效应的剂量, 一般以 mg/kg bw·d 表示。

**(致癌物的) 实际安全剂量 (Visual Safe Dose, VSD):** 化学品引起致癌率有 99% 的把握低于  $10^{-6}$  的剂量水平。

**职业接触限值 (Occupational Exposure Limit, OEL):** 是职业性有害因素的接触限制量值, 指劳动者在职业活动过程中长期反复接触对机体不引起急性或慢性有害健康影响的容许接触水平。

**最高容许浓度 (Maximal Allowable Concentration, MAC):** 指工作地点、在一个工作日内、任何时间均不应超过的有毒化学物的浓度。

## 5 化学品毒性鉴定程序和方法

化学品毒性鉴定分为 4 个阶段

### (1) 第一阶段 (急性毒性试验、眼刺激试验和皮肤刺激试验)

主要是急性毒性参数的测定和了解受试样品对皮肤、粘膜的刺激性以及致敏性, 为毒性分级和标签管理提供依据。同时, 可了解受试样品对机体造成急性损害的可能性和严重程度, 并为第二阶段各项试验的剂量设计提供依据。在测定  $LD_{50}$  时, 一般要求用两种动物, 染毒途径应包括所有人体可能的接触途径。

- 急性吸入毒性试验
- 急性经皮毒性试验
- 急性经口毒性试验
- 急性眼刺激性/腐蚀性试验
- 皮肤刺激性/腐蚀性试验
- 皮肤变态反应试验 (皮肤致敏试验)

### (2) 第二阶段 (亚急性毒性试验和致突变试验)

主要是了解受试样品的亚急性毒性和遗传毒性, 为第三阶段各项试验剂量设计和观察指标的选择提供依据, 并对受试样品的致癌性进行预测。

- 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 (Ames 试验)
- 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

- 体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验
- 体内哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验
- 哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验，或
- 精子畸形试验
- 啮齿类动物显性致死试验
- 免疫毒性评价试验方法
- 亚急性吸入（14/28天）毒性试验
- 亚急性经皮（21/28天）毒性试验
- 亚急性经口（28天）毒性试验

### （3）第三阶段（亚慢性毒性试验、致畸试验、繁殖试验）

通过亚慢性试验进一步确定多次重复染毒的毒作用性质和靶器官，初步确定 NOAEL 或 LOAEL，为第四阶段各项试验的剂量设计和观察指标的选择提供依据；通过致畸试验判断受试样品的胚胎毒性及其是否有致畸性。通过繁殖试验，可判断受试样品对生殖过程的损害作用。通过迟发性神经毒性试验，可判断受试样品是否具有迟发性神经毒作用。

- 亚慢性吸入毒性试验
- 亚慢性经皮毒性试验
- 亚慢性经口毒性试验
- 致畸试验
- 两代繁殖毒性试验
- 迟发性神经毒性试验

### （4）第四阶段（慢性毒性试验和致癌试验）

通过慢性毒性试验可确定受试样品的 NOAEL 和 LOAEL，为推算受试样品的安全接触限值提供依据。通过致癌试验可以确定受试样品对受试实验动物的致癌性。通过代谢动力学试验可以了解受试样品的吸收、分布、代谢和排泄特点，了解蓄积毒性作用及其可能的靶器官和毒作用机理。

- 慢性吸入毒性试验
- 慢性经皮毒性试验
- 慢性经口毒性试验
- 致癌试验或慢性毒性试验合并致癌试验
- 毒物代谢动力学试验

### 参考方法

- 皮肤变态反应试验-局部淋巴结法

- 大肠杆菌回复突变试验
- 酵母菌基因突变试验
- 体外哺乳动物细胞正向基因突变试验
- 果蝇伴性隐性致死试验
- 枯草杆菌基因重组试验
- 体外哺乳动物细胞程序外 DNA 合成 (UDS) 试验
- 体内哺乳动物外周血细胞微核试验
- 体外哺乳动物姊妹染色单体交换 (SCE) 试验
- 体内哺乳动物骨髓细胞姊妹染色体交换 (SCE) 试验
- 繁殖/生长发育毒性筛选试验
- 亚急性毒性合并繁殖/发育毒性筛选试验
- 一代繁殖试验
- 神经毒性筛选组合试验

## 6 化学品毒性鉴定项目的选择原则

6.1 试验项目的选择应当根据化学品的理化特性，特别是通过对其化学结构与活性关系进行初步分析，并尽量了解其使用范围、生产或使用过程、人体接触情况和现有文献资料，根据具体情况选择系统的或补充的毒性试验。在化学品毒性鉴定过程中，根据各阶段的试验结果，有针对性地取舍进一步试验的项目和观察指标，以完善对该化学品所做出的毒性鉴定资料的科学性和可靠性。

6.2 受试样品的染毒途径应与人体可能接触的途径一致，对人体有可能通过呼吸道、皮肤和消化道三种途径接触的化学品，应进行吸入、经皮和经口三种染毒途径的各项试验；常温下呈气态的化学品一般不进行经口染毒途径的各项试验； $20^{\circ}\text{C}$  蒸气压  $\leq 1 \times 10^{-2}$  Pa 的非粉末状化学品一般不需进行吸入染毒途径的各项试验。

6.3 对有可能与皮肤或眼睛接触的化学品，应进行皮肤或眼刺激性试验；如化学品的  $\text{pH} \leq 2$  或  $\geq 11$ ，则不必进行皮肤和粘膜的刺激试验，并认为其对皮肤和眼有腐蚀作用。

6.4 对有可能与皮肤反复接触的化学品，应进行皮肤致敏试验；经皮毒性属高毒以及对皮肤有腐蚀作用的化学品则不进行皮肤致敏试验。

6.5 我国首创或根据国内外文献报道首次生产的化学品，原则上需进行 4 个阶段的毒理学试验。首先必须做急性毒性试验、亚急性毒性试验、亚慢性毒性试验、

三项致突变试验（包括基因水平和染色体水平的体外、体内试验）、致畸试验和繁殖试验。根据试验结果，判断是否需继续做其它试验项目。

6.6 引进国外的生产技术，生产国外已登记生产和批准应用的化学品，如国内的生产单位能证明所生产化学品的理化性质、纯度、主要杂质成分及含量均与国外同类化学品一致时，可先进行第一阶段和两项致突变试验（包括基因水平和染色体水平两种类型的试验）。如试验结果与国外同类化学品一致，可不继续进行第三阶段和第四阶段试验。

6.7 与国内已获批准生产的化学品属同类化学品的，如国内的生产单位能证明所生产化学品的理化性质、纯度、主要杂质成分及含量均与国内同类化学品一致时，可先进行急性毒性试验和一项致突变试验。如试验结果与国内同类化学品一致，可不继续进行试验。

6.8 凡将两种以上的化学品混配成新的制剂时，除必须按相应要求对其成分分别进行试验外，还应进行急性联合毒性试验，如有明显的协同作用，则根据具体情况对该制剂进行必要的其它毒性试验。

#### 6.9 致突变试验的选择原则

6.9.1 进行 3 项致突变试验的化学品，如 2 项或 3 项试验结果为阳性，应进行致癌试验。如仅 1 项试验结果为阳性，应增做另一项同类型的致突变试验，如结果仍为阳性，应进行致癌试验；如结果为阴性，可不继续进行试验。如 3 项结果均为阴性，可不继续进行试验。

6.9.2 进行 2 项致突变试验的化学品，如 2 项试验结果为阳性，应进行第三阶段和第四阶段的相应试验。如仅 1 项试验结果为阳性，应增做另一项同类型的致突变试验。如结果仍为阳性，应进行第三阶段和第四阶段的相应试验；如结果为阴性，可不继续进行试验。如 2 项结果均为阴性，可不继续进行试验。

6.9.3 进行 1 项致突变试验的化学品，如试验结果为阳性，应增做另一项同类型的致突变试验。如结果仍为阳性，应进行第三阶段和第四阶段的相应试验。如结果为阴性，可不继续进行试验。

## 7 受试样品的规定

7.1 受试样品必须是按照既定的生产工艺和配方进行规范化生产的产品，其成分和浓度与实际生产、经营和使用的产品相同。

7.2 提供与受试样品毒性有关的物理、化学性质资料

7.2.1 化学名称、CAS 编号、结构式

7.2.2 测定方法、纯度、所含主要杂质、光谱图

7.2.3 性状、气味、稳定性（热、空气、光）

7.2.4 密度、熔点(°C)、沸点(°C)、闪点、蒸气压(Pa °C)、表面张力(N/M °C)、水中溶解度 (mg/L °C)、脂溶性 (mg/100g °C, 说明溶剂种类)、脂水分配系数 (说明溶剂种类)、膨胀系数、爆炸极限、pH 值、一定 pH 值下的水解情况

7.3 提供原料来源、生产工艺、人的可能摄入量、使用说明书等有关资料

7.4 对受试样品的处理

7.4.1 受试样品应新鲜配制。除非有资料表明以溶液（或乳浊液、悬浊液等）保存具有稳定性。固体受试样品应溶于或悬于适当的赋形剂（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（水溶性和/或脂溶性）确定受试样品所用的赋形剂。所用赋形剂在使用剂量水平对实验动物、菌株或细胞应不产生毒作用，且不与受试样品发生任何化学反应，并能保持受试样品的稳定性。通常用蒸馏水、等渗盐水、植物油、食用淀粉、羧甲基纤维素等。如不是常用赋形剂，应有参考资料说明其成份。

7.4.2 对膨胀系数较高的化学品应考虑膨胀系数对试验结果的影响，急性经口毒性试验中的最高剂量应为实验动物能够耐受的最大染毒剂量，并根据试验结果确定其它试验的剂量设计，如最大染毒剂量未观察到明显毒性效应，则体内致突变试验、亚急性毒性试验、亚慢性毒性试验的最高剂量均应达到实验动物能够耐受的最大染毒剂量。

7.4.3 如果将受试样品掺入饲料或溶于饮水中进行染毒，受试样品在饲料或饮水中的含量应恒定并进行稳定性监测。受试样品的添加量不能破坏饲料中的营养平衡。实验动物应单笼饲养，必须用减重法称量每周的食物摄入量（如果受试样品是加入饮水中染毒的，也应测量水的摄入量），并通过食物或饮水的消耗情况计算动物对受试样品的摄入量。

**8 应客观评价动物试验的结果，将其外推到人的意义是有限的。尽可能结合人群观察资料，作出科学的综合性评价。**

8.1 在使用 NOAEL 或 LOAEL 等对化学品的安全性进行评价时，可根据情况调整安全系数（例如对于在试验或流行病学调查中发现有致癌或致畸作用的化学品，安全系数可增大至 100~1000。在制定工作场所空气中化学品职业接触限值

(OEL) 时, 应更注重流行病学调查资料, 参考动物试验数据, 一般以动物试验的 NOAEL 或 LOAEL 为基准, 安全系数可以小于 20。

可按下列公式计算得出各种卫生限值。

$$RfD = \frac{LOAEL \text{ 或 } NOAEL}{SF_1 \times SF_2 \times SF_3 \cdots \times SF_n}$$

式中  $SF_1 \times SF_2 \times SF_3 \cdots \times SF_n$  代表从各个角度考虑的安全系数, 在计算 ADI 时一般以 100 作为安全系数 (SF=10(种属差异)×10(个体差异))。

8.2 在应用致突变试验结果筛选致癌物时, 应用下列计算式计算致突变阳性结果预期致癌性的概率:

$$\text{式1: } P(C^+ / M^+) = \frac{P(C^+) \times P(M^+ / C^+)}{P(C^+) \times P(M^+ / C^+) + P(C^-) \times P(M^- / C^-)}$$

式 1 适用于对同一种致突变试验结果的推算, 式中  $M^+$  和  $M^-$  为致突变试验结果的阳性数和阴性数;  $C^+$  和  $C^-$  为致癌性的有和无。

式2:

$$P(C^+ / M^+) = \frac{P(C^+) \times P_K(M^+ / C^+) \times P_N(M^- / C^-)}{P(C^+) \times P_K(M^+ / C^+) \times P_N(M^- / C^-) + P(C^-) \times P_K(M^+ / C^-) \times P_N(M^- / C^-)}$$

式 2 适用于对多种致突变试验结果的推算, 要求各致突变试验是互相独立的, 一般认为反映不同遗传学终点的试验基本相互独立, 如多个试验的检测终点为同一遗传学终点, 只能将其中一个试验的结果纳入推算, 如检测终点相同的试验方法的结果既有阳性又有阴性, 则将呈阳性的试验方法的结果纳入推算。设阳性结果有 K 个, 相应的灵敏度为  $a_1^+, a_2^+ \dots a_K^+$  ( $a^+ = 1 - P(M^+ / C^+)$ ), 相应的特异度为  $a_1^-, a_2^- \dots a_K^-$  ( $a^- = 1 - P(M^- / C^-)$ ), 同时设阴性结果有 N 个, 相应的灵敏度为  $d_1^+, d_2^+ \dots d_K^+$  ( $d^+ = 1 - P(M^+ / C^+)$ ), 相应的特异度为  $d_1^-, d_2^- \dots d_K^-$  ( $d^- = 1 - P(M^- / C^-)$ )

式中  $P_K(M^+ / C^+) = a_1^+ \times a_2^+ \dots \times a_K^+$

$$P_K(M^+ / C^-) = (1 - a_1^-) \times (1 - a_2^-) \dots \times (1 - a_K^-)$$

$$P_N(M^- / C^-) = d_1^+ \times d_2^+ \dots \times d_K^+$$

$$P_N(M^- / C^+) = (1 - d_1^-) \times (1 - d_2^-) \dots \times (1 - d_K^-)$$

当估算结果  $P(C^+ / M^+) \geq 0.5$  时应考虑进行动物致癌试验, 概率越高, 进行动物致

癌试验的必要性越大。当  $P(C^+/M^+) \leq 0.03$  时，如没有理由认为该化学品属于非遗传致癌物，可暂不考虑进行动物致癌试验。

8.3 在对化学品的致畸性进行评价时，我国常用致畸指数（雌鼠  $LD_{50}$ /最小致畸剂量）和致畸危害指数（最大不致畸剂量/最大可能摄入量），并按照计算结果进行分级，但由于不同化学品的急性致死剂量-反应关系曲线的情况不一，所以，可换用  $LD_1$ 、 $LD_5$  或以雌鼠体重降低（与对照组相比降低一定的百分比）的剂量，目前推荐以 BMD 和安全系数对化学品的致畸性进行评价。

8.4 由于诱癌作用无阈值，因此，在对化学品的致癌危险度进行评定时采用实际安全剂量，即化学品引起致癌率有 99% 的把握低于  $10^{-6}$  的剂量水平。

## 9 对化学品毒性鉴定机构的要求

从事化学品毒性鉴定的机构应符合《化学品毒性鉴定管理规范》中“化学品毒性鉴定实验室条件及工作准则（GLP）”的各项要求，并根据获得资质的等级从事相应项目的化学品毒性鉴定工作。

## 10 对实验动物及动物实验室的要求

### 10.1 对实验动物的要求

#### 10.1.1 实验动物的基本选择原则

10.1.1.1 必须使用具有合格证的实验动物（尚未实行等级管理的动物种属除外）。

10.1.1.2 应尽量选用各项试验的首选动物，如选择其他种属应说明原因并确定该种属对所检测的毒性作用敏感。

10.1.2 动物试验的一般要求（某些试验对实验动物有特殊要求，则以试验方法中所列的要求为准）：

10.1.2.1 用于同一项试验的同性别动物，在进行试验前个体之间的体重相差最多不超过 20%。

10.1.2.2 雌性动物一般应为未交配过的。

10.1.2.3 实验动物在实验环境中需适应至少 3~5 天后才能开始染毒。

10.1.2.4 在同一次试验中需多次进行经口染毒时，至少每周对受试动物进行称重并根据体重调整每只动物的染毒体积。

#### 10.1.3 动物福利要求

应尽量减少实验动物的使用量，同时为实验动物提供足够的空间，以供动物采取正常的适应姿势，并且能够有适当的移动自由；应提供足够的合格饲料和饮水；在试验过程中应尽量减轻动物的痛苦，不得虐待动物。

10.2 进行各项动物试验的动物实验室应符合国家法律法规的有关规定并获得主管部门颁发的合格证。

10.3 用于动物试验的饲料、饮水、垫料、笼具等应符合国家法律法规的有关规定（饲料应具有主管部门颁发的合格证）。

10.4 实验动物管理及从事动物试验的人员，必须经培训、考核，持证上岗。

## 11 鉴定报告内容

11.1 受试样品名称、理化性状、配制方法、所用浓度、经口染毒需注明染毒体积。

11.2 体内试验需注明：实验动物的种属、品系和来源（注明合格证号和动物级别）、性别、体重范围（周龄）、单笼喂养还是群饲；实验动物饲养环境，包括饲料来源（如非标准饲料，应注明饲料的配方）、室温、相对湿度，动物实验室和饲料的合格证号；剂量设计和动物分组方法，每组所用动物性别、数量及初始体重范围。

11.3 体外试验需注明：使用的菌株或细胞种类、使用的培养基、培养浓度、培养温度、培养时间、代谢活化系统；剂量水平、对照组设置、阳性物种类和剂量。

11.4 主要操作步骤（如为吸入染毒应注明染毒设备中的气流速度等参数）。

11.5 各项检测指标的测定方法及主要检测仪器的名称和型号。

11.6 检测结果数据统计学处理方法以及各项参数的计算方法。

11.7 体内试验需描述染毒后动物中毒表现及出现时间和恢复情况、死亡时间、大体解剖和尸检所见，进行病理组织学检查的需描述观察结果。

11.8 列表报告各项指标测定结果（一般以 $\bar{X} \pm SD$ 的形式表达），并列出生理计算所得的毒理学参数。

11.9 结论。

# 第一阶段试验

# 急性吸入毒性试验

## Acute Inhalation Toxicity Test

### 1 范围

本方法规定了动物急性吸入毒性试验的基本原则、技术和要求。

本方法适用于评价气体、挥发性物质或气溶胶/颗粒物等化学品的急性吸入毒性作用。

### 2 规范性引用文件

OECD Guideline for Testing of Chemicals ( No.403. Feb. 1981)

OECD Guideline for Testing of Chemicals ( No.433. Feb. 2002)

### 3 试验目的

- 3.1 检测化学品对实验动物的急性吸入毒性作用和强度。
- 3.2 为亚急(慢)性等吸入毒性试验提供剂量选择的依据。

### 4 定义

4.1 急性吸入毒性(Acute Inhalation Toxicity): 实验动物短时间(24h内)持续吸入一种可吸入性受试样品后,在短期内出现的健康损害效应。

4.2 半数致死浓度(Median Lethal Concentration,  $LC_{50}$ ): 指在一定时间内经呼吸道吸入受试样品后引起受试动物发生死亡的概率为50%的浓度。以单位体积空气中受试样品的质量( $mg/m^3$ )来表示。

4.3 剂量-反应关系(Dose-response Relationship): 表示化学毒物的剂量与某一群体中质效应的发生率之间的关系。

### 5 试验基本原则

各试验组动物在一定时间内吸入不同浓度的受试样品,染毒浓度的选择可通过预试验确定。染毒后观察动物的毒性反应和死亡情况。试验期间死亡的动物要进行尸检,试验结束时仍存活的动物要处死并进行大体解剖。

### 6 试验方法

#### 6.1 实验动物

首选健康成年小鼠(18g~22g)和大鼠(180g~220g)，也可选用其它敏感动物。同性别各剂量组个体间体重相差不得超过平均体重的20%。试验前动物要在试验环境中至少适应 3~5d时间。

## 6.2 剂量设计

根据所选方法的要求，原则上应设4~5个剂量组，每组动物一般为10只，雌雄各半。各剂量组间距大小以兼顾产生毒性大小和死亡为宜，通常以较大组距和较少量动物进行预试。如果受试样品毒性很低，也可采用一次限量法，即用20只动物（雌雄各半），10000 mg/m<sup>3</sup>吸入2h或 5000 mg/m<sup>3</sup>吸入4h，如未引起动物死亡，则不再进行多个剂量的急性吸入毒性试验。

## 6.3 染毒

染毒可采用静式染毒法或动式染毒法。

### 6.3.1 静式染毒法

静式染毒是将实验动物放在一定体积的密闭容器（染毒柜）内，加入一定量的受试样品，并使其挥发，造成试验需要的受试样品浓度的空气，一次吸入性染毒2h。

6.3.1.1 染毒柜的容积以每只染毒小鼠每小时不少于3L空气计，每只大鼠每小时不少于30L计。

6.3.1.2 染毒浓度的计算：染毒浓度一般应采用实际测定浓度。在染毒期间一般可测4~5次，求其平均浓度。在无适当测试方法时。可用下式计算染毒浓度

$$C=(a \times d/v) \times 10^6$$

式中：

C-- 染毒浓度(mg/m<sup>3</sup>)

a-- 加入受试样品的量(ml)

d-- 化学品密度

v-- 染毒柜容积(L)

### 6.3.2 动式染毒法

动式染毒是采用机械通风装置，连续不断地将含有一定浓度受试样品的空气均匀不断地送入染毒柜，空气交换量大约为 12~15 次/h，并排出等量的染毒气体，维持相对稳定的染毒浓度（对通过染毒柜的流动气体应不间断地进行监测，并至少记录 2 次）。一次吸入性染毒 2h。当受试化合物需要特殊要求时，应用其它的气流速率。染毒时，染毒柜内应确保至少有 19%的氧含量和均衡分配的染

毒气体。一般情况下，为确保染毒柜内空气稳定，实验动物的体积不应超过染毒柜体积的5%。且染毒柜内应维持微弱的负压，以防受试样品泄露污染周围环境。同时，应注意防止受试样品爆炸。

#### 6.3.2.1 受试样品气化（雾化）和输入的常用方法

6.3.2.1.1 气体受试样品，经流量计与空气混合成一定浓度后，直接输入染毒柜。

6.3.2.1.2 易挥发液体受试样品，通过空气鼓泡或适当加热促使挥发后输入染毒柜。

6.3.2.1.3 若受试样品现场使用时采取喷雾法时，可采用喷雾器或超声雾化器使其雾化后输入染毒柜。

#### 6.3.2.2 染毒浓度计算

染毒浓度一般应采用动物呼吸带实际测定浓度，每半小时一次，取其平均值。各测定浓度值应在其平均值的25%以内。若无适当的测试方法，也可采用以下公式计算染毒浓度：

$$C=[a \times d / (v_1+v_2)] \times 10^6$$

式中：

C— 染毒浓度(mg/m<sup>3</sup>)

a— 气化或雾化受试样品的量(ml)

d— 受试样品密度

v<sub>1</sub>— 输入染毒柜风量(L)

v<sub>2</sub>— 染毒柜容积(L)

#### 6.4 观察期限及指标

6.4.1 观察并记录染毒过程和观察期内的动物中毒和死亡情况。观察期限一般为14d，观察指标见附录1-A，LC<sub>50</sub>的计算见附录1-B。

6.4.2 对死亡动物进行尸检。观察期结束后，处死存活动物并进行大体解剖，如有必要，进行病理组织学检查。

#### 6.5 试验结果评价

评价试验结果时，应将LC<sub>50</sub>与观察到的毒性效应和尸检所见相结合考虑，LC<sub>50</sub>值是受试样品急性毒性分级和标签标识以及判定受试样品经呼吸道吸入后引起动物死亡可能性大小的依据。引用LC<sub>50</sub>值时一定要注明所用实验动物的种属、性别、染毒方式及时间长短、观察期限等。评价应包括动物接触受试样品与动物异

常表现（包括行为和临床改变、大体损伤、体重变化、致死效应及其它毒性作用）的发生率和严重程度之间的关系。急性吸入毒性分级见附录1-C。

## 7 鉴定报告

鉴定报告应包括如下内容：

- 7.1 受试样品名称、理化性状、配制方法、所用浓度；
- 7.2 动式染毒设备中的气流速度；
- 7.3 实验动物的种属、品系和来源（注明合格证号和动物级别）；
- 7.4 实验动物饲养环境，包括饲料来源、室温、相对湿度、动物实验室合格证号；
- 7.5 所用染毒浓度和动物分组，每组所用动物性别、数量及体重范围；
- 7.6 计算 $LC_{50}$ 的方法；
- 7.7 染毒后动物中毒表现及出现时间和恢复情况、死亡时间、大体解剖所见；
- 7.8 列表报告结果（建议的表格形式见附录1-D），计算的 $LC_{50}$ 及其95%可信区间；
- 7.9 结论。

## 8 试验结果的解释

通过 $LC_{50}$ 的测定，可评价受试样品的急性吸入毒性及其毒性分级（见附录1-C），但其结果外推到人类的有效性是有限的。

# 急性经皮毒性试验

## Acute Dermal Toxicity Test

### 1 范围

本方法规定了动物急性经皮毒性试验的基本原则、技术和要求。  
本方法适用于评价化学品的急性经皮毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD GUIDELINE FOR TESTING CHEMICALS (No. 402. 1995)

USEPA OPPTIS Health Effects (Series 870. 1200 June 1996)

### 3 试验目的

确定受试样品能否经皮肤吸收和短期经皮染毒所产生的毒性作用和强度，并为确定亚急（慢）性经皮毒性及其它试验的剂量设计提供试验依据。

### 4 定义

4.1 急性经皮毒性(Acute Dermal Toxicity):受试样品一次或在 24 h 内多次经皮肤染毒所产生的健康损害效应。

4.2 经皮半数致死剂量 (Dermal Median Lethal Dose) :一次或在 24 h 内多次经皮肤染毒受试样品引起 50%实验动物死亡的剂量，以 mg/kg bw 表示。

4.3 剂量-反应关系(Dose-response Relationship): 表示化学毒物的剂量与某一群体中质效应的发生率之间的关系。

### 5 试验基本原则

在试验前，先去除实验动物受试部位的被毛。将实验动物分成若干剂量组，每组涂布不同剂量的受试样品，而后观察实验动物中毒反应和死亡情况，计算LD<sub>50</sub>。对试验中死亡的动物做大体解剖和病理学检查，对试验结束时的存活动物也应做大体解剖。注意排除受试样品引起的皮肤局部刺激或腐蚀作用所致的全身效应。

## 6 试验方法

### 6.1 受试样品配制

固体受试样品应研磨，过 100 目筛。用适量无毒无刺激性赋形剂混匀，以保证受试样品与皮肤良好的接触。常用的赋形剂有水、植物油、凡士林、羊毛脂等。液体受试样品一般不必稀释，可直接用原液试验。

### 6.2 实验动物

首选大鼠，也可选用豚鼠或家兔。实验动物体重要求范围分别为：大鼠 200~300g，豚鼠 350~450g，家兔 2000~3000g。

试验期间，为避免实验动物相互抓挠，应采用单笼喂养。

试验前 24h，在动物背部正中中线两侧剪毛或剃毛，仔细检查皮肤，要求完整无损，以免改变皮肤的通透性。去毛面积不应少于实验动物体表面积的 10%。各类动物体表面积的数值和计算方法见附录 1-E。

### 6.3 剂量和分组

实验动物随机分为 4~5 个剂量组。若使用水、植物油、凡士林、羊毛脂外的赋形剂，则需设赋形剂对照组。豚鼠或大鼠每一剂量组（单性别）不少于 5 只；家兔每一剂量组（单性别）不少于 4 只。

各剂量组间要有适当的组距，可按等比或等差级设置剂量，以使各剂量组实验动物产生的毒性反应和死亡率呈现剂量-反应（效应）关系。

一般情况下，如果剂量达到 2000mg/kg bw 仍不出现实验动物死亡时，则不需要再进行高剂量试验。

### 6.4 试验步骤

选择适当方法固定好实验动物，将受试样品均匀涂布于实验动物的去毛区，并用油纸和两层纱布覆盖，再用无刺激性胶布或绷带加以固定，以保证受试样品和皮肤的密切接触，防止脱落和动物舔食受试样品。涂布 4h 后取下固定物和覆盖物，用温水或适当的溶剂洗去皮肤上残留的受试样品。

### 6.5 观察期限及指标

观察并记录染毒过程和观察期内的动物的中毒和死亡情况。观察期限一般为 14d，全面观察中毒的发生、发展过程和规律以及中毒特点和毒作用的靶器官，观察指标见附录 1-A，LD<sub>50</sub>的计算见附录 1-B。

对死亡动物进行尸检。观察期结束后，处死存活动物并进行大体解剖，如有必要，进行病理组织学检查。

## 7 试验结果评价

按附录 1-B 计算  $LD_{50}$ ，按附录 1-C 进行急性经皮毒性分级。

## 8 鉴定报告

鉴定报告应包括以下内容：

- 8.1 实验动物种属品系、来源、饲养环境、饲料和饮水；
- 8.2 按剂量组列表(见附表 1-D)说明每组动物数、性别状况、出现毒效应的动物数、死亡动物数；
- 8.3 染毒时间、染毒持续时间、染毒后动物中毒的主要表现；
- 8.4  $LD_{50}$  计算方法；
- 8.5  $LD_{50}$  值及其 95%可信区间（包括雌、雄实验动物各自的  $LD_{50}$ ）；
- 8.6 病理组织学检查结果；
- 8.7 结论。

## 9 试验结果的解释

经皮  $LD_{50}$  是评价化学物急性毒性的重要参数之一，也是急性毒性分级的依据。但  $LD_{50}$  仅表示受试样品经皮吸收引起实验动物死亡 50%的剂量，并不能全面反映受试样品经皮吸收的所有急性毒性特征，因此，评价一受试样品经皮急性毒性既要考虑其对某一品系实验动物的经皮  $LD_{50}$  值，又要考虑其中毒症状表现及反应出现的早晚和持续时间的长短，并结合体重变化与病理学检查结果等，经综合分析才能得出经皮急性毒性较为全面的评价。

# 急性经口毒性试验

## Acute Oral Toxicity Test

### 1 范围

本方法规定了动物急性经口毒性试验的基本原则、技术和要求。

本方法适用于评价化学品的急性毒性作用。

### 2 规范性引用文件

OECD Guideline for Testing of Chemicals (No. 401. Feb. 1987 )

OECD Guideline for Testing of Chemicals (No. 425. Feb. 2001 )

USEPA OPPTIS Health Effects Guideline (Series 870.1100 June 1996)

### 3 试验目的

3.1 检测化学品对实验动物的急性毒性作用和强度。

3.2 为亚急(慢)性等毒性试验提供剂量选择的依据。

3.3 试验结果可作为化学品急性毒性分级和标签标识。

### 4 定义

4.1 急性经口毒性(Acute Oral Toxicity): 一次或在24h内多次经口给予实验动物受试样品后, 动物在短期内出现的健康损害效应。

4.2 经口半数致死剂量 (Oral Median Lethal Dose): 经口一次或24h内多次经口给予受试样品后, 引起实验动物总体中半数死亡的毒物的统计学剂量。以单位体重接受受试样品的质量 (mg/kg bw或g/kg bw) 来表示。

4.3 剂量-反应关系(Dose-response Relationship): 表示化学毒物的剂量与某一群体中质效应的发生率之间的关系。

### 5 试验基本原则

以经口灌胃法给予各试验组动物不同剂量的受试样品, 每组用一个剂量, 染毒剂量的选择可通过预试验确定。染毒后观察动物的毒性反应和死亡情况。试验期间死亡的动物要进行尸检, 试验结束时仍存活的动物要处死并进行大

体解剖。本方法主要适用于啮齿类动物的研究，但也可用于非啮齿类动物的研究。

## 6 试验方法

### 6.1 受试样品的处理

受试样品应溶解或悬浮于适宜的赋形剂中，（不溶性固体或颗粒状物质研磨、过100目筛）建议首选水或食用植物油（如玉米油）作溶剂，也可考虑使用其它赋形剂（如羧甲基纤维素、明胶、淀粉等）等配成混悬液；不能配制成混悬液时，可配制成其它形式（如糊状物等），但不能采用具有明显毒性的有机化学溶剂。如采用有毒性的溶剂应单设溶剂对照组观察。

### 6.2 实验动物

首选健康成年小鼠（18g~22g）和大鼠（180g~220g），也可选用其它敏感动物。同性别实验动物个体间体重相差不得超过平均体重的20%。试验前动物要在试验环境中至少适应3~5d时间。

### 6.3 剂量设计

根据所选方法的要求，原则上应设4~5个剂量组，每组动物一般为10只，雌雄各半。各剂量组间距大小以兼顾产生毒性大小和死亡为宜，通常以较大组距和较少量动物进行预试。如果受试样品毒性很低，也可采用最大限量法，即用20只动物（雌雄各半），采用5000mg/kg bw剂量，如未引起动物死亡，可不再进行多个剂量的急性经口毒性试验。

### 6.4 试验步骤

6.4.1 试验前实验动物应禁食（一般16h左右），不限制饮水。若采用代谢率高的其它动物，禁食时间可以适当缩短。

6.4.2 正式试验时，称量动物体重，随机分组，然后对各组动物用经口灌胃法一次染毒。各剂量组的灌胃体积应相同，小鼠常用容量为20ml/kg bw，大鼠常用容量为10ml/kg bw。若一次给予容量太大，也可在24 h 内分2~3次染毒（每次间隔4h~6h），但合并作为一次剂量计算。染毒后继续禁食3h~4h。若采用分批多次染毒，根据染毒间隔长短，必要时可给动物一定量的食物和水。

#### 6.4.3 观察期限及指标

观察并记录染毒过程和观察期内的动物的中毒和死亡情况。观察期限一般为14d，观察指标、LD<sub>50</sub>的计算及试验记录形式分别见附录1-A、1-B、1-D。

对死亡动物进行尸检。观察期结束后，处死存活动物并进行大体解剖，如有必要，进行病理组织学检查。

6.5 可采用多种方法测定LD<sub>50</sub>，建议采用霍恩氏法、寇氏法、概率单位-对数图解法、最大耐受量试验和上-下法等(见附录1-B)。

## 7 鉴定报告

鉴定报告应包括如下内容：

- 7.1 受试样品名称、理化性状、配制方法、所用浓度；
- 7.2 实验动物的种属、品系和来源（注明合格证号和动物级别）；
- 7.3 实验动物饲养环境，包括饲料来源、室温、相对湿度、动物实验室合格证号；
- 7.4 所用剂量和动物分组，每组所用动物性别、数量及体重范围；
- 7.5 染毒后动物中毒表现和死亡情况及出现时间，大体解剖及病理所见；
- 7.6 计算LD<sub>50</sub>的方法及其LD<sub>50</sub>和95%可信限；
- 7.7 列表报告结果（建议的表格形式见附录D）；
- 7.8 结论。

## 8 试验结果的解释

通过急性经口毒性试验和LD<sub>50</sub>的测定可评价受试样品的急性经口毒性、急性经口毒性分级，其结果外推到人类的有效性很有限。

# 急性眼刺激性/腐蚀性试验

## Acute Eye Irritation/Corrosion Test

### 1 范围

本规范规定了动物急性眼刺激/腐蚀性试验的基本原则、要求和方法  
本规范适用于检测化学物的眼睛刺激性/腐蚀性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No 405, Feb.1987)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.2400, Aug.1998)

### 3 试验目的

确定评价化学物对哺乳动物眼睛是否有刺激作用/腐蚀作用及其程度。

### 4 定义

4.1 眼睛刺激性(Eye Irritation): 指眼球表面接触受试样品后产生的可逆性炎性变化。

4.2 眼睛腐蚀性(Eye Corrosion): 指眼球表面接触受试样品后引起的不可逆性组织损伤。

### 5 试验基本原则

5.1 受试样品以一次剂量滴入每只实验动物的一侧眼睛结膜囊内, 以未作处理的另一侧眼睛作为自身对照;

5.2 在规定的时间内, 观察对动物眼睛的刺激和腐蚀作用程度并评分, 以此评价受试样品对眼睛的刺激作用。观察时间应能足以评价刺激效应的可逆性和不可逆性。观察时间最少 72h, 但一般不超过 21d;

5.3 当动物出现严重和持久的痛苦迹象时, 以适当的方式将动物处死;

5.4 强酸或强碱物质如  $\text{pH} \leq 2$  或  $\text{pH} \geq 11.5$ , 由于其可预见的腐蚀特性, 不必做本试验;

5.5 已在皮肤试验中证实具有腐蚀或严重刺激毒性的物质不必进行眼刺激试验, 可以推测该物质对眼睛将会引起相似的严重结果;

5.6 在充分并公认的体外试验结果中确定可能产生刺激性或腐蚀性的物质不必进行体内试验。

## 6 试验方法

6.1 受试样品：液体、固体或半固体、颗粒物。

6.2 实验动物和饲养环境

6.2.1 动物种属

首选健康成年白色家兔，体重 2~3kg。如果使用其它的哺乳动物做试验，试验者应提供选择的依据。

6.2.2 动物数量

如果受试样品的显著效应是可预见的，可以考虑用一只动物。如果用一只动物试验得出的结果提示受试样品有严重的刺激性和腐蚀性，则不必进行进一步的试验。如果结果相反，则至少需要 3 只家兔。有时，在增加动物的进一步试验中应该适当的阐明可疑反应。

6.2.3 饲养环境

动物实验室应符合国家相应规定。常规饲料喂养，自由饮水。

6.3 剂量设计

对于液态受试样品，一般不需稀释，可直接使用原液，染毒量为 0.1ml。若受试样品为固态或颗粒状，应将其研磨成细粉状，过 200 目筛，染毒量应为 100mg。

气溶胶产品需喷至容器中，收集其液体再使用。对挥发性物质，剂量可以通过使用前后称量容器质量进行估计。

6.4 试验步骤

6.4.1 试验前眼睛的检查

试验前动物要在动物实验室环境中至少适应 3d 时间。试验前 24h，要对实验动物的两只眼睛进行常规检查。有眼睛刺激症状、角膜缺陷或结膜损伤的动物不能用于试验。

6.4.2 染毒

6.4.2.1 轻轻拉开实验动物一侧眼睛的下眼睑，将受试样品 0.1ml (100mg) 滴入 (或放入) 结膜囊中，使上、下眼帘被动闭合 1s，以防止受试样品丢失。未处理的另一侧眼睛作为自身对照。

6.4.2.2 滴入受试样品 24h 内不冲洗眼睛，如果认为必要，在 24h 时可进行冲洗。

6.4.2.3 如果受试样品有明显的刺激征象，另选 3 只动物进行冲洗试验。在滴入受试样品 30s 后，用生理盐水冲洗 5min，水的流量和流速都不应导致眼损伤。

6.4.3 观察周期

观察时间最少要 72h，也不能严格固定不变，但必须足够以充分评估观察到的可逆或不可逆效应。通常观察时间一般不超过 21d。

#### 6.4.4 临床检查和评分

6.4.4.1 在滴入受试样品后的第 1h, 24h, 48h, 72h 和 96h 对眼睛进行检查, 如果 72h 时未出现刺激反应, 可终止试验。如果发现累及角膜或有其它眼刺激作用, 7d 内不恢复者, 为确定该损害的可逆性或不可逆性需延长观察时间, 一般不超过 21d。除了对角膜、虹膜、结膜进行观察外, 其它损害效应都应记录并报告。在 24h 观察和记录结束后, 可使用荧光素钠对所有动物的眼睛作进一步检查。在每次检查中均应按表 1 记录眼的刺激反应, 并按表 2 进行眼刺激强度评价。

6.4.4.2 在进行检查时, 可使用放大镜、手持裂隙灯, 并按表 3 记录

表 1 眼各部位损伤评分表

部位及损伤情况		积分
角膜	A. 混浊程度(以最致密部位为准)	
	无混浊	0
	散在或弥漫性混浊, 虹膜清晰可见	1
	半透明区易分辨, 虹膜轻度模糊不清	2
	出现灰白色半透明区, 虹膜模糊不清, 瞳孔大小勉强可见	3
	角膜混浊, 虹膜无法辨认	4
	B. 角膜受损范围	
	<1/4	1
	1/4~1/2	2
	1/2~3/4	3
3/4~1	4	
积分 A×B×5 最高积为 80		
虹膜	正常	0
	皱褶明显加深、充血、水肿、角膜周围有充血(出现任何一项或任何二项), 对光反应迟钝	1
	对光反应消失、出血、肉眼可见严重损伤(出现其中一项或全部)	2
积分×5 最高积分为 10		
结膜	A. 充血, 指睑结膜(包括角膜、虹膜的球结膜部分)	
	血管正常	0
	血管充血, 呈鲜红色	1
	血管充血, 呈深红色, 个别血管难以辨认	2
	弥漫性充血, 呈深紫红色	3
	B. 水肿	
	无水肿	0
	轻微水肿伴部分眼睑外翻	1
	明显水肿伴部分眼睑外翻	2
	水肿至眼睑近半闭合	3
	水肿至眼睑超过半闭合	4
	C. 分泌物	
	无	0
少量分泌物(不包括动物内眦少量分泌物)	1	
分泌物使眼睑和睫毛潮湿或粘着	2	
分泌物使整个眼区潮湿或粘着	3	
积分(A+B+C)×2 最高积分为 20		
角膜、虹膜和结膜反应累加最高积分为 110		

染毒后前 4 天 最高总积分平均值	刺激反应持续时间 (总积分平均值)	刺激强度
0~	第 1d $\geq$ 0	无刺激性
2.5~	第 2d $\geq$ 0	轻刺激性
15~	第 4d=0	轻刺激性
	第 4d>0	中度刺激性
25~	第 7d $\leq$ 20, 半数以上动物第 7d $\leq$ 10	中度刺激性
	第 7d $\leq$ 20, 半数以上动物第 7d>10, 但是无任何一只动物 7d>30	中度刺激性
	第 7d $\leq$ 20, 半数以上动物第 7d>10, 而且有一只动物 7d>30	重度刺激性
	第 7d>20	重度刺激性
50~		重度刺激性

角膜损伤	积分	虹膜	积分
1. 水肿		1. 前房(aerior Chamber)	
A. 区域		A. 细胞数	
<1/4	1	很少量	1
1/4~1/2	2	中等数	2
1/2~3/4	3	很多	3
3/4~1	4	B. 闪光(flare)	
		轻微	1
B. 致密度		中等	2
上皮水肿加上基质轻微水肿	1	明显	3
正常角膜的 1.5 倍厚	2	2. 虹膜	
正常角膜的 2 倍厚	3	A. 虹膜充血	
整个角膜不透明	4	轻度	1
		中度	2
		明显	3
2. 角膜荧光素钠着色		B. 瞳孔对光反应	
A. 散点状着色		迟钝	1
<1/4	1	消失	2
1/4~1/2	2		
1/2~3/4	3	虹膜总分	11
3/4~1	4	眼睑和结膜损伤	积分
		1. 充血 轻度	1
B. 融合着色		中度	2
<1/4	1	明显	3
1/4~1/2	2	2. 水肿 轻度	1
1/2~3/4	3	中度	2
3/4~1	4	明显	3
		3. 着色 轻(1/3)	1
		中等(1/3-2/3)	2
3. 角膜血管化、疤痕、色素沉着		大范围(2/3-1)	3
A. 范围(环状面)		4. 溃疡 轻度	1
<1/4	1	中度	2
1/4~1/2	2	明显	3
1/2~3/4	3	5. 疤痕 轻度	1
3/4~1	4	中等	2
		明显	3
4. 角膜穿孔	4		
角膜总分	20	眼睑和结膜总分	15

## 6.5 结果统计与评价

### 6.5.1 数据汇总

数据应以表格形式汇总，记录观察期内每只动物的刺激评分，直到症状消失或 21d 试验结束。详细描述刺激的程度和性质，严重损害的出现，以及观察到的除眼以外的任何效应。按表 4 进行统计。

表 4 家兔眼刺激试验结果\*

动物编号	部位	眼刺激性反应积分											
		1h		24h		48h		72h		第 4d		第 7d	
		样品	对照	样品	对照	样品	对照	样品	对照	样品	对照	样品	对照
1	结膜												
	虹膜												
	角膜												
	总分												
2	结膜												
	虹膜												
	角膜												
	总分												
3	结膜												
	虹膜												
	角膜												
	总分												
4	结膜												
	虹膜												
	角膜												
	总分												
总积分													
平均值													

\*实验条件：不冲洗/30 秒后冲洗

### 6.5.2 结果的评价

眼刺激评分应与观察到的反应的性质和可逆性或其它方面结合进行评价。单独的积分值不能作为受试样品的刺激性质的最后评判，应将所有观察结果及各种因素进行综合评价。

## 7 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外，还应包括以下方面：

7.1 表格记录每只动物每个时间点（如 1h, 24h, 48h, 72h 和 4d, 7d）的刺激反应；

- 7.2 具体描述除眼部以外的其它作用；
- 7.3 刺激 / 腐蚀程度和性质的描述；
- 7.4 描述在各观察时点积分时的检查方法(如裂隙灯、生物显微镜、荧光素染色)；
- 7.5 结论。

## 8 试验结果的解释

急性眼刺激试验结果从动物外推到人的可靠性很有限。白色家兔在大多数情况下对有刺激性或腐蚀性的物质较人类敏感。若用其它品系动物进行试验时也得到类似结果，则会增加从动物外推到人的可靠性。

# 皮肤刺激性/腐蚀性试验

## Dermal Irritation/Corrosion Test

### 1 范围

本规范规定了动物皮肤刺激/腐蚀性试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品对皮肤的刺激性/腐蚀性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No. 404, July.1992)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870. 2500, Aug. 1998)

### 3 试验目的

确定化学物对哺乳动物皮肤局部是否有刺激作用或腐蚀作用及其程度,为制定防护化学物对皮肤的刺激保护措施提供依据。

### 4 定义

4.1 皮肤刺激性(Dermal Irritation): 皮肤涂敷受试样品后局部产生的可逆性炎性变化。

4.2 皮肤腐蚀性(Dermal Corrosion): 皮肤涂敷受试样品后局部引起的不可逆组织损伤。

### 5 试验基本原则

5.1 将受试样品一次(或多次)涂(敷)于健康无破损的皮肤上,并作自身对照(除非怀疑有严重的刺激/腐蚀并逐渐发展);

5.2 在规定时间内观察和评价刺激反应的程度,并作详细的记录。观察时间应足够进行可逆或不可逆效应的观察,以便进行完整的评价,但一般不超过 14 天;

5.3 强酸或强碱物质如  $\text{pH} \leq 2$  或  $\text{pH} \geq 11.5$ , 由于可预见其腐蚀特性,不必做本试验;

5.4 若已知受试样品有很强的经皮吸收毒性 ( $\text{LD}_{50} \leq 200\text{mg/kg bw}$ ) 的物质不必进行本试验;

5.5 在充分并公认的体外试验结果中确定可能产生腐蚀或刺激毒性的物质不必进行体内试验。如果从受试样品的结构活性构效关系可以预见潜在的腐蚀毒性，则不必做本试验。

## 6 试验方法

### 6.1 受试样品

液态受试样品采用原液或人类实际应用浓度。固体受试样品经研磨粉碎，过100目筛，然后用水或适当的赋形剂（如凡士林、阿拉伯树胶、乙醇和水、羧甲基纤维素、聚乙二醇、丙三醇、植物油和矿物油等）按一定比例调制，以保证与皮肤充分接触。当使用赋形剂时，要考虑赋形剂对受试样品皮肤刺激效应的影响，使用的赋形剂既不能改变受试样品的吸收、分布、代谢、蓄积或化学性质，也不能增强、减弱或改变它的毒性特征。

### 6.2 实验动物和饲养环境

首选健康成年白色家兔，其次为白色豚鼠。如果使用其他的哺乳动物做试验，试验者应提供选择的依据。

至少需要4只健康成年动物（雄性和/或雌性均可），除非提供选择较少动物的依据。推荐使用逐步接触法（见6.4.2），以便阐明可疑反应。每只动物相邻的未处理的皮肤可作为对照。

实验动物应单笼饲养，试验前动物要在动物实验室中至少适应3d时间。

实验动物和动物实验室应符合国家相应规定。常规饲料喂养，自由饮水。

### 6.3 剂量设计

受试样品0.5ml(g)，均匀涂布于受试部位。如受试样品难以获得，或易产生全身毒性等原因，用量可适当减少。但为了试验的一致性，测试面积应力求相等。

### 6.4 试验步骤

#### 6.4.1 试验前准备

试验前24h，将实验动物脊柱两侧毛剪去或剃掉，不可损伤表皮，去毛范围左右各3cm×3cm。24h后，选择皮肤健康完整无损的动物进行试验。不应在长有浓密岛状毛的部位进行受试样品试验。

#### 6.4.2 染毒

取受试样品0.5ml(g)直接涂布在皮肤上，用二层纱布（2.5cm×2.5cm）和

一层玻璃纸或类似物覆盖，再用无刺激性胶布和绷带加以固定。另一侧皮肤作为对照。采用封闭试验，敷用时间为 4h。试验结束后，用温水或无刺激性溶剂清除残留受试样品。

如怀疑受试样品可能引起严重刺激或腐蚀作用，可采用分段试验，将三个涂布受试样品的纱布块同时或先后敷贴于一只家兔背部脱毛区皮肤上，分别于涂敷后 3min、60min 和 4h 取下一块纱布，皮肤涂敷部位在任一时间点出现腐蚀作用，即可停止试验。

#### 6.4.3 观察期限

观察时间的确定应足以观察到可逆和不可逆刺激作用的全过程，一般不超过 14d。于清除受试样品后的 1、24、48、72h 分别观察给予受试样品部位的皮肤反应，按表 1 进行皮肤反应评分，以受试动物积分的平均值进行综合评价，根据 24、48 和 72h 各观察时点最高积分均值，按表 2 判定皮肤刺激强度。

表 1 皮肤刺激反应评分

皮肤反应	积分
红斑和焦痂形成	
无红斑	0
轻微红斑（仅仅可觉察到）	1
明显红斑	2
中等程度到重度程度红斑	3
严重红斑（轻微的结痂）至轻度焦痂（深度损伤）	4
水肿形成	
无水肿	0
很轻微水肿（仅仅可觉察到）	1
轻微水肿（肿起部位边界清楚）	2
中度水肿（隆起约 1mm）	3
严重水肿（隆起约 1mm，超出染毒部位）	4

表 2 皮肤刺激强度分级标准

积分均值*	强度分级
0~	无刺激性
0.5~	轻刺激性
2.0~	中等刺激性
6.0~	强刺激性

\*指观察时点的最高积分均值

#### 6.5 结果统计与评价：

数据应以表 3 形式汇总。皮肤刺激评分应与观察到的反应的性质和可逆性或其它方面综合进行评价。单独的积分值不能作为受试样品的刺激性质的最后评

判，可以作为参考值，在完整的观察描述和评价下具有一定意义。除根据皮肤红斑、水肿形成的标准积分外，还应结合刺激作用的性质、恢复程度等进行化学物刺激作用的综合评价。

表 3 家兔急性皮肤刺激/腐蚀实验结果记录表

动物 编号	性 别	体重 (kg)	1h			24h			48h									
			样品			对照			样品			对照						
			红 斑	水 肿	总 分													
1																		
2																		
3																		
4																		
总积分平均值																		
刺激强度分级																		

## 7 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外，还应包括以下方面：

- 7.1 用表格记录每只动物每个时间点（如第 1、24、48 和 72 小时，直到损害逆转或试验终止）的红斑、水肿以及其它皮肤损害/反应；
- 7.2 观察到的任何损伤和系统效应；
- 7.3 刺激 / 腐蚀程度和性质的描述；
- 7.4 结论。

## 8 试验结果的解释

急性皮肤刺激试验结果从动物外推到人的可靠性很有限。白色家兔在大多数情况下对有刺激性或腐蚀性的物质较人类敏感。若用其它品系动物进行试验时也得到类似结果，则会增加从动物外推到人的可靠性。试验中使用封闭式接触是一种超常的实验室条件下的试验，在人类实际接触化学品过程中很少存在这种接触方式。

# 皮肤变态反应实验（皮肤致敏试验）

## Skin Sensitisation Test

### 1 范围

本规范规定了动物皮肤致敏试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品对皮肤的变态反应性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No 406, July.1992)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.2600, Aug.1998)

### 3 试验目的

确定重复接触化学物对哺乳动物是否可引起皮肤变态反应及其程度。

### 4 定义

4.1 皮肤致敏反应/过敏性接触性皮炎 (Skin Sensitization/Allergic Contact Dermatitis): 是皮肤对一种物质产生的免疫源性皮肤反应。对于人类这种反应可能以搔痒、红斑、丘疹、水疱、融合水疱为特征。动物的反应不同,可能只见到皮肤红斑和水肿。

4.2 诱导接触(Induction Exposure): 指机体通过接触受试样品以达到诱导产生致敏状态目的的试验性暴露;

4.3 诱导期(Induction Period): 指机体通过接触受试样品而诱导出过敏状态所需的时间;

4.4 激发接触(Challenge Exposure): 机体接受诱导暴露后,再次接触受试样品的试验性暴露,以确定皮肤是否会出现过敏反应。

### 5 试验基本原则

实验动物通过多次皮肤涂抹诱导接触受试样品 10~14d (诱导期) 后,给予激发剂量的受试样品,观察实验动物,并与对照动物比较对激发接触受试样品的皮肤反应强度。

## 6 试验方法

### 6.1 实验动物和饲养环境

#### 6.1.1 动物种属

首选健康、成年的白色豚鼠，体重250~300g。如选择其它种属，试验者需提供选择的依据。

#### 6.1.2 动物实验室和饲养

动物实验室应符合国家相应规定。动物自由饮食和饮水。需提供富含维生素C的食物。

#### 6.1.3 动物数量和性别

动物数量和性别依赖于选择的试验方法。两种性别均可用于局部封闭敷贴法（Buehler test）和豚鼠最大反应试验（GPMT）。雌性动物应该是未生育过和未怀孕的。Buehler试验要求试验组至少20只豚鼠，对照组至少10只。GPMT要求试验组至少10只豚鼠，对照组至少5只，如果试验结果难以确定受试样品的致敏性，应增加动物数，试验组至少20只，对照组至少10只。

### 6.2 试验方法可靠性的检查

使用已知的能引起轻度/中度致敏的阳性物每隔6个月检查一次。局部封闭涂皮法至少有30%动物出现皮肤过敏反应；皮内注射法至少有60%动物出现皮肤过敏反应。阳性物一般采用：

- 己苯烯醛 (CAS No. 101 - 86 - 0)；
- 巯基苯并噻唑 (CAS No. 149 - 30 - 4)；
- 氨基苯甲酸乙酯 (CAS No. 94 - 09 - 7)；
- 二硝基氯苯 (CAS No. 97 - 00 - 7)；或
- DER 331环氧树脂。

### 6.3 剂量设计

试验剂量水平可以通过少量动物(2~3只)的预试验获得。诱导剂量为能引起皮肤刺激反应的最高浓度，激发剂量为不能引起皮肤刺激作用的最大剂量。

水溶性受试样品可用水或无刺激性表面活性剂作为赋形剂，其它受试样品可用80%乙醇(诱导接触)或丙酮(激发接触)作赋形剂。

### 6.4 试验步骤

#### 6.4.1 局部封闭涂皮法（Buehler test）

6.4.1.1 动物数：试验组至少20只，对照组至少10只。

#### 6.4.1.2 剂量水平：

用2~3只动物进行预试验，寻找能引起皮肤轻度刺激反应的最高浓度（剂量）。

在试验中设阴性对照组，在诱导接触时该组仅涂以溶剂作为对照；在激发接触时该组涂以受试样品。对照组动物必须与受试样品组动物为同一批。在实验室开展致敏反应试验初期、或使用新的动物种属或品系时，需同时设阳性对照组。

#### 6.4.1.3 诱导接触：

试验前 24h 实验动物背部左侧去毛，去毛范围为  $4\text{cm}^2 \sim 6\text{cm}^2$ 。

于第 0、7、14d 分别将 0.4ml 新配制的受试样品（最小刺激浓度）涂布在背部左侧  $2\text{cm} \times 2\text{cm}$  的区域，以二层纱布和一层玻璃纸覆盖，再以无刺激胶带封闭固定 6h 后，移去敷贴物，清除残留受试样品。

#### 6.4.1.4 激发接触：

末次诱导 2W 后，即第 28d，将 0.4ml 受试样品（最大无刺激浓度，建议为诱导浓度的 1/2）敷贴于豚鼠右侧背部  $2\text{cm} \times 2\text{cm}$  的脱毛区（试验前 24h 去毛），然后用二层纱布和一层玻璃纸覆盖，后者紧贴皮肤，再以无刺激胶带封闭固定 6h 后，移去敷贴物，清洗方法同前。

#### 6.4.1.5 结果观察与评价：

在 24、48h 后分别观察局部皮肤反应。用盲法观察对照组和试验组。按表 1 对局部皮肤反应评分。当受试样品组动物出现皮肤反应积分  $\geq 2$  时，判为该动物出现皮肤致敏反应阳性，并计算致敏率，按表 2 判定受试样品的致敏强度。

6.4.1.6 如果结果可疑，该动物可以一周后重新激发，用最初的对照组或新的对照组进行比较。

表 1 皮肤致敏反应试验评分标准

反 应	评 分
红斑和焦痂形成	
无反应	0
轻微的红斑(勉强可见)	1
明显红斑(散在或小块红斑)	2
中度-重度红斑	3
严重红斑(紫红色)至轻微焦痂形成	4
水肿形成	
无水肿	0
轻微水肿(勉强可见)	1
中度水肿(皮肤隆起轮廓清楚)	2
严重水肿(皮肤隆起约 1cm 或以上)	3
最高积分	7

注：皮肤致敏程度分级同表 2

表 2 皮肤致敏反应试验分级标准

致敏率 (%)	等级	致敏程度
<9	I	弱
9~	II	轻度
29~	III	中度
65~	IV	强
≥81	V	极强

注:致敏率是反应评分为 1 或以上的动物数占该组动物总数的百分比, I 级致敏度没有意义, 在实际使用下无致敏危险。

#### 6.4.2 豚鼠最大反应试验 (Guinea Pig Maximization Test, GPMT)

采用完全福氏佐剂(Freund Complete Adjuvant, FCA)皮内注射方法检测致敏的可能性。

6.4.2.1 动物数:试验组至少用 10, 对照组至少 5 只。如果试验结果难以确定受试样品的致敏性, 应增加动物数, 试验组 20 只, 对照组 10 只。

6.4.2.2 剂量水平:诱导接触受试样品浓度为能引起皮肤轻度刺激反应的最高浓度, 激发接触受试样品浓度为不能引起皮肤刺激反应的最高浓度。试验浓度水平可以通过少量动物(2~3 只)的预试验获得。

#### 6.4.2.3 试验步骤

##### 6.4.2.3.1 诱导接触(第 0d):

受试样品组:将颈背部去毛区(2cm×4cm)中线两侧划定三个对称点, 每点皮内注射 0.1mL 下述溶液。

第 1 点 1:1 (V/V) FCA/水或生理盐水的混合物

第 2 点 耐受浓度的受试样品

第 3 点 用 1:1 (V/V) FCA/水或生理盐水配制的受试物, 浓度与第 2 点相同

对照组:注射部位同受试样品

第 1 点 1:1 (V/V) FCA/水或生理盐水的混合物

第 2 点 未稀释的赋形剂

第 3 点 用 1:1 (V/V) FCA/水或生理盐水配制的浓度为 50% (w/v) 的赋形剂

##### 6.4.2.3.2 诱导接触(第 7d):

将涂有 0.5 (mL) 受试样品的 2cm×4cm 滤纸敷贴在上述再次去毛的注射部

位，然后用两层纱布，一层玻璃纸覆盖，无刺激胶布封闭固定 48h。对无皮肤刺激作用的受试样品，可加强致敏，于第二次诱导接触前 24h 在注射部位涂抹 10% 十二烷基硫酸钠（SLS）0.5mL。对照组仅用赋形剂作诱导处理。

#### 6.4.2.3.3 激发接触（第 21d）：

将豚鼠躯干部去毛，用涂有 0.5g (mL) 受试样品的 2cm×2cm 滤纸片敷贴在去毛区，然后再用两层纱布，一层玻璃纸覆盖，无刺激胶布封闭固定 24h。对照组动物作同样处理。如激发接触所得结果不能确定，可在第一次激发接触一周后进行第二次激发接触。对照组作同步处理。

#### 6.4.2.4 观察及结果评价：

激发接触结束，除去涂有受试样品的滤纸后 24、48 和 72h，观察皮肤反应，（如需要清除受试残留物可用水或选用不改变皮肤已有反应和不损伤皮肤的溶剂）按表 3 评分。当受试样品组动物皮肤反应积分 $\geq 1$ 时，应判为皮肤致敏反应阳性，按表 2 对受试样品进行致敏强度分级。

表 3 皮肤致敏反应试验评分标准

反 应	评 分
无反应	0
散在或小块红斑	1
中度弥漫的红斑、轻度水肿	2
严重的红斑、水肿	3

6.4.3 皮肤变态反应试验-局部淋巴结法（Skin Sensitization-Local Lymph Node Assay, LLNA)见参考方法。

## 7 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外，还应包括以下方面：

- 7.1 阳性试验信息，包括阳性对照物、试验方法和试验时间；
- 7.2 评分等级系统的简要描述；
- 7.3 诱导和激发使用的赋形剂，如果不是水和生理盐水，说明使用的理由。任何可能与受试样品反应、或增强、或妨碍吸收的原料均应报告；
- 7.4 诱导和激发使用受试样品的总量，每次使用的技术；
- 7.5 结论

## 8 试验结果的解释

试验结果应能得出受试样品的致敏能力和强度，这些结果只能在很有限的范围内外推到人类。

# 规范性附录

## 附录 1-A

1-A 啮齿类动物中毒表现观察项目表

器官系统	观察及检查项目	中毒后一般表现
中枢神经系统及躯体运动	行为	改变姿势，叫声异常，不安或呆滞
	动作	震颤，运动失调，麻痹，惊厥，强制性动作
	各种刺激的反应	易兴奋，知觉过敏或缺乏知觉
	大脑及脊髓反射	减弱或消失
	肌肉张力	强直，弛缓
自主神经系统	瞳孔大小	缩小或放大
	分泌	流涎，流泪
呼吸性质	鼻孔	流鼻涕
	呼吸性质和速率	徐缓，困难，潮式呼吸
心血管系统	心区触诊	心动过缓，心律不齐，心跳过强或过弱
胃肠系统	腹形	气胀或收缩，腹泻或便秘
	粪便硬度和颜色	粪便不成形，黑色或灰色
生殖泌尿系统	阴户，乳腺	膨胀
	阴茎	脱垂
	会阴部	污秽
皮肤和毛皮	颜色，张力 完整性	发红，皱折，松弛，皮疹 竖毛
粘膜	粘膜 口腔	流粘液，充血，出血性紫绀，苍白 溃疡
眼	眼睑	上睑下垂
	眼球	眼球突出或震颤
	透明度	混浊
其它	直肠或皮肤温度	降低或升高
	一般情况	姿势不正常，消瘦

## 附录1-B 化学物急性毒性试验LD<sub>50</sub>（LC<sub>50</sub>）计算方法

### 1-B1 霍恩氏（Horn）法

1.1 预试验：可根据受试样品的性质和已知资料，选用下述方法：一般多采用0.1、1.0和10.0g/kg bw的剂量，各以2~3只动物预试验。根据24h内死亡情况，估计LD<sub>50</sub>的可能范围，确定正式试验的剂量。也可简单地采用一个剂量，如215mg/kg bw，用5只动物预试验。观察24h内动物的中毒表现。如症状严重，估计多数动物可能死亡，即可采用低于215mg/kg bw的剂量系列，反之症状较轻，则可采用高于此剂量的剂量系列。如有相应的文献资料时可不进行预试验。

1.2 动物数：一般每组用 5 只。

1.3 常用剂量系列： 1.00

2.  $15 \times 10^t$   $t=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3$

4. 64

因为剂量间距较 1.0/3.16  $t=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3$  为小，所以结果较为精确。一般试验时，可根据上述剂量系列设计 5 个组，即较原来的方法在最低剂量组以下或最高剂量组以上各增设一组，这样在查表时容易得出结果。

1.4 正式试验：将动物在动物实验室饲养观察 3~5 天，使其适应环境，证明其确系健康动物后，进行随机分组。给予受试样品后一般观察 14 天，必要时延长到 28 天。记录死亡数，查表（附录 1-B）求得  $LD_{50}$ ，并记录死亡时间及中毒表现等。

1.5 该方法的优缺点：优点是简单易行，节省动物；缺点是所得  $LD_{50}$  的可信限范围较大，不够精确。但经多年来的实际应用与验证，同一受试样品与寇氏法所得结果极为相近。因此对其测定的结果应认为是可信与有效的。

1-B-1.1 霍恩氏法 (Horn)  $LD_{50}$  值计算 (剂量递增法测定  $LD_{50}$  计算用表)

组1 组1	组2 组3	组3 组2	组4 组4	剂量1=0.464 剂量2=1.00 $\times 10^t$ 剂量3=2.15 剂量4=4.64		剂量1=1.00 剂量2=2.15 $\times 10^t$ 剂量3=4.64 剂量4=10.0		剂量1=2.15 剂量2=4.64 $\times 10^t$ 剂量3=10.0 剂量4=21.5	
				$LD_{50}$	95%可信限	$LD_{50}$	95%可信限	$LD_{50}$	95%可信限
0	0	3	5	2.00	1.37-2.91	4.30	2.95-6.26	9.26	6.36-13.5
0	0	4	5	1.71	1.26-2.33	3.69	2.71-5.01	7.94	5.84-10.8
0	0	5	5	1.47	—	3.16	—	6.81	—
0	1	2	5	2.00	1.23-3.24	4.30	2.65-6.98	9.26	5.70-15.0
0	1	3	5	1.71	1.05-2.78	3.69	2.27-5.99	7.94	4.89-12.9
0	1	4	5	1.47	0.951-2.27	3.16	2.05-4.88	6.81	4.41-10.5
0	1	5	5	1.26	0.926-1.71	2.71	2.00-3.69	5.84	4.30-7.94
0	2	2	5	1.71	1.01-2.91	3.69	2.17-6.28	7.94	4.67-13.5
0	2	3	5	1.47	0.862-2.50	3.16	1.86-5.38	6.81	4.00-13.5
0	2	4	5	1.26	0.775-2.05	2.71	1.69-4.41	5.84	3.60-9.50
0	2	5	5	1.08	0.741-1.57	2.33	1.60-3.99	5.01	3.44-7.30
0	3	3	5	1.26	0.740-2.14	2.71	1.59-4.62	5.84	3.43-9.95
0	3	4	5	1.03	0.665-1.75	2.33	1.43-3.78	5.01	3.08-8.14
1	0	3	5	1.96	1.22-3.14	4.22	2.63-6.76	9.09	5.66-14.6
1	0	4	5	1.62	1.07-2.43	3.48	2.31-5.24	7.50	4.98-11.3
1	0	5	5	1.33	1.05-1.70	2.87	2.26-3.65	6.19	4.87-7.87
1	1	2	5	1.96	1.06-3.60	4.22	2.29-7.75	9.09	4.94-16.7
1	1	3	5	1.62	0.866-3.01	3.48	1.87-6.49	7.50	4.02-16.7
1	1	4	5	1.33	0.737-2.41	2.87	1.59-5.20	6.19	3.42-11.2
1	1	5	5	1.10	0.661-1.83	2.37	1.42-3.95	5.11	3.07-8.51
1	2	2	5	1.62	0.818-3.19	3.48	1.76-6.37	7.50	3.80-14.8

1	2	3	5	1.33	0.658-2.70	2.87	1.42-5.82	6.19	3.05-12.5
1	2	4	5	1.10	0.550-2.20	2.37	1.19-4.74	5.11	2.55-10.2
1	3	3	5	1.10	0.523-2.32	2.37	1.13-4.99	5.11	2.43-10.8
2	0	3	5	1.90	1.00-3.58	4.08	2.16-7.71	8.80	4.66-16.6
2	0	4	5	1.47	0.806-2.67	3.16	1.74-5.76	6.81	3.74-12.4
2	0	5	5	1.14	0.674-1.92	2.45	1.45-4.13	5.28	3.13-8.89
2	1	2	5	1.90	0.839-4.29	4.08	1.81-9.23	8.80	3.89-19.9
2	1	3	5	1.47	0.616-3.50	3.16	1.33-7.53	6.81	2.86-16.2
2	1	4	5	1.14	0.466-2.77	2.45	1.00-5.98	5.28	2.16-12.9
2	2	2	5	1.47	0.573-3.76	3.16	1.24-8.10	6.81	2.66-17.4
2	2	3	5	1.14	0.406-3.18	2.45	0.875-6.85	6.28	1.89-14.8
0	0	4	4	1.96	1.18-3.26	4.22	2.53-7.02	9.09	5.46-15.1
0	0	5	4	1.62	1.27-2.05	3.48	2.74-4.42	7.50	5.90-9.53
0	1	3	4	1.96	0.978-3.92	4.22	2.11-8.44	9.09	4.54-18.2
0	1	4	4	1.62	0.893-2.92	3.48	1.92-6.30	7.50	4.14-13.6
0	0	3	5	2.00	1.37-2.91	4.30	2.95-6.26	9.26	6.36-13.5
0	0	4	5	1.71	1.26-2.33	3.69	2.71-5.01	7.94	5.84-10.8
0	0	5	5	1.47	—	3.16	—	6.81	—
0	1	2	5	2.00	1.23-3.24	4.30	2.65-6.98	9.26	5.70-15.0
0	1	3	5	1.71	1.05-2.78	3.69	2.27-5.99	7.94	4.89-12.9
0	1	4	5	1.47	0.951-2.27	3.16	2.05-4.88	6.81	4.41-10.5
0	1	5	5	1.26	0.926-1.71	2.71	2.00-3.69	5.84	4.30-7.94
0	2	2	5	1.71	1.01-2.91	3.69	2.17-6.28	7.94	4.67-13.5
0	2	3	5	1.47	0.862-2.50	3.16	1.86-5.38	6.81	4.00-13.5
0	2	4	5	1.26	0.775-2.05	2.71	1.69-4.41	5.84	3.60-9.50
0	2	5	5	1.08	0.741-1.57	2.33	1.60-3.99	5.01	3.44-7.30
0	3	3	5	1.26	0.740-2.14	2.71	1.59-4.62	5.84	3.43-9.95
0	3	4	5	1.03	0.665-1.75	2.33	1.43-3.78	5.01	3.08-8.14
1	0	3	5	1.96	1.22-3.14	4.22	2.63-6.76	9.09	5.66-14.6
1	0	4	5	1.62	1.07-2.43	3.48	2.31-5.24	7.50	4.98-11.3
1	0	5	5	1.33	1.05-1.70	2.87	2.26-3.65	6.19	4.87-7.87
1	1	2	5	1.96	1.06-3.60	4.22	2.29-7.75	9.09	4.94-16.7
1	1	3	5	1.62	0.866-3.01	3.48	1.87-6.49	7.50	4.02-16.7
1	1	4	5	1.33	0.737-2.41	2.87	1.59-5.20	6.19	3.42-11.2
1	1	5	5	1.10	0.661-1.83	2.37	1.42-3.95	5.11	3.07-8.51
1	2	2	5	1.62	0.818-3.19	3.48	1.76-6.37	7.50	3.80-14.8
1	2	3	5	1.33	0.658-2.70	2.87	1.42-5.82	6.19	3.05-12.5
1	2	4	5	1.10	0.550-2.20	2.37	1.19-4.74	5.11	2.55-10.2
1	3	3	5	1.10	0.523-2.32	2.37	1.13-4.99	5.11	2.43-10.8
2	0	3	5	1.90	1.00-3.58	4.08	2.16-7.71	8.80	4.66-16.6
2	0	4	5	1.47	0.806-2.67	3.16	1.74-5.76	6.81	3.74-12.4
2	0	5	5	1.14	0.674-1.92	2.45	1.45-4.13	5.28	3.13-8.89
2	1	2	5	1.90	0.839-4.29	4.08	1.81-9.23	8.80	3.89-19.9
2	1	3	5	1.47	0.616-3.50	3.16	1.33-7.53	6.81	2.86-16.2
2	1	4	5	1.14	0.466-2.77	2.45	1.00-5.98	5.28	2.16-12.9
2	2	2	5	1.47	0.573-3.76	3.16	1.24-8.10	6.81	2.66-17.4
2	2	3	5	1.14	0.406-3.18	2.45	0.875-6.85	6.28	1.89-14.8
0	0	4	4	1.96	1.18-3.26	4.22	2.53-7.02	9.09	5.46-15.1
0	0	5	4	1.62	1.27-2.05	3.48	2.74-4.42	7.50	5.90-9.53
0	1	3	4	1.96	0.978-3.92	4.22	2.11-8.44	9.09	4.54-18.2
0	1	4	4	1.62	0.893-2.92	3.48	1.92-6.30	7.50	4.14-13.6

1-B-1.2 此表用于每组5只动物，其剂量递增公比为 $10^{1/2}$ ，意即 $10 \times 10^{1/2}=31.6$ ， $31.6 \times 10^{1/2}=100 \dots$ ，余此类推。此剂量系列排列如下：

$$1.00$$

$$3.16 \times 10^t \quad t=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3$$

1-B-1.2 霍恩氏法 (Horn) LD<sub>50</sub>值计算 (剂量递增法测定LD<sub>50</sub>计算用表)

组1 组2 组3 组4 或 组1 组3 组2 组4				剂量1=0.316 剂量2=1.00 × 10 <sup>t</sup> 剂量3=3.16 剂量4=10.0		剂量1=1.00 剂量2=3.16 × 10 <sup>t</sup> 剂量3=10.0 剂量4=31.6	
				LD <sub>50</sub>	95%可信限	LD <sub>50</sub>	95%可信限
0	0	3	5	2.82	1.60-4.95	8.91	5.07-15.7
0	0	4	5	2.24	1.41-3.55	7.08	4.47-11.2
0	0	5	5	1.78	--	5.62	--
0	1	2	5	2.82	1.36-5.84	8.91	4.30-18.5
0	1	3	5	2.24	1.08-4.64	7.08	3.42-14.7
0	1	4	5	1.78	0.927-3.41	5.62	2.93-10.8
0	1	5	5	1.41	0.891-2.24	4.47	2.82-7.08
0	2	2	5	2.24	1.01-4.97	7.08	3.19-15.7
0	2	3	5	1.78	0.801-3.95	5.62	2.53-12.5
0	2	4	5	1.41	0.682-2.93	4.47	2.16-9.25
0	2	5	5	1.12	0.638-1.97	3.55	2.02-6.24
0	3	3	5	1.41	0.636-3.14	4.47	2.01-9.92
0	3	4	5	1.12	0.542-2.32	3.55	1.71-7.35
1	0	3	5	2.74	1.35-5.56	8.66	4.26-17.6
1	0	4	5	2.05	1.11-3.80	6.49	3.51-12.0
1	0	5	5	1.54	1.07-2.21	4.87	3.40-6.98
1	1	2	5	2.74	1.10-6.82	8.66	3.48-21.6
1	1	3	5	2.05	0.806-5.23	6.49	2.55-16.5
1	1	4	5	1.54	0.632-3.75	4.87	2.00-11.9
1	1	5	5	1.15	0.537-2.48	3.65	1.70-7.85
1	2	2	5	2.05	0.740-5.70	6.49	2.34-18.0
1	2	3	5	1.54	0.534-4.44	4.87	1.69-14.1
1	2	4	5	1.15	0.408-3.27	3.65	1.29-10.3
1	3	3	5	1.15	0.378-3.53	3.65	1.20-11.2
2	0	3	5	2.61	1.01-6.77	8.25	3.18-21.4
2	0	4	5	1.78	0.723-4.37	5.62	2.29-13.8
2	0	5	5	1.21	0.554-2.65	3.83	1.75-8.39
2	1	2	5	2.61	0.768-8.87	8.25	2.43-28.1
2	1	3	5	1.78	0.484-6.53	5.62	1.53-20.7
2	1	4	5	1.21	0.318-4.62	3.83	1.00-14.6
2	2	2	5	1.78	0.434-7.28	5.62	1.37-23.0
2	2	3	5	1.21	0.259-5.67	3.83	0.819-17.9
0	0	4	4	2.74	1.27-5.88	8.66	4.03-18.6
0	0	5	4	2.05	1.43-2.94	6.49	4.53-9.31
0	1	3	4	2.74	0.968-7.75	8.66	3.06-24.5
0	1	4	4	2.05	0.843-5.00	6.49	2.67-15.8
0	1	5	4	1.54	0.833-2.85	4.87	2.63-9.01
0	2	2	4	2.74	0.896-8.37	8.66	2.83-26.5
0	2	3	4	2.05	0.711-5.93	6.49	2.25-18.7
0	2	4	4	1.54	0.604-3.92	4.87	1.91-12.4
0	2	5	4	1.15	0.568-2.35	3.65	1.80-7.42
0	3	3	4	1.54	0.555-4.27	4.87	1.76-13.5
0	3	4	4	1.15	0.463-2.88	3.65	1.47-9.10
1	0	4	4	2.61	0.953-7.15	8.25	3.01-22.6
1	0	5	4	1.78	1.03-3.06	5.62	3.27-9.68
1	1	3	4	2.61	0.658-10.4	8.25	2.08-32.7
1	1	4	4	1.78	0.528-5.98	5.62	1.67-18.9
1	1	5	4	1.21	0.442-3.32	3.83	1.40-10.5

1	2	2	4	2.61	0.594-11.5	8.25	1.88-36.3
1	2	3	4	1.78	0.423-7.48	5.62	1.34-23.6
1	2	4	4	1.21	0.305-4.80	3.83	0.966-15.2
1	3	3	4	1.21	0.276-5.33	3.83	0.871-16.8
2	0	4	4	2.37	0.539-10.4	7.50	1.70-33.0
2	0	5	4	1.33	0.446-3.99	4.22	1.41-12.6
2	1	3	4	2.37	0.307-18.3	7.50	0.970-58.0
2	1	4	4	1.33	0.187-9.49	4.22	0.592-30.0
2	2	2	4	2.37	0.262-21.4	7.50	0.830-67.8
2	2	3	4	1.33	0.137-13.0	4.22	0.433-41.0
0	0	5	3	2.61	1.19-5.71	8.25	3.77-18.1
0	1	4	3	2.61	0.684-9.95	8.25	2.16-31.5
0	1	5	3	1.78	0.723-4.37	5.62	2.29-13.8
0	2	3	3	2.61	0.558-12.2	8.25	1.76-38.6
0	2	4	3	1.78	0.484-6.53	5.62	1.53-20.7
0	2	5	3	1.21	0.467-3.14	3.83	1.48-9.94
0	3	3	3	1.78	0.434-7.28	5.62	1.37-23.0
0	3	4	3	1.21	0.356-4.12	3.83	1.13-13.0
1	0	5	3	2.37	0.793-7.10	7.50	2.51-22.4
1	1	4	3	2.37	0.333-16.9	7.50	1.05-53.4
1	1	5	3	1.33	0.303-5.87	4.22	0.958-18.6
1	2	3	3	2.37	0.244-23.1	7.50	0.771-73.0
1	2	4	3	1.33	0.172-10.3	4.22	0.545-32.6
1	3	3	3	1.33	0.148-12.1	4.22	0.467-38.1

## 1-B.2 寇氏 (Korbor) 法

2.1 预试验：除另有要求外，一般应在预试中求得动物全死亡或90%以上死亡的剂量和动物不死亡或10%以下死亡的剂量，分别作为正式试验的最高与最低剂量。

2.2 动物数：除另有要求外，一般设5~10个剂量组，每组6~10只动物为宜。

2.3 剂量：将由预试验得出的最高、最低剂量换算为常用对数，然后将最高、最低剂量的对数差，按所需要的组数，分为几个对数等距（或不等距）的剂量组。

### 2.4 试验结果的计算与统计

#### 2.4.1 列试验数据及其计算表

包括各组剂量(mg/kg bw, g/kg bw)，剂量对数( $X$ )，动物数( $n$ )，动物死亡数( $r$ )，动物死亡百分比( $p$ ，以小数表示)，以及统计公式中要求的其它计算数据项目。

#### 2.4.2 LD<sub>50</sub>的计算公式

根据试验条件及试验结果，可分别选用下列三个公式中的一个，求出log LD<sub>50</sub>，再查其自然数，即LD<sub>50</sub>(mg/kg bw, g/kg bw)。

2.4.2.1 按本试验设计得出的任何结果, 均可用式(1):

$$\log LD_{50} = \sum 1/2 \times (X_i + X_{i+1}) (P_{i+1} - P_i) \dots \dots \dots (1)$$

式中:  $X_i$  与  $X_{i+1}$  及  $P_{i+1}$  与  $P_i$  分别为相邻两组的剂量对数以及动物死亡百分比。  
2.4.2.2 按本试验设计且各组剂量对数等距时, 可用式(2):

$$\log LD_{50} = XK - 1/2 \times (P_i + P_{i+1}) \dots \dots \dots (2)$$

式中:  $XK$  ... 最高剂量对数, 其它同式(1)。

2.4.2.3 若试验条件同2.4.2.2 且最高、最低剂量组动物死亡百分比分别为100(全死)和0(全不死时), 则可用简便计算式(3)。

$$\log LD_{50} = XK - d (\sum P - 0.5) \dots \dots \dots (3)$$

式中:  $\sum P$  ... 各组动物死亡百分比之和, 其它同式(2)。

2.4.3 标准误与95%可信限

2.4.3.1  $\log LD_{50}$  的标准误 ( $S$ )

$$S \log LD_{50} = d \{ [\sum P_i (i - P_i)] / n \}^{1/2} \dots \dots \dots (4)$$

2.4.3.2 95%可信限 ( $X$ )

$$X = \log^{-1} (\log LD_{50} \pm 1.96 \cdot S \log LD_{50}) \dots \dots \dots (5)$$

此法易于了解, 计算简便, 可信限不大, 结果可靠, 特别是在试验前对受试样品的急性毒性程度了解不多时, 尤为适用。

### 1-B-3 概率单位-对数图解法

3.1 预试验: 以每组2~3只动物找出全死和全不死的剂量。

3.2 动物数: 一般每组不少于10只, 各组动物数量不一定要相等。

3.3 剂量及分组: 一般在预试验中得到的两个剂量组之间拟出等比的六个剂量组或更多的组。此法不要求剂量组间呈等比关系, 但等比可使各点距离相等, 有利于作图。

3.4 作图计算

3.4.1 根据各剂量组动物死亡率, 从附录1-B-3中查各组的概率单位。因死亡率为0%和100%的概率单位, 与所试动物数有关, 故需另在附录1-B-4中查找。

例如: 对死亡率为45%的概率单位, 可查附录1-B-3。先在表的左侧纵标目上找到40, 而后在表的上行横标目处找到5, 两者交叉点处的4.87, 即为45%的概率单位。

又如: 某组用10只实验动物, 如果全部存活(死亡率为0%), 查附录1-B-4, 其概率单位为3.04。

3.4.2 用方格纸绘散点图, 横轴表示剂量的对数值( $X$ ), 纵轴为概率单位值( $Y$ ), 将各组数值点在图上。

3.4.3 按各点的分布趋势，用直尺绘出一条最适合于各点的直线，使线上方的点到线的总距离与线下方的点到线的总距离相近，此线应尽量靠近概率单位为5的点及附近的点。

3.4.4 查出求概率单位5处的剂量对数，其反对数即为LD<sub>50</sub>。

3.4.5 按下列公式计算LD<sub>50</sub>的95%可信限。

$$S = (X_2 - X_1) / (Y_2 - Y_1)$$

$$S_m = S / (N' / 2)^{-1/2}$$

$$LD_{50} \text{对数值的95\%可信限} = \log LD_{50} \pm 1.96 S_m$$

(上式结果，经反对数变换后，可得LD<sub>50</sub>的95%可信限)

[S<sub>m</sub>为LD<sub>50</sub>的标准误。S为标准差。X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>分别为机率单位等于4(Y<sub>1</sub>)和6(Y<sub>2</sub>)时相应的剂量对数值。N'为Y<sub>1</sub>(=4)及Y<sub>2</sub>(=6)相应的死亡率间所用的动物数]。

#### 1-B-4 最大限量试验：

4.1 适宜条件：有关资料显示毒性极小的或未显示毒性的受试样品，给予动物最大使用浓度和最大灌胃容量的受试样品时，仍不出现死亡。

4.2 动物数：至少雌、雄各5只。

4.3 剂量：受试样品最大使用浓度和灌胃容量（一个剂量组）。

4.4 方法：动物购买后观察3-5天，给予最大使用浓度和最大灌胃容量的受试样品（一日内1次或多次给予，一日内最多不超过3次），连续观察14天，动物不出现死亡，则认为受试样品对某种动物的经口急性毒性剂量大于某一数值(mg/kg bw)。

### 附录 1-B-3

#### 1-B-3 反应率—概率单位表

反应率	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.60	3.66
10	3.72	3.77	3.83	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.09	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.62	4.64	4.67	4.70	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.93	4.95	4.98
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.40	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.56	6.65	6.75	6.88	7.05	7.33

## 附录 1-B-4

### 1-B-4 相当于反应率0%及100%的概率单位

每组动物数	反 应 率		每组动物数	反 应 率	
	0%	100%		0%	100%
2	3.85	6.15	12	2.97	7.03
3	3.62	6.38	13	2.93	7.07
4	3.47	6.53	14	2.90	7.10
5	3.36	6.64	15	2.87	7.13
6	3.27	6.73	16	2.85	7.15
7	3.20	6.80	17	3.82	7.18
8	3.13	6.87	18	2.80	7.20
9	3.09	6.91	19	2.78	7.22
10	3.04	6.96	20	2.76	7.24
11	3.00	7.00			

#### 1-B.5 上-下法 (Up-and-Down Procedure UDP)

5.1 上-下法是所需实验动物数量最少的急性毒性试验方法。此方法适用于1或2天内引起动物死亡的受试样品。5天以上引起动物死亡的受试样品不适用此方法。因严重的刺激性和腐蚀性引起明显疼痛的受试样品剂量不需进行该试验。濒死的、有极其痛苦症状的动物要被处死，对试验结果的解释时，这些动物要与试验中死亡的动物同样被考虑进去。

#### 5.2 试验方法

##### 5.2.1 最大限量试验

按 5000mg/kg bw 剂量给一只动物染毒，如动物死亡，用后述的主试验测 LD<sub>50</sub>。如动物存活，增加两只动物继续染毒。如两只动物均存活，LD<sub>50</sub> 高于限度剂量且试验终止（观察 14 天不进一步染毒）。

如果一只或两只动物死亡，则另增加两只动物染毒，一次一只。如果试验中一只动物出现未预料到的延迟死亡，而其它动物存活，恰当的方法是停止染毒并观察所有动物在观察期中是否仍会出现死亡。结果评价如下（O=存活，X=死亡，U=不必）

当 3 只或以上的动物死亡时，LD<sub>50</sub> 小于 5000mg/kg bw:

OXOX  
 OXXX  
 OXXOX  
 OXXX

当 3 只或 3 只以上动物存活时，LD<sub>50</sub> 大于 5000mg/kg bw:

OOO  
 OXOXO  
 OXOO  
 OXXXO  
 OOXO  
 OXXOO

## 5.2.2 主试验

### 5.2.2.1 试验方法

单个动物通常在 48h 时间间隔被连续染毒。然而，两次染毒的时间间隔是由毒性作用的时间、耐受时间和毒性反应的严重性来决定。直到已染毒的动物确信存活，才能对动物进行下一剂量染毒。时间间隔可适当调整。

第一只动物的染毒剂量应在预计的  $LD_{50}$  之下。如此动物存活，第二只动物接受更高一级剂量。如果第一只动物死亡或出现濒死，第二只动物接受更低一级剂量。通常选择的剂量递增系数为 3.2 (3.2 为估计的剂量-反应曲线斜率等于 2 的倒数  $1/2$  的反对数)，此系数在整个试验过程中是固定不变的。没有受试样品剂量-反应曲线斜率的信息时，使用 3.2 为剂量递增系数。使用 3.2 为剂量递增系数时，剂量序列为 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1750, 5000。如果没有受试样品致死性资料时，起始染毒剂量为 175mg/kg bw。如果动物对受试样品的剂量-反应曲线斜率小于 2，在开始试验前，剂量递增系数应增加一个等级；反之应降低一个等级。(附录 1-B-5 为起始剂量为 0.175mg/kg bw、斜率从 1-8 的递增剂量表)。

染毒继续与否取决于所有动物固定时间间隔 (48h) 的结果。当下列终止标准中一个首先被满足时试验终止。

- a. 上限剂量 3 个连续的动物存活。
- b. 在试验的任何 6 个连续的动物中有 5 个出现相反反应。
- c. 首对相反反应出现后至少有 4 只动物进行试验并指定的可能性比例超过标准值。

濒死动物与在试验中死亡的动物同样考虑。如果一个动物在研究中出现未预料的延迟死亡，且在此剂量或剂量之上的其它动物存活，应当停止染毒并观察所有已染毒动物在观察期中是否仍有死亡。如果存活的动物随后也出现死亡，所用的剂量水平超过  $LD_{50}$ ，最好是重新选择恰当的方法进行研究。如果在死亡的动物剂量水平或剂量之上后来的动物都存活，没有必要改变剂量递进系数，因为现在已死亡动物的信息按照比后来存活的动物低一个剂量级的剂量水平纳入计算。 $LD_{50}$  将下移。

因  $LD_{50}$  和斜率的结合，在出现相反结果后 4-6 个动物满足终止标准。在某些情况下，对剂量-反应曲线斜率低的化学品，需要增加动物到总数 15 只。

### 5.2.2.2 主试验 $LD_{50}$ 和可信限区间的计算

主试验  $LD_{50}$  和可信限区间的计算可以利用 OECD 推荐的 AOT425 计算机程序包完成。AOT425 计算机程序包可直接从 OECD 和 EPA 网页上下载。

试验前应确定选用的 Sigma 值、是最大限量试验还是主试验及最大限量值，每次试验的剂量、结果均应及时输入 AOT425 程序，程序将自动给出下次试验的剂量及是否可以停止试验，并计算出  $LD_{50}$  和 95%可信限区间。

### 附录1-B-5

#### 1-B-5 上-下法不同斜率各剂量表 (mg/kg bw)

斜率=	1	2	3	4	5	6	7	8
	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*
					0.275	0.26	0.24	0.23
				0.31			0.34	0.31
			0.375			0.375		
		0.55		0.55	0.44	0.55	0.47	0.55
					0.69		0.65	0.73
			0.81			0.82		
				0.99			0.91	0.97
					1.09	1.2		
	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.26	1.29
							1.75	1.75
					2.75	2.6	2.4	2.3
				3.1			3.4	3.1
			3.75			3.75		
					4.4			4.1
		5.5		5.5		5.5	4.7	5.5
					6.9		6.5	7.3
			8.1			8.2		
				9.9			9.1	9.7
					10.9	12		
	17..5	17..5	17..5	17..5	17..5	17..5	12.6	12.9
							17..5	17..5
					27.5	26	24	23
				31			34	31
			37.5			37.5		
					44			41
		55		55		55	47	55
					69		65	73
			81			82		
				99			91	97
					109	120		
	175	175	175	175	175	175	126	129
							175	175
					275	260	240	230
				310			340	310
			375			375		
					440			410
		550		550		550	470	550
					690		650	730
			810			820		
				990			910	970
					1090	1200		
	1750	1750	1750	1750	1750	1750	1260	1290
							1750	1750
					2750	2600	2400	2300
				3100				3100
						3750	3400	
								4100
	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000

\*如果需要更低的剂量，应继续降低剂量级数

## 附录 1-C

**表1-C 急性毒性分级标准**

毒性指标	剧毒	高毒	中等毒	低毒
经口LD <sub>50</sub> (mg/kg)	<5	5~	50~	>500
吸入LC <sub>50</sub> (mg/m <sup>3</sup> )	<20	20~	200~	>2000
经皮LD <sub>50</sub> (mg/kg)	<20	20~	200~	>2000

注：引用《工业化学品毒性鉴定规范及实验方法》

## 附录 1-D

**表1-D 急性毒性试验记录表**

浓度 (剂量) mg/m <sup>3</sup> (mg/kg)	动物 性别	动物 编号	动物体重 (g)			染毒方式	中毒 症状	中毒症状出现 和消失时间	死亡 时间	解剖所见	LD <sub>50</sub> (LC <sub>50</sub> ) 95%可信区间
			0d	7d	14d						

## 附录 1-E

### 实验动物体表面积估算方法

#### 1-E-1 家兔

$S=K \cdot m^{2/3}$  式中: S-体表面积,  $\text{cm}^2$ ; K-常数, 一般成年家兔为 10;

m-动物体重, g。例:

体重 2kg 成年家兔体表面积:  $S=10 \times 2000^{2/3}$

$\lg S = \lg 10 + 2/3 \lg 2000 = 1 + 0.6667 \times 3.3010 = 1 + 2.2008 = 3.2008$

查反对数表:  $S=1588\text{cm}^2$

1-E-1		家兔体表面积 ( $\text{cm}^2$ )				
体重 (g)	0	2	4	6	8	
2000	1587.40	1597.96	1608.49	1618.99	1629.45	
2100	1639.88	1650.27	1660.64	1670.97	1681.27	
2200	1691.53	1701.77	1711.97	1722.15	1732.30	
2300	1742.41	1752.50	1762.56	1772.58	1782.58	
2400	1792.56	1802.50	1812.42	1822.31	1832.17	
2500	1842.01	1851.82	1861.61	1871.37	1881.10	
2600	1890.81	1900.49	1911.15	1919.79	1929.40	
2700	1938.99	1948.55	1958.09	1967.61	1977.10	
2800	1986.57	1996.02	2005.45	2014.85	2024.23	
2900	2033.59	2042.93	2052.25	2061.55	2072.82	
3000	2080.08	2089.31	2098.53	2107.72	2116.89	

#### 1-E-2 豚鼠

$S=K \cdot m^{2/3}$  式中: S-体表面积,  $\text{cm}^2$ ; K-常数,  $K=9.26$ ; m-动物体重, g。

例: 体重 438g 豚鼠的体表面积:  $S=9.26 \times 438^{2/3}$

$\lg S = \lg 9.26 + 2/3 \lg 438 = 0.9666 + 2/3 \times 0.8805 = 0.9666 + 1.7610 = 2.7276$

查反对数表:  $S=534\text{cm}^2$

1-E-2		豚鼠体表面积 ( $\text{cm}^2$ )				
体重 (g)	0	2	4	6	8	
350	459.89	461.64	463.38	465.13	466.87	
360	468.61	470.34	472.07	473.80	475.52	
370	477.24	478.96	480.68	482.39	484.10	
380	485.81	487.51	489.21	490.91	492.60	
390	494.29	495.98	497.67	499.35	501.03	
400	502.71	504.38	506.05	507.72	509.39	
410	511.05	512.71	514.37	516.02	517.68	
420	519.33	520.97	522.62	524.26	525.90	
430	527.54	529.17	530.80	532.43	534.06	
440	535.68	537.31	538.93	540.54	542.16	
450	543.77	545.38	546.99	548.59	550.20	

### 1-E-3 大鼠

$S=K \cdot m^{2/3}$  式中: S-体表面积,  $\text{cm}^2$ ; K-常数,  $K=0.0913$ ; m-动物体重, g。

例: 体重 200g 大鼠的体表面积:  $S=0.0913 \times (0.2)^{2/3}$

$$\lg S = \lg 0.0913 + 2/3 \lg 0.2 = (-1.0395) + 2/3 \times (-0.6990)$$

$$= (-1.0395) + (-0.4660) = -1.5055$$

查反对数表:  $S=312\text{cm}^2$

1-E-3

大鼠体表面积 ( $\text{cm}^2$ )

体重 (g)	0	2	4	6	8
200	31.22	31.43	31.63	31.84	32.05
210	32.25	32.46	32.66	32.86	33.07
220	33.27	33.47	33.67	33.87	34.07
230	34.27	34.47	34.66	34.86	35.06
240	35.25	35.45	35.65	35.84	36.03
250	36.23	36.42	36.61	36.80	37.00
260	37.19	37.38	37.57	37.76	37.95
270	38.13	38.32	38.51	38.70	38.88
280	39.07	39.26	39.44	39.63	39.81
290	40.00	40.18	40.36	40.55	40.73
300	40.91	41.09	41.27	41.45	41.63

## 第二阶段试验

# 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验 (Ames 试验)

## *Salmonella Typhimurium* Reverse Mutation Assay

### 1 范围

本规范规定了鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验 (Ames 试验) 的基本原则、要求和方

本规范适用于检测化学品 (有杀菌作用的除外) 的致突变性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guideline for testing of chemicals (NO. 471, 1997)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.5100, 1998)

### 3 试验目的

检测化学物质的诱变性, 预测其遗传危害和潜在致癌作用的可能性。

### 4 定义

4.1 回复突变 (Reverse Mutation): 细菌在化学突变物作用下由营养缺陷型回变到野生型。

4.2 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验 (*Salmonella Typhimurium* Reverse Mutation Assay): 利用一组鼠伤寒沙门氏组氨酸缺陷型试验菌株测定引起沙门氏菌碱基置换或移码突变的化学物质所诱发的组氨酸缺陷型 ( $his^-$ ) 回变到野生型 ( $his^+$ ) 的试验方法。

### 5 试验基本原理

鼠伤寒沙门氏组氨酸营养缺陷型菌株不能合成组氨酸, 故在缺乏组氨酸的培养基上, 仅少数自发回复突变的细菌生长。假如有致突变物存在, 则营养缺陷型的细菌回复突变成野生型, 因此能生长形成菌落, 据此判断受试样品是否为致突变物。

某些致突变物需要代谢活化后才能引起回复突变, 故需加入经诱导剂诱导的大鼠肝制备的  $S_9$  混合液。

### 6 试验方法

#### 6.1 样品处理

选定受试样品的合适溶剂, 首选无菌双蒸水作为溶剂, 如果不溶于水的或水

溶性低的化学物，首选二甲基亚砷。

## 6.2 剂量设计

决定受试样品最高剂量的标准是对细菌的毒性及其溶解度。自发回变数的减少，背景变得清晰或被处理的培养物细菌存活数减少，都是毒性的标志。每一受试样品检测时至少设五个剂量组，可按 5~5000  $\mu\text{g}/\text{皿}$  剂量设定，也可根据预试验结果按等比组距设定需要的浓度范围。

## 6.3 试验方法

### 6.3.1 配制培养基和试剂

#### 6.3.1.1 20%葡萄糖溶液

称取 200g 葡萄糖，加入蒸馏水至 1000ml，0.068MPa 高压灭菌 20min。贮于 4℃ 冰箱。

#### 6.3.1.2 0.5mmol/L 组氨酸—0.5mmol/L 生物素溶液

成分： D-生物素（分子量 244）	122mg
L-组氨酸(分子量 155)	78mg
无菌蒸馏水	至 1000ml

不宜进行高压灭菌处理，使用无菌玻璃器皿配制。贮于 4℃ 冰箱。

#### 6.3.1.3 代谢活化系统 肝混合功能氧化酶混合液（S<sub>9</sub> 混合液），配制方法见附录 2-A

#### 6.3.1.4 盐溶液（1.65mol/L KCl+0.4mol/L MgCl<sub>2</sub>）

成分：氯化钾(KCl)	61.5g
氯化镁(MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	40.7g
蒸馏水	至 500ml

0.103MPa 高压灭菌 30min。贮于 4℃ 冰箱。

#### 6.3.1.5 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液（PH7.4）

成分：磷酸二氢钠（NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O）	2.965g
磷酸氢二钠（Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O）	29.015g
蒸馏水	至 500ml

0.103MPa 高压灭菌 30min。贮于 4℃ 冰箱。

#### 6.3.1.6 0.15mol/L 氯化钾溶液

精确称取氯化钾 11.18g，用蒸馏水稀释至 1000ml，0.103MPa 高压灭菌 30min。贮于 4℃ 冰箱。

#### 6.3.1.7 氨苄青霉素碱性溶液（8mg/ml）

称取氨苄青霉素 80mg，加入 0.02mol/L NaOH 溶液 10ml。

#### 6.3.1.8 0.1%结晶紫溶液

称取结晶紫 10mg，加 10ml 无菌水。

#### 6.3.1.9 四环素溶液 (8mg/ml)

称取四环素 40mg，加入 0.02mol/L HCl 溶液 5ml。

#### 6.3.1.10 溶解或稀释化学物质常用溶剂： 蒸馏水、二甲基亚砜 (DMSO)

#### 6.3.1.11 常用阳性对照及参考剂量：

柔毛霉素	60 $\mu$ g/ml
叠氮化钠 (NaN <sub>3</sub> )	50 $\mu$ g/ml
2-氨基苄 (2-FA)	1000 $\mu$ g/ml
敌克松 (dexon)	1000 $\mu$ g/ml
丝裂霉素 C (mytomycin C, MMC)	10ug/ml

#### 6.3.1.12 Vogel-Bonner (V-B) 培养基 E

成分： 枸橼酸 (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·H <sub>2</sub> O)	100g
磷酸氢二钾 (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	500g
磷酸氢氨钠 (NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	175g
硫酸镁 (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	10g
蒸馏水	至 1000ml

先将前三种成分加热溶解后，再将溶解的硫酸镁缓缓倒入容量瓶中，加蒸馏水稀释至 1000ml，分装后 0.103MPa 高压灭菌 30min。贮于 4℃ 冰箱。

#### 6.3.1.13 顶层培养基

成分： 琼脂粉	1.2g
氯化钠	1.0g
蒸馏水	至 200ml

0.103MPa 高压灭菌 30min 后，加入 0.5mmol/L 组氨酸-0.5mmol/L 生物素溶液。

#### 6.3.1.14 底层培养基

成分： 琼脂粉	7.5g
蒸馏水	480ml
V-B 培养基 E	10ml
20%葡萄糖溶液	10ml

先将前两种成分于 0.103MPa 高压灭菌 30min 后，再加入后两种成分，充分混匀倒底层平板。按每皿 25~30ml 倒平皿，冷凝固化后倒置于 37℃ 培养箱中 24h，备用。

### 6.3.1.15 肉汤培养基

成分：	牛肉膏	2.5g
	胰 胨	5.0g
	磷酸氢二钾 (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.0g
	蒸馏水	至 500ml

将上述成分混合后，于 0.103MPa 高压灭菌 30min。贮于 4℃ 冰箱。

### 6.3.1.16 营养琼脂平板

成分：	琼脂粉	7.5g
	营养肉汤培养基	500ml

0.103MPa 高压灭菌 30min 后，倒斜面或平板。

## 6.4 菌株

一般使用鼠伤寒沙门氏杆菌 TA97a 或 TA97、TA98、TA100、TA102 菌株，特殊情况下选用 TA1535、TA1537 等菌株。

### 6.4.1 分离

将新获得的或经长期保存的试验菌株分别划线接种于主平板，37℃ 培养 18-24h。

### 6.4.2 增菌

用接种环分别刮取主平板中分离好的单个菌落分别接种于 5ml 新鲜营养肉汤内增菌，37℃ 振荡（100 次/min）培养 10h。该菌株培养物应每毫升不少于  $1\sim 2\times 10^9$  活菌数。

### 6.4.3 保存

取增菌液 0.8ml，加高压灭菌 DMSO 0.07ml 置于 2ml 已灭菌、耐低温的带塞小塑料试管内，冷冻后贮存于盛有液氮的液氮罐内冷藏备用，置 4℃ 冰箱可保存一个月。

### 6.4.4 菌株鉴定

新获得的或长期保存的菌种，在试验前必须进行菌株的生物特性鉴定，菌株鉴定的判断标准如表 1 所示。

表 1 试验菌株鉴定的判断标准

菌株	组氨酸缺陷	脂多糖屏障缺陷	氨苄青霉素抗性	切除修复缺陷	四环素抗性	自发回变菌落数
TA97	+	+	+	+	-	90~180
TA98	+	+	+	+	-	30~50
TA100	+	+	+	+	-	100~200
TA102	+	+	+	-	+	240~320
注	“+”表示需要组氨酸	“+”表示具有 rfa 突变	“+”表示具有 R 因子	“+”表示具有 $\Delta$ uvrB 突变	“+”表示具有 pAQ1 质粒	*在体外代谢活化条件下自发回变菌落数略增

注：其他菌株生物特性鉴定参照有关文献。

#### 6.4.4.1 组氨酸依赖性

组氨酸营养缺陷型菌株只能在有组氨酸的营养培养基中生长,在不加组氨酸的培养基上则不生长。

将组氨酸营养缺陷型菌株分别用划线法接种于含有和不含有组氨酸的培养基中,37℃培养 24h,观察细菌生长情况。组氨酸缺陷型菌株在含组氨酸平板上生长,而在无组氨酸平板上则不能生长。

#### 6.4.4.2 脂多糖屏障丢失

具有深粗糙(rfa)的菌株,其表面一层脂多糖屏障缺损,因此一些大分子物质如结晶紫能穿透菌膜进入菌体,从而抑制其生长,而野生型菌株则不受其影响。

取 0.1ml 营养牛肉汤增菌液加到 2ml 45~46℃ 已融化的顶层琼脂中,摇匀,立即倒在有营养肉汤的底层琼脂培养基上,使其均匀分布。待琼脂凝固后,在平皿中央放一直径为 6mm 的圆滤纸上,然后将结晶紫水溶液(1mg/ml)10 μl 滴在滤纸上。37℃培养 24h。假若待测菌在滤纸片周围有清晰透明的抑菌圈,即表示结晶紫的分子已进入细菌体内,说明该待测菌株具有 rfa 突变。

#### 6.4.4.3 紫外线损伤修复缺陷

具有紫外线损伤修复缺陷(ΔuvrB 突变)的菌株对紫外线敏感,当受到紫外线照射后,不能生长,而具有野生型切除修复酶的菌株,则能照常生长。

在营养牛肉汤琼脂培养基平皿的底部背面,用红笔划一直线,在培养基上沿红线用划线法接种细菌后,用黑纸覆盖平皿的 1/2,其余部分用紫外线灯照射(15W),距离 33cm,照射 8 秒钟。紫外线照射部分不能生长,而黑纸覆盖的那一半则能生长。具有 ΔuvrB 突变的菌株对紫外线敏感,经辐射后细菌不生长,而具有完整的切除修复系统的菌株,则照常生长。

#### 6.4.4.4 抗氨苄青霉素 R 因子鉴定

含 R 因子的试验菌株对氨苄青霉素有抗性。因为 R 因子不太稳定,容易丢失,故用氨苄青霉素确定该质粒存在与否。

在营养牛肉汤琼脂平皿背面中线,用红笔划一直线,再用微量注射器在培养基上沿红线涂 10 μl 氨苄青霉素,待其干后与红线垂直方向划线接种细菌,37℃培养 24h。若待测菌在涂有氨苄青霉素的部位生长,说明该菌具有抗氨苄青霉素作用,表示含有 R 因子,仍能生长。否则表示待测菌不含 R 因子或 R 因子丢失。

#### 6.4.4.5 抗四环素 PAQ1 质粒鉴定

含 PAQ1 质粒的试验菌株对四环素有抗性。因为 PAQ1 质粒不太稳定,容易丢失,故用四环素确定该质粒存在与否。

在营养牛肉汤琼脂平皿背面中线,用红笔划一直线,再用微量注射器在培养基上沿红线涂 10 μl 四环素,待其干后与红线垂直方向划线接种细菌,37℃培养

24h。若待测菌在涂有四环素的部位生长，说明该菌具有抗四环素作用，表示含有 PAQ1 质粒，仍能生长。否则表示待测菌不含 PAQ1 质粒或 PAQ1 质粒丢失。

#### 6.4.4.6 自发回变

每一种试验菌株都以一定的频率自发地产生回变，称为自发回变。

将待测菌株增菌液 0.1ml 加到 2ml 含组氨酸-生物素的顶层琼脂培养基的试管内，混匀后铺到底层琼脂平板上，待琼脂固化后，置 37℃ 培养箱中孵育 48h 后记数每皿回变菌落数。每种标准测试菌株的自发回变菌落数应符合表 2 要求。经体外代谢活化后的自发回变菌落数，要比直接作用下的略高。

表 2 测试菌株的回变性

诱变剂	剂量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	S <sub>9</sub>	TA97	TA98	TA100	TA102
柔毛霉素	6.0	-	124	3123	47	592
叠氮化钠	1.5	-	76	3	3000	188
ICR-191	1.0	-	1640	63	185	0
链霉黑素	0.25	-	inh	inh	inh	2230
丝裂霉素 C	0.5	-	inh	inh	inh	2772
2,4,7-三硝基-9-芴酮	0.20	-	8377	8244	400	16
4-硝基-0-次苯二胺	20	-	2160	1599	798	0
4-硝基喹啉-N-氧化物	0.5	-	528	292	4220	287
甲基磺酸甲酯	1.0	-	174	23	2730	6586
2-氨基芴	10	+	1742	6194	3026	261
苯并(a)芘	1.0	+	337	143	937	255

注: inh 表示抑菌. 表中数值均已扣除溶剂对照的回变菌落数; 其他菌株对阳性物的反应参照有关文献。

### 6.5 试验方法

#### 6.5.1 平板掺入法

6.5.1.1 倒平板: 先将底层培养基在 45℃ 时倒平板, 冷却凝固后放入 37℃ 培养箱内 24h。无菌落生长方可使用。

6.5.1.2 接种: 将含 0.5mmol/L 组氨酸-0.5mmol/L 生物素溶液的顶层琼脂培养基 2.0ml 分装于试管中, 45℃ 水浴中保温, 然后每管依次加入试验菌株增菌液 0.1ml, 受试样品溶液 0.1ml 和 S<sub>9</sub> 混合液 0.5ml (需代谢活化时), 充分混匀, 迅速倾入底层琼脂平板上, 转动平板, 使之分布均匀。水平放置待冷凝固后, 倒置于 37℃ 培养箱里孵育 48h。每受试样品检测皿加或不加 S<sub>9</sub> 混合液均作三个平行皿。

6.5.1.3 对照: 每一受试样品检测时必须设定阳性物对照, 操作过程将加入受试样品溶液改换为阳性物, 其它操作完全相同; 同时, 每批受试样品检测必须设定阴性对照, 观察自发回变菌落数。操作过程中不加入受试样品, 其余操作同

6.5.1.2。

### 6.5.2 结果统计与评价

6.5.2.1 数据处理:记录受试样品各剂量组、空白对照组自发回变、溶剂对照组及阳性对照组的每皿回变菌落数,并求平均值和标准差(见表3)。

**表3 Ames 试验菌株的回变结果(平均值±标准差)**

组别	剂量 (mg or $\mu$ l/ 皿)	菌株 A		菌株 B		菌株 C		菌株 D	
		-(S <sub>9</sub> )	+(S <sub>9</sub> )						
受试样品									
自发回变									
溶剂对照									
阳性对照									

### 6.5.2.2 评价原则

6.5.2.2.1 受试样品的回变菌落数超过自发回变菌落数 2 倍以上,并呈剂量-效应关系判定检测结果为阳性。

6.5.2.2.2 受试样品经四个试验菌株检测后,只要有一个试验菌株,无论在加 S<sub>9</sub>或不加 S<sub>9</sub>条件下为阳性者时,均可判定该受试样品 Ames 试验结果为阳性。

6.5.2.2.3 四个试验菌株在加 S<sub>9</sub>和不加 S<sub>9</sub>条件下均为阴性,且重复试验结果一致时,则可判定受试样品 Ames 试验结果为阴性。

## 7 鉴定报告

除总则中规定的一般项目外,鉴定报告还应包括以下内容:

7.1 试验菌株;

7.2 代谢活化系统及所用诱导剂;

7.3 试验方法、操作步骤、受试样品检测剂量分组及阴性、阳性对照名称;

7.4 阳性结果评价原则 以列表方式报告受试样品的 Aems 试验结果;

7.5 结论。

## 8 试验结果的解释

阳性结果表明受试样品在本试验条件下具有致基因突变作用。

阴性结果表明在本试验条件下受试样品不具有致基因突变作用。

# 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

## *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test

### 1 范围

本规范规定了体外哺乳动物细胞染色体畸变试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品可能引起的细胞遗传学毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No.473, 1983)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.5375,1998)

### 3 试验目的

通过检测受试样品诱发体外培养的哺乳动物细胞染色体畸变的能力,从而评价受试样品的致突变性及其强度。

### 4 定义

4.1 染色体型畸变 (Chromosome-type Aberration): 染色体结构损伤,表现为在两个染色单体的相同位点均出现断裂或断裂重组等改变。

4.2 染色单体型畸变 (Chromatid-type Aberration): 染色体结构损伤,表现为染色单体断裂或染色单体断裂重组等改变。

4.3 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。

4.4 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。

4.5 有丝分裂指数 (Mitotic Index): 中期相细胞数与所观察的细胞总数之比值,是一项反映细胞增殖程度的指标。

## 5 试验基本原则

在加入或不加入代谢活化系统的条件下,使培养的哺乳动物细胞暴露于受试样品中。用中期分裂相阻断剂(如秋水仙素)处理,使细胞停止在中期分裂相,随后收获细胞、制片、染色、分析染色体畸变。

## 6 试验方法

### 6.1 受试样品

固体受试样品应溶解或悬浮于适合的溶剂中,并稀释至一定浓度。液体受试样品可直接使用或予以稀释。受试样品应在使用前新鲜配制,否则必须证实储存不影响其稳定性。

### 6.2 剂量水平

受试样品至少应取 3 个检测剂量,检测范围建议覆盖两个 10 倍稀释系列。对有细胞毒性受试样品,其剂量范围应包括从最大毒性至几乎无毒性;当收获细胞时,最高剂量应能明显减少细胞计数或有丝分裂指数(均应大于 50%);对无细胞毒性或细胞毒性很小的化合物,最高剂量应达到 5 $\mu$ l/ml, 5mg/ml 或 0.01M。应在预试验中确定细胞毒性和溶解度。测定细胞毒性可使用指示细胞完整性和生长情况的指标,如相对集落形成率或相对细胞生长率等。应在 S<sub>0</sub> 系统存在或不存在的条件下测定细胞毒性。对于相对不溶解的物质,当达到不溶解浓度时仍无毒性,则最高剂量应是在最终培养液中溶解度限值以上的一个浓度。在某些情况下,应使用一个以上可见沉淀的浓度,溶解性可用肉眼鉴别,但沉淀不能影响观察。

### 6.3 对照组

#### 6.3.1 阳性对照

可根据受试样品的性质和结构选择适宜的阳性对照物,应是已知的断裂剂,能引起可检出的、并可重复的阳性结果。当不存在外源性代谢活化系统时,可使用的阳性对照物有甲磺酸甲酯(methyl methanesulphonate, MMS)、甲磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate, EMS)、丝裂霉素 C(mytomycin C)、乙基亚硝基脲(ethyl nitrosourea, ENU)、硝基喹啉-N-氧化物(4-nitroquinoline-N-oxide)等。当存在外源性活化系统时,可使用的阳性对照物有苯并(a)芘(benzo(a)pyrene, BaP)、环磷酰胺(cyclophosphamide)等。

### 6.3.2 阴性对照

6.3.2.1 赋形剂对照:赋形剂应是非致突变物,不与受试样品发生化学反应,不影响细胞存活和  $S_9$  活性。首选赋形剂是水或水溶性溶剂,亦可使用二甲基亚砜(DMSO),但浓度不应大于 0.5%。

6.3.2.2 空白对照:如果没有文献资料或历史资料证实所用赋形剂无致突变作用时应设空白对照。

6.4 细胞株:可选用中国地鼠肺(CHL)细胞株或卵巢(CHO)细胞株、人或其它哺乳动物外周血淋巴细胞(lymphocyte)。一般推荐使用中国地鼠肺(CHL)细胞株。

### 6.5 试剂配制

#### 6.5.1 培养液 MEM (Eagle)

加入非必需氨基酸和抗菌素(青霉素按 100IU/ml、链霉素 100 $\mu$ g /ml),胎牛血清或小牛血清按 10%加入。也可选用其它合适的培养液。

#### 6.5.2 代谢活化系统

肝混合功能氧化酶混合液( $S_9$ 混合液),配制方法见附件 2-A。

#### 6.5.3 0.04%秋水仙素溶液

取 40mg 秋水仙素溶解于 100ml 无菌 0.85%氯化钠溶液中,过滤除菌。

#### 6.5.4 0.075mol/L 氯化钾溶液

#### 6.5.5 固定液

甲醇:冰醋酸=3:1,临用前配制。

#### 6.5.6 姬姆萨染液

取姬姆萨染料 3.8g,置玛瑙乳钵中,加少量甲醇研磨。逐渐加甲醇至 375ml,待完全溶解后,再加 125ml 甘油,放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中保温 48h。保温期间振摇数次,使充分溶解。取出过滤,2 周后使用,作为姬姆萨染液原液。使用时,取 1 份姬姆萨染液原液,与 9 份 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.8)混合,配成其应用液。

磷酸盐缓冲液(1/15mol/L, pH6.8)配制方法如下:

第一液:取磷酸氢二钠 9.47g 溶于蒸馏水 1000ml 中,配成 1/15mol/L 溶液。

第二液:取磷酸二氢钾 49.07g 溶于蒸馏水 1000ml 中,配成 1/15mol/L 溶液。

取第一液 49.5ml 加于第二液 50.5ml 中混匀,即为 pH6.8 的 1/15mol/L 缓冲液。

使用时，取 1 份姬姆萨染液原液，与 9 份 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.8) 混合，配成其应用液。

## 6.6 试验步骤

### 6.6.1 细胞培养与染毒

试验需在加入和不加入  $S_9$  的条件下进行。试验前一天，将一定数量的细胞接种于培养皿（瓶）中，放  $CO_2$  培养箱内培养。试验时吸去培养皿（瓶）中的培养液，加入一定浓度的受试样品、 $S_9$  混合液（不加  $S_9$  混合液时，需用培养液补足）以及一定量不含血清的培养液，放培养箱中，根据细胞周期决定处理 2~6 h。结束后，吸去含受试样品的培养液，用 Hanks 液洗细胞 3 次，加入含 10% 胎牛血清的培养液，放回培养箱，于 24h 内收获细胞。于收获前 2~4h，加入细胞分裂中期阻断剂（如用秋水仙素，作用时间为 4h，终浓度为  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

当受试样品为原料时，如果在上述加入和不加入  $S_9$  混合液的条件下均获得阴性结果，则需加做长时间处理的试验，即在没有  $S_9$  混合液的条件下，使受试样品与试验系统的接触时间延长至 24h。当难以得出明确结论时，应更换试验条件，如改变代谢活化条件、受试样品与试验系统接触时间等重复试验。

### 6.6.2 收获细胞与制片

6.6.2.1 消化:用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化细胞，待细胞脱落后，加入含 10% 胎牛或小牛血清的培养液终止胰蛋白酶的作用，混匀，放入离心管以 1000~1200rpm 的速度离心 5~7min，弃去上清液。

6.6.2.2 低渗:加入 0.075mol/L KCl 溶液 7ml，用滴管将细胞轻轻地混匀，放入 37℃ 水浴中低渗处理 7min，加入 2ml 固定液(甲醇:冰醋酸 3:1)混匀，以 1500rpm 速度离心 5~7min，弃去上清液。

6.6.2.3 固定:加入 7ml 固定液，混匀后固定 7min，以 1500rpm 速度离心 7min，弃去上清液。用同法再固定 1~2 次，弃去上清液。

6.6.2.4 滴片:加入数滴新鲜固定液，混匀。用混悬液滴片，自然干燥。

6.6.2.5 染色:用姬姆萨染液染色。

6.6.3 镜检:对每只动物选择 100 个分散良好的中期分裂相，在显微镜油镜下进行读片。在读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标位置及畸变类型。所有处理组、阳性和阴性对照组均需测定有丝分裂指数。每一剂量组应分析不少于 500 个分散良好的中期分裂相。

#### 6.6.4 试验结果评价

将结果数据按每只动物列表显示，计算指标包括每个细胞畸变数、染色体结构异常百分率、各剂量组及对照组不同类型染色体异常数与频率等。分裂细胞数应分别统计，一般不包括在总异常频率中；若不同性别动物间无差别，各指标可合并统计。所得各组的染色体畸变率用 $\chi^2$ 检验进行统计学处理，以评价剂量组和对照组之间是否有显著性差异。

在下列两种情况下可判定受试样品在本试验系统中为阳性结果：(1) 受试样品引起染色体结构畸变数的增加具有统计学意义，并有与剂量相关的增加；(2) 受试样品在任何一个剂量条件下，引起具有统计学意义，并有可重复性。

阴性结果的判定需在%RS < 20%（即已产生明显细胞毒性）的情况下未见染色体畸变率显著增加时方可作出。评价时应综合考虑生物学和统计学意义。

### 7 试验结果报告

应包括以下内容：

- 7.1 受试样品名称、有关的理化性状、所用溶剂及其配制、剂量选择（应说明受试样品对细胞毒性的测定方法、溶解情况等）；
- 7.2 细胞株名称；
- 7.3 试验条件和方法；
  - 7.3.1 代谢活化系统所用酶诱导剂、来源及 S<sub>9</sub> 混合液配方；
  - 7.3.2 培养液名称与血清类别和使用溶解情况；
  - 7.3.3 阳性对照物名称和选用浓度，阴性（溶剂）对照物名称及使用浓度；
  - 7.3.4 接种的细胞密度以及所用培养皿（瓶）的规格；
  - 7.3.5 中期分裂阻断剂名称、所用浓度和作用时间；
  - 7.3.6 受试样品与试验系统的接触时间；
- 7.4 简述制片方法；
- 7.5 毒性特征、细胞周期资料、分裂指数、受试样品的 pH 值、畸变包括裂隙分析、各试验组（剂量组、阳性组、阴性组）染色体畸变数目及畸变类型、畸变范围、畸变均值、畸变标准差、剂量反应关系、统计处理方法、本实验室历史上的染色体畸变率范围、均值和标准差（说明样品数）；
- 7.6 结论。

## 8 试验结果解释

阳性结果表明受试样品在该试验条件下可引起所用哺乳动物动物细胞染色体畸变。阴性结果表明在该试验条件下受试样品不引起所用哺乳动物动物细胞染色体畸变。

# 体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验

## *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test

### 1 范围

本规范规定了体内哺乳动物骨髓染色体畸变试验的基本原则、技术要求和方法。

本方法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

OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 475, 21<sup>st</sup> July 1997)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.5385 June 1996)

### 3 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。

### 4 定义

4.1 染色单体型畸变 (Chromatid-type Aberration): 染色体结构损伤，表现为染色单体断裂或染色单体断裂重组的损伤。

4.2 染色体型畸变 (Chromosome-type Aberration): 染色体结构损伤，表现为在两个染色单体的相同位点均出现断裂或断裂重组的改变。

4.3 核内复制 (Endoreduplication): 是指在 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。

4.4 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。

4.5 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。

4.6 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。

4.7 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。

## 5 试验基本原则

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，染色，在显微镜下观察中期分裂相细胞，分析染色体畸变。

## 6 试验方法

### 6.1 仪器和器械

实验室常用设备、生物显微镜、恒温水浴箱  $37 \pm 5^\circ\text{C}$ 、离心机、解剖剪、镊子、注射器、灌胃针头、离心管、吸管、滴管、试管架、载玻片、塑料吸瓶、干净纱布、滤纸等。

### 6.2 试剂

6.2.1 0.1% 秋水仙素：置于棕色瓶中，冰箱保存。

6.2.2 0.9% 氯化钠溶液。

6.2.3 0.075 mol/L 氯化钾溶液。

6.2.4 固定液：甲醇与冰醋酸以 3:1 混合，临用时现配。

#### 6.2.5 姬姆萨 (Giemsa) 染液

成分：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  $37^\circ\text{C}$  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。

#### 6.2.6 磷酸缓盐冲液 (pH 7.4)

1/15mol/L 磷酸氢二钠溶液：磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )9.47 g 溶于 1000 ml 蒸馏水中。

1/15mol/L 磷酸二氢钾溶液：磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )49.07 g 溶于 1000 ml 蒸馏水中。

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

#### 6.2.7 Giemsa 应用液

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

6.2.8 甲醇:冰乙酸以 3:1 混合，临用时现配。

全部试剂除注明外，均为分析纯，试验用水为蒸馏水。

### 6.3 受试样品配制

受试样品应新鲜配制。除非有资料表明以溶液（或乳浊液、悬浊液等）保存具有稳定性。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。如非常用溶剂或载体，应有参考资料说明其成份及选做溶剂的原因。

### 6.4 对照

6.4.1 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，其它处理与受试样品组一致。

6.4.2 在接触水平，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效应明显，但以不能使看片者一看即知编码玻片底细。可用有别于受试样品路线的方法即只取一个采样点来证明阳性对照。最好使用化学分类相关的阳性对照化合物。常用的阳性对照物有：

乙基甲磺酸盐（Ethyl methanesulphonate, CAS No.62-50-0），60mg / kg bw

乙基亚硝基脲（Ethyl nitrosourea, CAS No.759-73-9）

丝裂霉素 C（Mitomycin C, CAS No.50-07-7），10 mg / kg bw ip。

环磷酰胺（Cyclophosphamide, CAS No.50-18-0），40mg / kg bw 经口或 30mg / kg ip

环磷酰胺（Cyclophosphamide monohydrate, CAS No.6055-19-2）

三亚乙基胺（Triethylenemelamine, CAS No. 51-18-3），1.0 mg/kg bw，一次 ip。

6.4.3 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，除非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。

### 6.5 实验动物和饲养环境

6.5.1 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，其它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 7~12 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必须有至少 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 5 天。

6.5.2 动物实验室的温度要求  $22^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ),相对湿度保持在 30% ~ 70%,最好为 50% ~ 60%。人工照明时应维持 12 h 昼夜周期。用常规饲料喂养,自由饮水。如经胃肠道给药,所选择的饲料应确保受试样品可加入其中。动物应按组按性别分笼饲养,每笼动物数以不干扰动物活动和观察反应为度。动物实验室、实验动物和动物饲料应符合国家相应规定。

## 6.6 剂量水平

6.6.1 应进行预试验以选择最高剂量,未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设三个剂量,这些剂量应包括从最大毒性至最小毒性或无毒性的范围。第二次采样时间点仅需设置最高剂量。最高剂量的定义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。最高剂量也可定义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。

6.6.2 如剂量水平  $\geq 2000 \text{ mg/kg bw}$ , 24h 内进行一次或两次染毒,如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 最高剂量选用  $2000 \text{ mg/kg bw}\cdot\text{d}$ , 染毒 14 d 以上选用  $1000 \text{ mg/kg bw}\cdot\text{d}$ 。如欲外推人群暴露的阈剂量,可能需要采用更高的剂量水平。

## 6.7 试验步骤

### 6.7.1 实验动物的处理和采样时间点

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

6.7.1.2 受试样品溶液一次给予的最大容量不应超过  $2 \text{ ml} / 100\text{g bw}$ 。

6.7.1.3 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。

6.7.1.4 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 个正常期中的间隔期,即 A 组于末次染毒后 12 ~ 18 h 采集样品。B 组于末次染毒后 36 ~ 42 h 采集样品;中、低剂量组均于末次染毒后 12 ~ 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 ~ 18 h 采一次样。

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

## 6.7.2 制片

6.7.2.1 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，剪去两端的骨髓，用带针头的 5 ml 注射器吸取 5 ml 生理盐水，插入骨髓腔内，将骨髓冲洗入 10 ml 离心管，然后用吸管吹打骨髓团块使其均匀，以 1000 rpm 速度离心 10 min，用滴管吸去上清液。

6.7.2.2 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℃ 水浴中低渗 20 min。

6.7.2.3 预固定：立即加入固定液（甲醇：冰醋酸 = 3:1）1 ml，混匀，以 1000 rpm 速度离心 10 min，用滴管吸去上清液。

6.7.2.4 固定：加入 7 ml 固定液，混匀，固定 10 min，以 1000 rpm 速度离心 10 min，用滴管吸去上清液。用同法再固定 2 次。

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

6.7.2.6 在洁净的冷冻玻片上方 3 ~ 5 cm 处滴 3 ~ 4 滴细胞悬液于玻片上，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 ~ 3 张。

6.7.2.7 染色：将制备好的标本片放入 Giemsa 应用液中染色 15 min（根据室温、冬天长些、夏天短些），用蒸馏水冲洗、晾干。

## 6.7.3 阅片

6.7.3.1 所有玻片，包括阳性对照和阴性对照，在镜检前要分别编号。

6.7.3.2 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。用油镜进行细胞染色体中期分析。

6.7.3.3 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 1000 个细胞）。

6.7.3.4 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，每个剂量组不少于 1000 个中期分裂相细胞。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。

### 6.7.3.5 观察项目

6.7.3.5 .1 染色体数目的改变：非整倍体（亚二倍体或超二倍体），多倍体，内复制。

6.7.3.5 .2 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）。

## 6.8 数据处理和试验结果评价

6.8.1 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感受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。

6.8.2 评价时应从生物学意义和统计学意义两个方面进行分析。受试样品组染色体畸变率与阴性对照组相比，染色体结构畸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细胞畸变数明显增高时，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。

6.8.3 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。

6.8.4 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。

## 7 鉴定报告

鉴定报告应包括以下内容：

7.1 受试样品名称、分类号、理化性状、纯度、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；

7.2 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）；

7.3 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；

7.4 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；

7.5 细胞分裂中期阻断剂名称、使用浓度及处理间隔时间。

7.6 试验方法：简述操作步骤，所用统计学方法，结果判定标准；

7.7 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、和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。

7.8 结论。

## 8 结果解释

阳性结果表明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。

# 体内哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验

## *In Vivo* Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test

### 1 范围

本规范规定了哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验的基本原则、技术要求和方法。

本规范适用于检测化学品的致突变作用。

### 2 规范性引用文件

OECD Guideline for Testing of Chemicals(NO.474, 1997)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.5395, 1998)

### 3 试验目的

检测受试样品是否能引起哺乳动物骨髓嗜多染红细胞染色体或有丝分裂器损伤而诱导微核细胞发生率增高，以评价受试样品致突变的可能性。

### 4 定义

4.1 微核 (Micronucleus): 是在细胞的有丝分裂后期染色体有规律地进入子细胞形成细胞核时，仍然滞留在细胞质中的染色单体或染色体的无着丝点断片，或因纺锤体受损而丢失的整条染色体。它在末期以后，单独形成一个或几个规则的次核，被包含在子细胞的胞质内而形成，因比主核小，故称为微核。

4.2 着丝粒 (Centromere / Kinetochore): 是细胞分裂中期染色体上纺锤丝附着的区域，借此子代染色体得以有规律地向子代细胞两极移动。

4.3 正染红细胞 (Normochromatic Erythrocyte, NCE): 成熟红细胞，因其核糖体已消失，可通过选择性的染色而与未成熟红细胞区别开来。

4.4 嗜多染红细胞 (Polychromatic Erythrocyte, PCE): 未成熟红细胞，是红细胞成熟过程中的一个中间阶段，此时因胞质内仍含有核糖体，可通过选择性的染色而与成熟红细胞区别开来。

### 5 试验基本原理

通过适当的途径使动物接触受试样品，一定时间后处死动物，取出骨髓，制

备涂片，经固定、染色、在显微镜下计数含微核的嗜多染红细胞。

## 6 试验方法

### 6.1 仪器与器材

生物显微镜、恒温水浴箱、解剖剪、镊子、止血钳、注射器、灌胃针头、载玻片、塑料吸瓶、乳钵、干净纱布、滤纸等。

### 6.2 试剂

#### 6.2.1 小牛血清（灭活）

小牛血清滤菌后置于 56℃ 恒温水浴保温 30 min 进行灭活。灭活的小牛血清通常贮存于 4℃ 冰箱里。亦可用大、小鼠血清代替。

#### 6.2.2 姬姆萨（Giemsa）染液

成分：	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。

#### 6.2.3 磷酸盐缓冲液（pH 6.8）

1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液：磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 9.47 g 溶于 1000 ml 蒸馏水中。

1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液：磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 49.07 g 溶于 1000 ml 蒸馏水中。

取 1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液 50ml 与 1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液 50ml 混合。

#### 6.2.4 Giemsa 应用液

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

#### 6.2.5 甲醇（分析纯）

全部试剂除注明外，均为分析纯，试验用水为蒸馏水。

### 6.3 样品处理

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。如使用特殊溶剂或载体，应有参考资料说明其成份。

### 6.4 实验动物

常规选用初成年的健康小鼠和大鼠。

## 6.5 剂量设计

至少设置三个剂量组，高剂量组应达到不产生动物死亡的最大毒作用剂量。一般取受试样品 1/5、1/10、1/20 LD<sub>50</sub> 剂量，以求获得微核的剂量—反应关系曲线。当受试样品的 LD<sub>50</sub> 大于 5g/kg. bw 时，可取 5g/kg. bw 为最高剂量，每个剂量组 10 只动物，雌、雄性各半，同时应设阳性对照和阴性对照。阳性对照物应能引起骨髓嗜多染红细胞微核率明显高于背景资料，染毒途径可以不同于受试样品。所选用的阳性对照物最好与受试样品类别有关，常使用环磷酰胺 (Cyclophosphamide)、甲磺酸乙脂 (Ethyl Methanesulphonate)、乙基亚硝基脲 (Ethyl Nitrosourea)、丝裂霉素 C (Mitomycin C)、三亚乙基密胺 (Triethylenemelamine) 等。如使用特殊溶剂的应设溶剂对照。

## 6.6 试验步骤

### 6.6.1 染毒

6.6.1.1 骨髓 PCE 微核试验要求给受试样品后短期内能在骨髓达到有效浓度。常用的方式是腹腔给药及经口给药。由于受试样品的理化性状各不相同，经各种途径给药后吸收速度及分布也有差异，故可按实际需要，选用合适的给药途径。染毒途径视试验目的而定，建议采用经口灌胃方式。采用 30h 两次给药法，即两次给药间隔 24h，第二次给受试样品后 6h 取材。另还可采用一次给药、连续五次给药（每日一次）。

### 6.6.1.2 处死动物

颈椎脱臼处死动物后，打开胸腔，沿着胸骨柄与肋骨交界处剪断，剥掉附着其上的肌肉，擦净血污，横向剪开胸骨，暴露骨髓腔，然后用止血钳挤出骨髓液。

### 6.6.1.3 制片

将骨髓液滴在载玻片一端的小牛血清液滴里，仔细混匀。一般来讲，两节胸骨髓液涂一张片子为宜。然后，按血常规涂片法涂片，长度约 2~3cm。在空气中晾干。

### 6.6.1.4 固定

将干燥的涂片放入甲醇液中固定 5min。即使当日不染色，也应固定后保存。

### 6.6.1.5 染色

将固定过的涂片放入 Giemsa 应用液中，染色 10~15min，然后立即用 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗。

### 6.6.1.6 封片

待染片完全干燥后或用滤纸及时擦干染片背面的水滴，再用双层滤纸轻轻按压染片，以吸附染片上残留的水分，再在空气中晃动数次，以促其尽快晾干，然

后放入二甲苯中透明 5min，取出滴上适量光学树胶，盖上盖玻片，写好标志。

### 6.5.3 镜检

6.5.3.1 本法观察含微核的嗜多染红细胞。嗜多染红细胞呈灰蓝色，成熟红细胞呈淡桔红色。微核大多数呈单个圆形，边缘光滑整齐，嗜色性与核质相一致，呈紫红色或蓝紫色。选择细胞分布均匀，细胞无损，着色适当的区域，再在油镜下计数。虽然不计数含微核的有核细胞，但需用有核细胞形态染色是否正常作为判断制片优劣的标准。

6.5.3.2 每只动物至少计数 1000 个嗜多染红细胞。微核率指含有微核的嗜多染红细胞数，以千分率（‰）表示之。若一个嗜多染红细胞中出现两个以上微核，仍按一个有微核细胞计数。并应计算正常红细胞和嗜多染红细胞的比列。

### 6.6 结果统计与评价

计算各组微核细胞率的均数和标准差，利用适当的统计学方法如泊松(Poisson)分布或 u 检验，对受试样品各剂量组与溶剂对照组的微核率进行比较。如果受试样品剂量组与对照组相比，统计学上有显著性差异，并有剂量-反应关系则可认为微核试验阳性。

## 7 试验结果报告

7.1 受试样品:名称、理化性状、配制方法、所用溶剂及其对受试样品的溶解性和稳定性。

7.2 动物:种属、品系、体重、数量、性别、来源（注明合格证号和动物级别）、喂养条件、饲料等。

7.3 实验动物饲养环境:饲料来源、室温、相对湿度、实验动物室合格证号。

7.4 试验方法:选定剂量依据、剂量换算、染毒途径和方式、试验处理与制片过程。

7.5 毒性评价:细胞分裂中期阻滞剂的特性、畸变计数标准、每只动物分析细胞数、试验干扰因素分析、评价方法等。

7.6 以列表方式报告受试样品对动物骨髓细胞微核发生率。

7.7 结论。

## 8 试验结果解释

阳性结果表明受试样品在本试验条件下可引起哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核率增加。阴性结果表明在本试验条件下受试样品不引起哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核率增加。

# 哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验

## Mammalian Spermatogonial / Spermatocyte Chromosome Aberration Test

### 1 范围

本规范规定了哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验的基本原则、技术要求和方法。

本规范适用于检测化学品对整体哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体的损伤。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No. 483, 1997)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870-5380, June 1996)

### 3 试验目的

本试验是一项检测生殖细胞染色体畸变效应试验，利用细胞遗传学方法，检测整体哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变，以评价受试样品引起生殖细胞可遗传突变的可能性。

### 4 定义

4.1 精原细胞 (Spermatogonia) 是雄性性腺生殖细胞减数分裂后的单倍体配子。

4.2 染色单体型畸变 (Chromatid-type Aberration): 染色体结构损伤，表现为染色单体断裂或染色单体断裂重组的损伤。

4.3 染色体型畸变 (Chromosome-type Aberration): 染色体结构损伤，表现为在两个染色单体的相同位点均出现断裂或断裂重组的改变。

4.4 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。

4.5 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。

4.6 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。

4.7 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，特殊染色条件可观察到染色体互换和内交换等。

## 5 试验基本原则

动物通过适当的途径接触受试样品，一定时间后处死动物。观察睾丸精原细胞或初级精母细胞染色体畸变情况，以评价受试样品对雄性生殖细胞的致突变性。

动物处死前，用细胞分裂中期阻断剂处理，处死后取出两侧睾丸，经低渗、固定、软化及染色后制备精原细胞/初级精母细胞染色体标本，在显微镜下观察中期分裂相细胞，分析精原细胞/初级精母细胞染色体畸变。

## 6 试验方法

### 6.1 仪器和器械

实验室常用设备、生物显微镜、恒温水浴箱  $37 \pm 5^\circ\text{C}$ 、离心机、解剖剪、镊子、注射器、灌胃针头、小平皿、离心管、吸管、滴管、试管架、载玻片、塑料吸瓶、擦镜纸等。

### 6.2 试剂

6.2.1 0.1% 秋水仙素：置于棕色瓶中，冰箱保存。

6.2.2 1%柠檬酸三钠溶液。

6.2.3 60%冰乙酸。

6.2.4 固定液：甲醇与冰醋酸以 3:1 混合，临用时现配。

#### 6.2.5 姬姆萨 (Giemsa) 染液

成分：	Giemesa 染料	3.8 g
	甲醇	375 ml
	甘油	125 ml

配制：将 Giemesa 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 125ml 甘油，混合均匀。置  $37^\circ\text{C}$  恒温箱中保温 48h。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。

#### 6.2.6 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)

1/15mol/L 磷酸氢二钠溶液: 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )9.47 g 溶于 1000ml 蒸馏水中。

1/15mol/L 磷酸二氢钾溶液: 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )49.07 g 溶于 1000ml 蒸馏水中。

取 1/15mol/L 磷酸氢二钠溶液 50ml 与 1/15mol/L 磷酸二氢钾溶液 50ml 混合。

#### 6.2.7 Giemsa 应用液

取 1 份 Giemsa 染液与 9 份 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液混合而成。临用时配制。

#### 6.2.8 甲醇:冰乙酸以 3:1 混合, 临用时现配。

全部试剂除注明外, 均为分析纯, 试验用水为蒸馏水。

### 6.3 样品处理

受试样品应新鲜配制。除非有资料表明以溶液(或乳浊液、悬浊液等)保存具有稳定性。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(水溶性和/或脂溶性)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。如非常用溶剂或载体, 应有参考资料说明其成份。

### 6.4 对照

6.4.1 每次试验都应设置相应的阳性和阴性对照(溶剂或载体)。阴性对照组除不使用受试样品外, 其它处理与受试样品组一致。

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精原细胞/初级精母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, 除非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。

6.4.2 阳性对照组动物体内应能形成可被检测的高于背景的精原细胞/初级精母细胞染色体结构畸变。阳性对照组剂量设置应使效应明显, 但以不能使看片者一看即知编码玻片底细。可用有别于受试样品路线的方法即只取一个采样时间点来证明阳性对照。最好使用化学分类相关的阳性对照化合物。常用的阳性对照物有:

环磷酰胺 (Cyclophosphamide, CAS No. 50-18-0) 40mg/kg bw 腹腔注射。

环磷酰胺 (Cyclophosphamide monohydrate, CAS No. 6055-19-2)

丝裂霉素 C ( Mitomycin C, CAS No. 50-07-7), 1.5~2mg/kg bw 腹腔注射。

单聚丙烯酰胺 (Monoeric acrylamide, CAS No. 79-06-1)

三亚乙基噻胺 (Triethylenemelalime, CAS No. 51-18-3), 0.3mg/kg bw 腹腔注射。

由于本试验中动物个体之间可能出现反应的变异较大, 提倡试验时阳性对照组不应只设一个剂量水平。

## 6.5 实验动物和饲养环境

### 6.5.1 实验动物

雄性小鼠和中国仓鼠是精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验常规使用动物, 其它合适的雄性哺乳动物也可选用。应使用健康年轻的性成熟动物, 如使用小鼠, 周龄 7~12 周为最好。所用动物体重变化按性别不能超过平均体重的±20%。动物应随机分组, 每个处理组和对照组都必须有至少 5 只能用于分析的动物。如试验设有几个采样时间点, 则要求每组每个采样时间点都有 5 只能用于分析的动物。动物购回后应适应实验室新环境至少 5 天。

### 6.5.2 饲养环境

动物应按组分笼饲养, 每笼动物数以不干扰动物活动和观察反应为度。动物实验室、实验动物和动物饲料应符合国家相应规定。

## 6.6 剂量设计

### 6.6.1 精原细胞

应进行预试验以选择最高剂量, 只要在试验中能证明有阳性效应, 则剂量范围偏大也可接受。如果受试样品具有毒性, 应在第一个采样时间点设置三个可供分析的剂量, 这些剂量应包括从最大毒性至低毒性或无毒性的范围; 第二次采样时间点仅需设置最高剂量。最高剂量应是能使动物出现严重中毒反应的剂量, 即最大耐受剂量。而有特异生物学活性的物质, 如毒性很低 (如激素和丝裂源) 可另循其他剂量设置标准。最高剂量也可是使精原细胞产生明显毒性的剂量 (如精原细胞有丝分裂中期相与第一次和第二次减数分裂中期相的比率降低, 但这种比率的降低不应超过 50%)。也可选急性经口 LD<sub>50</sub> 的 50~80% 设为高剂量组。按等比级数 2 向下设置中、低剂量组。

### 6.6.2 初级精母细胞

应进行预试验以选择最高剂量，只要在试验中能证明有阳性效应，则剂量范围偏大也可接受。如果受试样品具有毒性，应设置三个可供分析的剂量，这些剂量应包括从最大毒性至小毒性或无毒性的范围。最高剂量的定义是能使动物出现严重中毒反应的剂量，即最大耐受剂量。按等比级数 2 向下设置中、低剂量组。

### 6.6.3 限量试验

如果试验在不低于 2000mg/kg bw 剂量水平，用同一日内进行一次或两次处理的方式没有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，则可不考虑在整个试验中设置三个剂量水平。若受试样品毒性很低，应以 5000mg/kg bw 剂量水平进行限度试验，外推到人群暴露的阈剂量试验可能需要采用更高的剂量水平。

## 6.7 试验步骤

### 6.7.1 实验动物的处理和采样时点

6.7.1.1 根据试验目的或受试样品的性质选择染毒途径，建议采用经口灌胃染毒。受试样品溶液一次给予的最大容量不应超过 2ml/100g bw。一般情况下一次给药，其剂量应引起明显毒性。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。也可采用腹腔注射等方式给药。

### 6.7.1.2 样品采集

#### 6.7.1.2.1 精原细胞

高剂量组动物分为 A、B 两个亚组，分两次采集样品，A 组于末次染毒后 24h 采集样品。B 组于末次染毒后 48h 采集样品；中、低剂量组均于末次染毒后 24h 采集样品。

#### 6.7.1.2.2 初级精母细胞

于第一次染毒后的第 12~14d 采集样品。

6.7.1.3 于处死动物采集样品前 4~6h 腹腔注射秋水仙素 (4~6mg/kg bw)。

### 6.7.2 精原细胞/初级精母细胞染色体标本制备

#### 6.7.2.1 取材

用颈椎脱臼法处死动物，打开腹腔，迅速取出两侧睾丸，去除脂肪，置于盛有适量 1%柠檬酸三钠溶液的小平皿中，洗去毛和血污，转入另一小平皿中。

## 6.7.2.2 低渗

### 6.7.2.2.1 精原细胞

用眼科镊子撕开并去除睾丸被膜，轻轻分离曲细精管。加入预温（37℃）的1%柠檬酸三钠溶液 5ml。倒入 10ml 离心管，加低渗液至 10ml，用滴管吹打混悬曲细精管，静止 2min，使曲细精管下沉。将含有许多精子和减数分裂的上清液仔细吸去，留下的曲细精管，重新用 10ml 低渗液处理，不超过 10min。

### 6.7.2.2.2 初级精母细胞

用眼科镊子撕开并去除睾丸被膜，轻轻分离曲细精管。加入 1%柠檬酸三钠溶液 10 ml。用滴管吹打混悬曲细精管，室温下静止 20min。

## 6.7.2.3 固定

用滴管尽量吸去上清液，加入 10ml 固定液混匀，固定 30min，如在冰箱（0~4℃）过夜固定则更好。

## 6.7.2.4 离心

以 1000rpm 速度离心 10min。

## 6.7.2.5 软化

用滴管吸尽上清液。加入 60%冰乙酸 2ml，滴管吹打至不透光。

## 6.7.2.6 加入 2ml 新鲜固定液，用细口滴管充分混匀。

## 6.7.2.7 制片

在洁净的冷冻玻片上方 3~5 cm 处滴 3~4 滴细胞悬液于玻片上，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干。每个睾丸制片 2~3 张。

## 6.7.2.8 染色

将制备好的标本片放入 Giemsa 应用液中染色 10 min（根据室温、冬天长些、夏天短些），用蒸馏水冲洗、晾干。

## 6.8 阅片

6.8.1 所有玻片，包括阳性对照和阴性对照，在镜检前要分别编号。

6.8.2 在低倍镜下寻找背景清晰、分散良好、染色体收缩适中的中期分裂相，在油镜下注意选取细胞膜形态完整、邻近无游离染色体或中期相的进行观察。

6.8.3 确定有丝分裂指数（仅限于精原细胞）：包括所有处理组、阴性对照组和阳性对照组（每只动物计数 1000 个细胞）。

6.8.4 计数畸变细胞：用双盲法阅片。每只动物做两侧睾丸，每侧睾丸至少分析 50 个精原细胞/初级精母细胞中期分裂相，即每个剂量组至少观察 500 个中期分

裂相。当观察到的畸变细胞数量较多时，可以减少观察的细胞数。在阅片时应记录每一观察细胞染色体畸变的数目和类型以及显微镜视野的坐标位置。

## 6.8.5 观察项目

### 6.8.5.1 精原细胞

6.8.5.1.1 染色体数目的改变：多倍体。正常精原细胞中期分裂相中常可见到多倍体，这是因为精原细胞至少两次有丝分裂和他们子细胞的减数分裂常同步进行。可以有两个或四个中期分裂相彼此极靠近，看来象一个中期相。因此阐明生殖细胞多倍体的意义时必须很慎重，仅在第一次减数分裂中，四倍体生殖细胞有一个被确认为四价体时才有意义。

6.8.5.1.2 染色体结构的改变：断裂、断片、微小体、无着丝点环、环状染色体、双或多着丝点染色体、单体互换等。

### 6.8.5.2 初级精母细胞

除观察裂隙、断片、断裂、微小体外，还应观察：

6.8.5.2.1 相互易位：相互易位涉及非同源染色体间末端断片的交换。它需要两次断裂和修复。有常染色体间的易位和性染色体与常染色体间的易位。常染色体易位时能产生环状的多价体或链状多价体。如一次易位可形成环状四价体(RIV)、链状四价体(CIV)、三价体加上一个单价体(CIII+I)；若二次、三次或四次易位，则可观察到六价体、八价体或十价体。性染色体与常染色体的易位，可以有 X 染色体或 Y 染色体与常染色体易位。在对照成年动物中自发易位率极低，低于 0.01%。老年动物可稍许增加。

6.8.5.2.2 X-Y 和常染色体的单价体：亦称早熟分离。对照动物 X-Y 单价体较常见，约有 0~10%。因 X 和 Y 染色体是长臂的远端，非同源的片段相接。常染色体的单价体是由于不联会（同源片段间配对合子的缺失），或联会消失（由于交叉失败而分离）而造成的，它们在对照动物中较少见，因为交叉双线期形成，正常配对的联合一直到中期 I 末。常发生于最小一对常染色体中。

6.8.5.2.3 多倍体：初级精母细胞的多倍体有四倍体，甚至超四倍体，但仅在第一次减数分裂中，四倍体初级精母细胞有一个被确认为四价体时才有意义。多倍体发生率约为 3%~6%。

## 6.9 结果统计与评价

6.9.1 每一实验动物作为一个观察单位。精原细胞试验每组动物分别计算染色体结构畸变细胞百分率。一般用卡方检验方法进行统计学分析。初级精母细胞受试

样品组与对照组的断片、易位、畸变细胞率、常染色体单价体、性染色体单价体等分别按  $X^2$  检验或 Kastenbaum 和 Bowman 所述方法进行统计分析。两种细胞染色体畸变的裂隙都应分别记录和报告，但一般不计入总的畸变率。

6.9.2 受试样品组染色体畸变率与阴性对照组相比，统计学意义上有显著性差异，并有明显的剂量—反应关系或在一个受试样品组出现染色体细胞畸变数明显增高时，即可认为精原细胞/初级精母细胞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精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验阳性。

6.9.3 多倍体的增加提示受试样品具有潜在的诱导精原细胞染色体数目畸变的作用。

## 7 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外，还应包括以下方面：

7.1 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，采样时间点；

7.2 细胞分裂中期阻断剂名称、使用浓度及处理时间。

7.3 试验方法：简述操作步骤，所用统计学方法，结果判定标准；

7.4 结果：中毒症状、每只动物染色体畸变类型和畸变细胞数、每组动物细胞畸变总数、均数和标准差、每组每细胞各类型畸变数、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。精原细胞还应包括：有丝分裂指数、精原细胞有丝分裂中期相与第一次和第二次减数分裂中期相的比率。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精原细胞/初级精母细胞染色体畸变类型和数量及畸变率；

7.5 结论。

## 8 结果解释

阳性结果表明受试样品具有引起受试动物精原细胞/初级精母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精原细胞/初级精母细胞染色体畸变。哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验能够提供受试样品对雄性生殖细胞遗传学的毒性作用资料。其试验结果仅能有限地外推到人。

# 精子畸形试验

## Sperm Malformation Test

### 1 范围

本规范规定了动物精子畸形试验的基本原则、要求和方法。  
本规范适用于化学品的遗传毒性检测。

### 2 规范性引用文件

中华人民共和国卫生部食品安全性毒理学评价程序 (GB 15193.7 - 94)

### 3 试验目的

检测化学物质对精子可能存在的遗传毒性。

### 4 定义

精子畸形(Sperm Malformation): 指精子形态的异常改变。

### 5 试验基本原则

通过适当的途径使动物接触受试样品, 经过一定时间后处死动物, 取其附睾, 制备涂片, 经固定、染色, 在显微镜下计数畸形精子。

### 6 试验方法

#### 6.1 仪器和器械

生物显微镜、解剖剪、镊子、表面皿、离心管、小漏斗、吸管、滴管、载玻片、擦镜纸等。

#### 6.2 试剂

##### 6.2.1 1%伊红染色液

称取伊红 1g 溶于 100ml 蒸馏水中。

##### 6.2.2 生理盐水、甲醇 (A. R)

#### 6.3 实验动物和饲养环境

常规使用动物是雄性小鼠 6~8 周龄。

实验动物及动物实验室应符合国家相应规定。

#### 6.4 剂量设计

受试样品至少应设三个剂量组。分别取 1/2、1/5、1/10 或 1/20LD<sub>50</sub> 剂量。当受试样品的 LD<sub>50</sub> 大于 5g/kg 体重时，可取 5g/kg 体重为最高剂量。另外设阴性（溶剂）对照组和阳性物对照组。常用溶剂为水、生理盐水、植物油（玉米油、花生油）等。阳性对照组可采用环磷酰胺 40mg/kg bw·d。每组至少有 5 只存活动物。

#### 6.5 染毒

常用途径为经口灌胃方式。受试样品各剂量组、阴性对照组和阳性物对照组的动物，均连续染毒 5d，每日一次。一般于首次染毒后的第 35d 处死动物。

#### 6.6 制片

用颈椎脱臼法处死小鼠，剖开腹腔，暴露睾丸，分离两侧附睾，用眼科剪剖开附睾组织，与适量生理盐水混匀，涂片。

#### 6.7 固定

待涂片干燥后，放入甲醇（A.R）液中固定 5min，取出晾干。

#### 6.8 染色

将涂片于 1%伊红染液中染色 1h，然后用蒸馏水轻轻冲洗，晾干。

#### 6.9 观察与计数

首先，在低倍镜下选择背景清晰、精子分布均匀、重叠较少的区域，然后在高倍镜下观察结构完整的 1000 个精子，计数其中畸形的精子。精子畸形主要表现在头部。按 Wyrobeks 的分类标准，主要类型有：无钩、香蕉形、无定形、胖头、尾折叠、双头及双尾。无尾精子、头部重叠的或整个与另一个重叠的精子均不计数。判断双头、双尾精子时，要注意与两条精子的部分重叠相区分。

#### 6.10 结果统计与分析

每只动物应按精子畸形类型分别记录，以便计算各实验组的精子畸形发生率和精子畸形类型的构成比。

利用 Wilcoxon 秩和检验法和适当的统计学方法，将受试样品各剂量组精子畸形发生率分别与阴性对照组进行比较。

精子畸形试验阳性的判断标准是畸形发生率至少为阴性对照组的倍量或经统计学处理有显著性差异，并存在剂量-反应关系者。

一般正常小鼠的精子畸形率为 0.8%~3.4%，但每个实验室应有自己稳定的精子自发畸形率。

### 7 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外，还应以列表方式报告受试样品对动物精子畸形发生率和精子畸形类型分析的结果（表 1、表 2）。

## 8 试验结果的解释

精子畸形试验能够提供受试样品对精子遗传学的毒作用资料，其试验结果仅能有限的外推到人。

表 1 精子畸形发生率

组别	剂量 (mg/kg bw)	动物数 (只)	受检精子总 数 (个)	畸变精子数 (个)	畸变率 (%)	P 值
受试样品						
溶剂对照						
阳性物对照						

注：畸变率以均数±标准差表示

表 2 精子畸形类型分析

组别	剂量 (mg/kg bw)	动物数 (只)	受检精子 总数 (个)	精子畸形分类及比例 (%)						
				无钩	香蕉形	胖头	无定型	其他	总计	
受试样品										
溶剂对照										
阳性物对照										

# 啮齿类动物显性致死试验

## Rodent Dominant Lethal Test

### 1 范围

本规范规定了啮齿类动物显性致死试验的基本原则、技术要求和方法。

本规范适用于检测化学品对整体啮齿类动物生殖细胞染色体的损伤。

### 2 规范性引用文件

OECD Guideline for Testing of Chemicals ( No.478, 1997)

USEPA OPPTS Health Effect Test Guidelines (Series 870.5450, June 1996)

### 3 试验目的

本试验是一项生殖细胞致突变试验,用来检测整体啮齿类动物生殖细胞染色体畸变,进一步确证体外试验,或其他试验系统获得的阳性结果,以评价受试样品能否到达性腺组织产生遗传危害。

### 4 定义

4.1 显性致死 (Dominant Lethal, DL): 是指引起胚胎或胎儿死亡。当接触某一化学物产生的这种作用表明受试样品作用于实验动物的生殖组织,一般认为是引起生殖细胞染色体结构和数量的改变的结果。不除外基因突变和毒性作用。

4.2 显性致死突变 (Dominant Lethal Mutation): 本文是指发育中的精子或卵子在物理或化学因素作用下,发生了染色体损伤,从而使受精卵在发育中造成死亡。并不引起受精障碍,但引起受精卵的死亡。

### 5 试验基本原理

通过适当的途径使雄性动物接触受试样品,然后与未经染毒且未交配过的雌性动物交配,交配结束后,取出雌性动物。雌性动物于妊娠后半期处死,剖开腹腔,取出子宫,检查两侧子宫内的植入数(着床数)、早死胎、晚死胎和活胎数。雄性动物则于一定间隔时间后再与另一批未经染毒且未交配过的雌性动物交配,如此共进行数批,以保证覆盖一个精子周期(6~9w)。

## 6 试验方法

### 6.1 受试样品配制

受试样品应新鲜配制。除非有资料表明此溶液（或乳浊液、悬浊液等）保存具有稳定性。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。如非常用溶剂或载体，应有参考资料说明其成份。

### 6.2 对照

6.2.1 每次试验都应设置相应的阳性对照和阴性对照（溶剂或载体），阴性对照除不使用受试样品外，其它处理与受试样品组一致。

6.2.2 若近期内（一年之内）已从试验中获得了有效的阳性对照结果，则在同一实验室进行本试验时可不设阳性对照组。

6.2.3 应该使用已被证明在较低剂量水平即对显性致死敏感的阳性对照物，常用的阳性对照物有：

环磷酰胺 (Cyclophosphamide, CAS No. 50-18-0), 40mg/kg bw (ip)。

环磷酰胺 (Cyclophosphamide Monohydrate, CAS No. 6055-19-2), 50 ~ 100mg/kg bw (ip)。

三亚乙基噻胺 (Triethylenemelalimine, CAS No. 51-18-3), 0.3mg/kg bw (ip)。

甲磺酸乙酯 (Ethyl Methanesulphonate), 400mg/kg bw 一次或 100mg/kg 5 次(ip)。

6.2.4 阴性对照由溶剂或载体组成。当所使用的溶剂没有文献资料或历史性资料证明其无有害作用或无致突变性作用时，还应设未处理对照组。

### 6.3 实验动物和饲养环境

#### 6.3.1 实验动物

应选用低背景的显性致死率、高妊娠率和高植入数、健康、性成熟的动物品系，大鼠和小鼠是本试验的常规使用动物。经生殖能力预试，受孕率应在 70%以

上。小鼠体重 30g 以上或大鼠体重 200g 以上，动物平均体重差异按性别不能超过±20%。雌鼠应为处女鼠，且为雄鼠的 12~18 倍量。动物应随机分组，每个处理组和对照组雄鼠一般不少于 15 只，要求每组每周至少有 30 只受孕雌鼠。动物购回后应适应实验室新环境至少 3d。

### 6.3.2 饲养环境

动物实验室、实验动物和动物饲料应符合国家相应规定。

### 6.4 剂量设计

6.4.1 受试样品至少设三个剂量组，应先进行预试验以确定最高剂。最高剂量应能使实验动物出现毒性症状或繁殖能力轻微降低，染毒剂量可选择在  $1/10 \sim 1/3LD_{50}$  之间。中间剂量应引起较轻的可观察到的毒性效应，低剂量应不出现任何毒效应。剂量组的剂量间距以 2~4 倍为宜。对照组除不接触受试样品外，其它条件应与染毒组完全相同。必要时可设赋形剂对照组，以研究赋形剂的影响。对照组中赋形剂的浓度可采用高浓度组的赋形剂用量。如染毒后出现严重的中毒症状，则应降低受试样品的剂量，即使高剂量组由于浓度的降低导致了其它毒性反应明显下降或消失，也应如此。

6.4.2 受试样品毒性较低时，最高剂量一次染毒可达  $5g/kg\ bw$ ，多次染毒可达  $1g/kg\ bw \cdot d$ 。

### 6.5 试验步骤

#### 6.5.1 染毒方式与途径

6.5.1.1 雄鼠预先接触受试样品，再进行交配。雌鼠不接触受试样品。

6.5.1.2 根据试验目的或受试样品的性质选择染毒途径，通常采取经口灌胃或腹腔注射的途径。

6.5.1.3 受试样品溶液一次给予的最大容量不应超过  $2ml/100g\ bw$ 。

6.5.1.4 一般情况下染毒一次或一次/d，连续 5d。

#### 6.5.2 交配方式

雄鼠接触受试样品后的当天（染毒一次）或最后一次接触受试样品后的当天（多次染毒），按雌:雄鼠 2:1 的比例同笼交配，于 5d 后取出雌鼠另行饲养。雄鼠则于 2d 后再与同样数量的另一批处女鼠同笼交配，如此共进行 6~9 批。

#### 6.5.3 临床观察

主要观察并记录亲代动物的毒性反应。

#### 6.5.4 胚胎检查

以雌雄鼠同笼日算起第 15~17d, 采用颈椎脱臼法处死雌鼠, 立即剖腹取出子宫, 仔细检查、计数, 分别记录每一雌鼠的植入数、活胎数、早期死亡胚胎数和晚期死亡胚胎数。

#### 6.5.5 胚胎鉴别

6.5.5.1 活胎: 完整成形、色鲜红, 有自然运动, 机械刺激后有运动反应。

6.5.5.2 早期死亡胚胎: 胚胎形体较小, 外形不完整, 胎盘较小或不明显。最早期死亡胚胎会在子宫内膜上隆起如一小瘤。如已完全被吸收, 仅在子宫内膜上留一隆起暗褐色点状物。

6.5.5.3 晚期死亡胚胎: 成形、色泽暗淡, 无自然运动, 机械刺激后无运动反应。

#### 6.6 结果统计与评价

6.6.1 应以表格的形式列出雄鼠数、孕鼠数和未受孕雌鼠数。应分别记录每次每对雌雄鼠交配的情况。对每只雌鼠而言, 还应详细记录其交配周次、与之交配的雄鼠接触受试样品的剂量以及活胎率和死胎率情况。

6.6.2 以受试样品组的雄鼠为单位, 分别计算每周的下列各项指标。

$$\text{平均受孕率 (\%)} = \frac{\text{每组孕鼠数}}{\text{每组同笼雌鼠总数}} \times 100$$

总着床数 = 活胎数 + 早期胚胎死亡数 + 晚期胚胎死亡数

$$\text{平均着床数} = \frac{\text{每组总着床数}}{\text{每组受孕雌鼠数}}$$

$$\text{早期胚胎死亡率 (\%)} = \frac{\text{每组早期胚胎死亡数}}{\text{每组总着床数}} \times 100$$

$$\text{晚期胚胎死亡率 (\%)} = \frac{\text{每组晚期胚胎死亡数}}{\text{每组总着床数}} \times 100$$

$$\text{平均早期胚胎死亡数} = \frac{\text{每组早期胚胎死亡数}}{\text{每组受孕雌鼠数}} \times 100$$

接受试样品组与对照组动物的上述指标分别用 t 检验、负二项分布、卡方检验、单因素方差分析或秩和检验法进行统计学分析。

### 6.6.3 结果的评价与判定

受试样品组受孕率或着床数明显低于阴性对照组；早期或晚期胚胎死亡率明显高于阴性对照组，并有明显的剂量—反应关系和统计学意义时，即可确认为阳性结果。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阳性。显性致死阳性表明在试验条件下受试样品对所用动物生殖细胞的具有遗传毒性。

## 7 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外，还应包括以下方面：

- 7.1 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；
- 7.2 试验方法：简述操作步骤，所用统计学方法，结果判定标准；
- 7.3 结果：中毒症状、每周每组总着床数、平均着床数、平均受孕率、早期胚胎死亡率、晚期胚胎死亡率和平均早期胚胎死亡数，剂量—反应关系、阴性对照的参考资料及历史资料、阳性对照的参考资料等。

## 8 试验结果的解释

阳性结果表明受试样品对受试动物的生殖细胞具有遗传毒性。

阴性结果表明在本试验条件下受试样品对受试动物生殖细胞无遗传毒性。

# 免疫毒性评价试验方法

## Immunotoxicity Studies

### 1 范围

本规范规定了检测化学品免疫毒性的基本原理、要求和方法。

本规范适用于检测化学品的免疫毒性。

### 2 规范性引用文件

Code of Federal Regulations, Title 40, Volume 28, PART 799, Subpart H, Sec. 799.9780 TSCA Immunotoxicity.

USEPA OPPTS Biochemicals Test Guidelines (Series 880.3550)

### 3 试验目的

评价亚慢性接触受试样品是否会产生免疫毒性。定性和定量地评价受试样品对抗体介导的免疫反应以及细胞介导的特异性和非特异性免疫反应的有害影响。

### 4 定义

4.1 抗体或免疫球蛋白 (Antibodies or Immunoglobulins, Ig) :是糖蛋白分子大家族的一部分,在抗原的刺激下由B细胞产生并与抗原特异结合。免疫反应所涉及到的免疫球蛋白有 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE。抗体存在于细胞外液,如,血清、唾液、乳汁和淋巴液中。多数抗体反应是T细胞依赖性的,即,产生抗体要依赖于功能性T和B淋巴细胞以及巨噬细胞。

4.2 分化簇 (Cluster of Differentiation, CD) : 是指在细胞表面表达的分子。CD分子具有明显的特点,存在于免疫系统的不同细胞群中。用与这些细胞表面标记物相对应的抗体(如,CD4、CD8),可以鉴别并量化各种不同的细胞群。

4.3 免疫毒性(Immunotoxicity):是指一种受试样品抑制免疫系统,从而增加感染性疾病或肿瘤发生的危险;或增加免疫系统产生不适当的免疫活性,从而引起过敏或自身免疫性疾病。本试验只规定免疫抑制毒性试验方法。

4.4 自然杀伤 (Natural Killer, NK) 细胞：是指体积较大的含有颗粒的淋巴细胞，它可非特异地溶解肿瘤细胞或含有病毒性抗原的细胞。机体被某种微生物感染后，NK 细胞很快增多，它被认为是机体预防病毒和肿瘤的第一道防线。

4.5 T 和 B 细胞 (T and B Cells)：是被特异性抗原 (外来物，一般是蛋白质) 激活的淋巴细胞。B 细胞产生抗原特异性抗体 (见“抗体或免疫球蛋白”的定义)；抗体反应常常需要 T 细胞亚群。其它的 T 细胞直接破坏细胞表面表达特异抗原 (肿瘤或感染性成分) 的细胞。

## 5 试验基本原理

免疫毒性试验，可以评价受试样品改变或损伤免疫系统的机能状态。评价指标包括：免疫组织、免疫器官的重量及细胞结构；临床对血液的生化分析；血液学检查；对体液免疫的评价；对细胞免疫的评价。不同组的动物染毒不同剂量的受试样品至少 28d，每天对动物进行观察，记录所出现的任何临床毒性表现。染毒结束后，处死动物，对上述的评价指标进行检测或分析；其中有些试验中需要用抗原将动物致敏。

## 6 试验方法

### 6.1 实验动物与饲养环境

#### 6.1.1 实验动物

优先选用大鼠或小鼠。如果使用其它种属的动物则应说明理由。雌性动物应未产、未孕。

使用健康的 6~8 周龄的动物。在评价试验结果时，雌、雄动物的体重分别均不应超过平均体重的 20%。试验时应同时使用雌雄两种性别的动物。如果已知受试样品对其中一种性别的动物更敏感，则应使用这种性别的动物。

随机将实验动物分配到各剂量组和对照组。每组至少 10 只动物，以保证检测到 20% 的动物发生改变。每只动物都应有自己的编号。死亡的动物及其保存的器官和组织、组织切片都应按照该动物的编号作记录。

#### 6.1.2 饲养环境

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笼饲养，群饲时每笼不超过 5 只。

实验动物适应环境 5d~7d 后才可开始试验。

## 6.2 受试样品的配制

首选水作赋形剂。受试样品的水溶性不好时可选用植物油作为赋形剂，也可以考虑使用其它的溶剂。赋形剂不应影响受试样品的吸收或引起毒性作用。

## 6.3 剂量设计

至少应设三个剂量组和一个阴性对照组、一个阳性对照组。高剂量应不使动物产生明显的应激、营养不良或致死性损伤；但可使动物产生一般的中毒症状（如动物的体重轻度降低）。低剂量不应产生任何免疫毒性作用的表现。阳性物采用已知的免疫抑制剂（如环磷酰胺 40mg/kg bw，腹腔注射每天一次，连续 5d）。

限量试验：在试验中，如果剂量预期达 1000 mg/kg bw·d（或吸入染毒剂量为 2mg/L）或以上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。

## 6.4 染毒

6.4.1 对于抗 SRBCs 免疫检测，受试样品、溶剂或阳性对照品的染毒时间至少为 28d。受试样品的染毒途径一般是经口给药，其接触途径也可根据人体接触的实际途径确定。

6.4.2 灌胃染毒每周 7d。从实际情况考虑，也可每周染毒 5d。如果受试样品经饮水或直接混入饲料中染毒，则应采用每周染毒 7d 的方法。受试样品在饲料中的百分含量不能超过 5%（w/w）。每天应在相同的时间灌胃，每周按照动物的体重调整灌胃量。

6.4.3 检测 SRBCs 试验，受试样品经皮染毒时，采用下述第 6.4.3.1~6.4.3.4 段的方法。

### 6.4.3.1 经皮染毒的剂量水平和剂量选择

通过本试验，得到受试样品的剂量-反应关系以及最小无作用剂量较为理想。因此，至少应设 3 个剂量组和 1 个对照组；在一定情况下，可设立溶剂对照组（使用最高剂量组中溶剂的浓度）。剂量间隔应合适，从而使各剂量组动物出现不同程度的毒性作用。所得到的数据应足够用来绘制剂量-反应曲线。

最高剂量组应出现中毒的征象，但不出现严重的皮肤刺激作用以及致死性作用，这样，我们就可以对受试样品的免疫毒性作出有意义的评价。如果所使用的受试样品产生了严重的皮肤刺激作用，则应减低它的浓度，尽管这将使高剂量组

动物所应出现的其他的中毒征象减少或缺如。如果在试验早期皮肤就被严重损伤，应终止试验，使用更低剂量。

设立中间剂量组，尽量使剂量间的毒性作用表现出梯度。

低剂量组不应出现任何毒性作用。

#### 6.4.3.2 动物备皮

试验将要开始之前，剪去动物身体表面不超过 10%的毛，是从肩胛骨开始到髌骨、两侧肋骨的上半部分区域。大约在染毒前 24h 备皮。大约间隔 1W 的时间需要重复剪毛。剪毛时应小心，避免擦伤皮肤，影响皮肤的渗透性。

#### 6.4.3.3 受试样品的配制

液体受试样品一般不用稀释直接使用。固体受试样品应被研成粉末，再用水或适当的溶剂将其潮湿以与皮肤更好地接触。使用溶剂时，应考虑溶剂对受试样品毒性及其透过皮肤能力的影响。

染毒的体积应固定不变，如大鼠应小于 1ml。不同的剂量组配制不同浓度的受试样品。

#### 6.4.3.4 染毒

染毒时间不少于 90d。

每天染毒时间不少于 6h，每周染毒 7d。从实际考虑，也可每周染毒 5d。每天在大约相同的时间染毒。

将受试样品准确地涂在染毒部位。

对于高毒性受试样品，其涂敷面积可以小一些。用薄膜完全覆盖涂敷部位。

染毒过程中，要用纱布裹住，使受试样品与皮肤保持接触，再用无刺激的胶布固定纱布，要防止动物舔食受试样品，但并不提倡固定太紧。

6.4.4 受试样品经吸入染毒时，检测抗 SRBCs 的试验的染毒时间至少为 28d。

#### 6.5 观察期限

观察期限至少为 28d。

#### 6.6 动物的观察

每天观察动物 1 次。采取适当的措施尽量弥补试验过程中动物数的缺失（如对已死亡动物进行尸体解剖；隔离或对病弱濒死的动物实施安乐死）。记录观察结果，包括如下方面：皮、毛、眼、粘膜、呼吸系统、循环系统、自主神经系统、中枢神经系统及躯体运动等中毒表现的出现时间、程度、征象持续的时间。

每周测量一次动物的体重和摄食量。

濒死动物应处死并做大体解剖。

试验结束时，称量所有动物的脾和胸腺的重量。

## 6.7 临床检验

对每只动物都应进行临床检验。动物处死前应隔夜禁食。

6.7.1 血液学检测应包括：红细胞压积、血红蛋白、红细胞计数、白细胞总数及分类、血小板计数。

6.7.2 血液生化分析应包括：血糖、谷氨酰丙酮酸转氨酶、尿素氮、白蛋白、总蛋白，必要时可进行其它的临床生化分析。

### 6.7.3 大体解剖

对每只动物都应测量体重及胸腺、脾脏的湿重。

#### 6.7.3.1 组织病理学检查

包括：胸腺、脾脏、肝脏、肺脏、肾脏、骨髓（股骨、胸骨或肋软骨部位的骨髓）、有代表性的淋巴结（粘膜附近的淋巴结或周围淋巴结）、肾上腺、垂体、卵巢或睾丸、所有肉眼可见的损伤）。

6.7.3.2 检测脾脏、胸腺和骨髓的细胞结构及细胞活力。

## 7 免疫毒性指标的测定

### 7.1 体液免疫试验

首先用抗原免疫动物，然后采用抗体形成细胞检测（Plaque Forming Cell, 简称 PFC 试验）方法或酶联免疫吸附（Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA）检测抗体滴度的方法评价受试样品对体液免疫的影响。

#### 7.1.1 抗体形成细胞检测（Plaque Forming Cell, 简称 PFC 试验）

说明亚急性接触受试样品（28d）对脾脏内产生抗体的细胞的毒性作用。将经 SRBCs 免疫 4~5d 的动物的脾脏制成单个脾细胞悬液，在半固体琼脂凝胶赋形剂中与 SRBCs 混合，在平皿或玻片上铺成薄层，置 37℃ 温育，在有补体参与下，使分泌抗体的淋巴细胞致敏周围的 SRBCs 产生溶血反应，在其周围形成一个肉眼可见的透明溶血区，称为溶血斑。本法检出的细胞主要是 IgM 抗体生成细胞，每一个空斑代表一个抗体生成细胞。

用 PFC 数/ $10^6$  个脾细胞表示。如果试验组的 PFC 数/ $10^6$  个脾细胞明显低于对照组，经统计学检验  $P < 0.05$ ，则说明体液免疫功能受抑制。

### 7.1.2 定量测定免疫球蛋白

通过该试验评价受试样品是否影响抗体对抗原的反应性。用适当的胸腺依赖性抗原 (SRBCs) 免疫动物后，经过适当的时间再次用抗原免疫动物，然后测定每只动物血清中 IgG 和 IgM 的滴度。测定抗体滴度的时间点应足够多，以便对处理组和对照组动物的初级抗体反应和次级抗体反应进行比较。测定抗体时受试样品的染毒时间为 28d。测定抗体滴度应采用 ELISA 方法。试验中应依据实验动物的种属确定给予 SRBCs 的最适剂量以及采集血清的最适时间。

7.1.3 如果受试样品可产生明显的抑制抗 SRBCs 反应的作用，可采用流式细胞技术，测量主要的淋巴细胞群 (总的 T 细胞和总的 B 细胞)、T 细胞亚群 [辅助 T 细胞 (CD4)]、细胞毒性 T 细胞 (CD8) 等细胞表面的原始标记物，从而了解受试样品对脾淋巴细胞群、外周血淋巴细胞群和 T 细胞亚群的作用。试验时，应采用针对动物种属的合适的单克隆抗体。如果受试样品对抗 SRBCs 试验没有明显的作用，则应对 NK 细胞的功能进行测试，从而了解受试样品是否具有非特异性免疫作用。需要采集血细胞或血清进行的试验 (ELISA 或流式细胞技术)，则没有必要处死动物，因为染毒 28 天后动物对绵羊血红细胞的免疫反应可能不会产生明显的像亚慢性或慢性毒性试验所出现的结果。是否有必要对每只实验动物采用流式细胞技术定量测定受试样品对主要的淋巴细胞群、T 细胞亚群的细胞数产生作用或通过测定脾 NK 细胞活力来评价受试样品对免疫系统的非特异性作用，取决于抗 SRBCs 试验的结果。如果需要开展上述的备选试验，则应在染毒的第 28 天测定细胞表面的原始标记物或 NK 细胞的活力；如果 ADME 资料证明慢性染毒更合适，则应在 28 天以后的时间点测定。

## 7.2 特异性细胞免疫反应

为了评价亚急性接触受试样品 (28d) 对特异性细胞免疫的影响，应采用下列三种方法的一种进行试验。

### 7.2.1 混合淋巴细胞培养一步法 (One-way Mixed Lymphocyte Culture (MLC))：

该方法可以证明亚急性接触受试样品 (28d) 对同源性淋巴细胞刺激引起淋巴细胞形成过程的影响。

通过测量放射性标记物 (一般为 $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶) 掺入 DNA 来说明淋巴细胞的生

成过程。用来自对照组和处理组动物脾脏的细胞，通过无菌化处理制备没有被阻断的应答细胞。

刺激细胞的制备选用未处理的同种属动物的脾脏细胞进行无菌处理，细胞的DNA合成用丝裂霉素或X线进行阻断。

测定应答细胞和刺激细胞的活力。

对照应设3份或4份，用于证明收获细胞的效益、保证刺激细胞的非反应性、测定DNA合成的基础水平。

对空白对照和溶剂对照同时进行测定。

细胞培养后掺入应答细胞的放射性标记物的量即表示淋巴细胞的生成，表示为cpm。数据表示为  $\bar{n}$  cpm, 是指刺激细胞应答细胞掺入的cpm均值减去在基本的DNA合成过程中掺入的cpm均值。

为了证明方法的灵敏性, 应设立阳性对照组, 用已知的免疫抑制剂进行处理。

#### 7.2.2 迟发型过敏 (Delayed-type Hypersensitivity , DTH) 反应:

该方法是一种体内检测受试样品对实验动物诱导性DTH的影响的方法。一般来说, 动物被胸腺依赖性抗原致敏后再次接触相同的抗原, 24~48小时后, 比较处理组和对照组DTH反应的差异。DTH检测方法有数种, 应选用对实验动物灵敏、具有可重复性的方法。不同方法中的参数, 如, 免疫及再次免疫所用的抗原的性质, 免疫性注射的次数及途径, 再次免疫的时间, 同位素的使用等。试验中对这些参数及其它相关的参数应选择适当, 以使实验动物体内产生足够的DTH反应。

#### 7.2.3 细胞毒性T淋巴细胞 (Cytotoxic T-lymphocyte, CTL) 检测:

该方法用于证明亚急性接触受试样品 (28d) 对CTL生成的影响。该试验中使用同源性肿瘤抗原对CTL进行诱导 (体内或体外诱导), 然后, 来自处理组和对照组动物的脾细胞与<sup>51</sup>Cr标记的同源肿瘤细胞共孵育, 4h后, 肿瘤细胞所释放的放射性标记物的量的多少可以说明T淋巴细胞的溶解能力的大小。应设立对照组来说明T淋巴细胞不存在时肿瘤细胞释放的放射性标记物的量, 同时也可测定放射性标记物的总的释放量。CTL检测有数种不同的方法, 引用某一种方法时应做到完全引用, 对方法进行修改时应说明对其中的哪些方面进行了修改, 合适的情况下应说明主要试剂的来源、活性和/或纯度。

### 7.3 非特异性细胞免疫反应

通过测定 NK 细胞的功能、巨噬细胞数及其吞噬作用可以评价亚急性接触（28d）受试样品对非特异性细胞免疫的影响。

### 7.3.1 NK 细胞的活性

采用染毒 28d 后, 进行检测, 处理组和未处理组动物的脾细胞与  $^{51}\text{Cr}$  标记的 YAC-1 淋巴细胞共培养。靶细胞与效应细胞共培养 4h 后, 靶细胞中释放的放射性标记物可用于测定 NK 细胞的细胞溶解能力。应设立对照性分析来说明在没有效应细胞存在时, 靶细胞释放放射性标记物的量; 也可以说明放射性标记物总的释放量。试验使用除 YAC-1 淋巴细胞之外的靶细胞也许是合适的。任何情况下都应测定靶细胞的存活力。如果对所选用的试验方法作了一些修改, 对所作的有关修改应进行公开报道, 适当的情况下, 应说明试剂的来源、活性和/或纯度。对每一种试验步骤的修改都应证明其合理和合法性。

### 7.3.2 巨噬细胞检测

该试验可以评价亚急性接触（28d）受试样品对巨噬细胞数及其吞噬功能的影响。试验中应计数腹膜细胞的总数及分类数; 评价在有或没有促进因子（如,  $\gamma$ -干扰素或细菌脂多糖）存在的情况下腹膜细胞对颗粒（如, 荧光乳液珠）的吞噬作用。有数种不同的巨噬细胞检测方法, 如果对所选用的试验方法作了一些修改, 对所作的有关修改应进行公开报道并说明修改的合理和合法性。

## 7.4 计数脾以及外周血中总的 B 淋巴细胞数、总的 T 淋巴细胞数、总的 T 细胞亚群的数

在染毒至少 28d 后, 采用流式细胞技术, 对脾或外周血的总的 B 淋巴细胞、总的 T 淋巴细胞、总的 T 细胞亚群的细胞表面标记物进行测定。如果受试样品的 ADME 资料证明染毒更长的时间比较合适, 则应在 28d 以后的时间点进行测定。染毒时间超过 28d 时, 如果也需要开展受试样品的亚慢性毒性试验（90d 经口、经皮、经呼吸道染毒的毒性试验）, 那么, 该试验可与亚慢性毒性试验结合起来做。

## 7.5 结果处理

应将数据汇总成表格。表格中应包括试验开始时各试验组的动物数, 出现毒性作用的动物数, 毒作用的类型、发生各种类型毒作用的动物的百分比。所有观察到的结果, 无论是计量资料还是计数资料, 都应采用适当的统计学方法进行评估。

## 7.6 结果的评价

免疫毒性试验结果评价应包括如下内容：受试样品的剂量与动物的异常（包括行为的或临床症状的异常，大体损伤，可识别的靶器官，体重改变，致死作用，以及任何其他的普遍或特异的毒性作用）出现或缺如、异常发生率以及异常的严重程度之间的关系。合理的试验设计将有助于正确估计受试样品的无作用剂量水平。

## 8 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外，还应包括以下方面：

- 8.1 脾和胸腺的绝对和相对重量；
- 8.2 免疫毒性试验的结果。

## 9 试验结果的解释

免疫毒性试验能够提供受试样品对实验动物的免疫毒性资料。虽然其试验结果仅能有限地外推到人，但它可为确定人群暴露的无作用水平和允许暴露水平提供有价值的信息。

# 亚急性吸入（14/28 天）毒性试验

## Sub-acute Inhalation Toxicity Test

### 1 范围

本规范规定了啮齿类动物亚急性吸入（14/28 天）毒性试验的基本原则、要求和办法。

本规范适用于检测化学品亚急性吸入（14/28 天）毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No. 412, May. 1981)

### 3 试验目的

为获得一定时期内反复多次吸入染毒受试样品而引起的健康危害,以明确化学物对动物的蓄积作用及其靶器官,并确定其最大无作用剂量和最低有作用剂量,为亚慢性、慢性毒性或致癌试验的剂量设计提供依据。

### 4 定义

4.1 亚急性吸入毒性 (Subacute Inhalation Toxicity): 实验动物在 14~28 天内,每日经呼吸道接触受试样品后所引起的健康损害效应。

4.2 剂量 (Dose): 是指受试样品在染毒柜中的设计浓度,以单位体积的受试样品的质量来表示 ( $\text{mg}/\text{m}^3$ )。

4.3 蓄积毒性 (Cumulative Toxicity): 受试样品在体内蓄积引起的有害效应,蓄积有两种形式:(1) 物质蓄积,即长期反复接触受试样品时,由于吸收速度超过消除速度导致的该物质在体内逐渐增多;(2) 功能蓄积,即受试样品虽然在体内的代谢和排出速度较快,但其造成的损伤恢复慢,在前一次的损伤未恢复前又发生新的损伤,如此残留损伤的累积称为功能蓄积。

4.4 无可见有害作用水平 (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL): 在规定的试验条件下,用现有的技术手段或检测指标未观察到任何与受试样品有关的毒性作用的最大染毒浓度。

4.5 最低可见有害作用水平 (Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL):

在规定的试验条件下，受试样品引起实验动物形态、功能、生长发育等发生有害改变的最低染毒浓度。

4.6 附加组 (Satellite Group): 指在试验中增设的一组，该组实验动物数与其他组相同，染毒剂量与最高剂量组相同，在高剂量组染毒停止后需继续观察 14d，以研究毒作用的可逆性、持续性和迟发效应。

## 5 试验基本原则

实验动物分成几个吸入浓度梯度的组别，每组一个浓度，连续吸入染毒 14 天或 28 天。染毒期间每日密切观察动物的毒性反应，期间死亡或试验结束被处死的动物要进行解剖。

由于 14 天与 28 天重复吸入试验，除在染毒时间长短上和临床及病理结果程度上有所不同外，余者基本相同，二者同属短期试验，因此本准则适用于以上两个试验。

## 6 试验方法

### 6.1 受试样品

尽量使用物理方法，使受试样品能在空气中保持一定浓度，并能持续较长的时间。必要时使用无毒、不与受试样品反应并不影响受试样品吸收的赋形剂。

### 6.2 实验动物和饲养环境

#### 6.2.1 种系

可使用多种实验动物，首选大鼠。实验动物应是常规实验动物品系的健康年轻动物。染毒开始时，动物体重的差异不得超过平均体重的 20%。

#### 6.2.2 饲养环境

动物可单笼饲养或按性别群养，大鼠群养时每笼不超过 5 只，以不干扰动物个体活动及观察反应为度。动物实验室应符合国家相应规定。

### 6.3 剂量设计

动物应随机分配到试验组与对照组中。试验至少设三个剂量组和一个对照组，还可增设一个附加组，每组至少应有 10 只（雌雄各半）皮肤健康的动物。若计划在试验过程中处死动物，应增加动物数。最高染毒剂量的设计应为引起动

物明显毒效应但不造成动物死亡，中间剂量应引起较轻的可观察到的毒性效应，低剂量应不出现任何毒效应。剂量组的剂量间距以 2~4 倍为宜。对照组除不接触受试样品外，其它条件应与染毒组完全相同。必要时可设赋形剂对照组，以研究赋形剂的影响。对照组中赋形剂的浓度可采用高浓度组的赋形剂用量。如染毒后出现严重的呼吸道刺激症状，则应降低受试样品的浓度，即使高剂量组由于浓度的降低导致了其它毒性反应的明显下降或消失，也应如此。如试验初就出现严重呼吸道刺激症状，应停止试验并以较低浓度进行新的试验。

如受试样品具有爆炸性，所用浓度应低于其爆炸浓度。

#### 6.4 染毒装置

亚急性吸入毒性试验必须采用动式染毒设备。染毒时，染毒柜内应每小时换气 12~15 次，含氧量应为 19%，染毒气体在柜内应分布均匀。应使柜内保持轻度负压状态，以防止受试样品从柜内逸出。染毒柜内动物应避免过于拥挤，尽量使其暴露于受试样品，动物的总体积不应超过染毒柜总容积的 5%。为避免经口和经皮接触，也可采用仅口一鼻或仅头部暴露的方式。

应在试验前确定和建立柜内空气中受试样品浓度的监测控制方法和空气流量调节，以保证整个设备的条件基本一致。

染毒过程中应进行染毒柜中气流流速、温度、湿度、受试样品浓度、颗粒物粒度、分散度的测定，并保持试验中上述各因素水平恒定。

染毒时装置内温度最好保持在  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，相对湿度为 40~70%。但有时由于受试样品状态（如气溶胶）的要求，此条件可适当变化，并注明。

#### 6.5 受试样品输入染毒柜的方法

不同形态的可选择不同的方法输入：

6.5.1 气体受试样品，经流量计与空气混合成一定浓度后，直接输入染毒柜。

6.5.2 易挥发液体受试样品，通过空气鼓泡或适当加热促使挥发后输入染毒柜。

6.5.3 对一些液体、固体粉末，采用适当方式雾化成气溶胶后输入染毒柜。

#### 6.6 试验步骤

取已在试验适应环境至少 3d 的实验动物称重，然后放入染毒柜中染毒，除有特殊要求外，一般应每日吸入染毒 6h。柜内受试样品浓度恒定后开始染毒。吸入染毒每周 7d，连续染毒 14 或 28d。考虑到实际工作情况，也可每周染毒 5d。在染毒期间应停止供食供水。

## 6.7 试验观察

### 6.7.1 临床观察

观察期限一般为 14/28d, 每天观察一次, 观察并记录皮肤、被毛、眼、粘膜的改变和呼吸系统、循环系统、神经系统、肢体活动、行为方式等变化发生的时间、程度和持续时间, 特别注意观察并记录呼吸系统的变化。

如发现动物死亡或濒危应及时解剖或冷藏后解剖检查, 以减少动物同类互残及死后组织自溶。

### 6.7.2 体重和摄食量

每日测量一次饲料消耗量, 每周测体重一次。

### 6.7.3 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、血球容积<sup>\*</sup>, 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。

### 6.7.4 临床血液生化检查

在试验结束时进行。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, 还须检测与肝或其它器官有关的酶和胆酸, 以及脂类化合物、激素、高铁血红蛋白、胆碱脂酶 (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。还可增加其它脏器以进一步对观察到的毒性反应进行研究。

### 6.7.5 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。

### 6.7.6 大体解剖

所有动物皆应进行大体解剖, 内容应包括体表、体腔的各开口处, 颅、胸、腹腔及其内容物。肝、肺、肾、肾上腺、睾丸 (卵巢)、附睾、脾、脑、心脏应在分离后尽快称重, 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、睾丸的绝对重量和相对重量 (脏器系数=脏器重

量/体重×100%)为必测指标,必要时加测其他脏器重量和脏器系数。应详细检查呼吸道的损害情况。

#### 6.7.7 病理组织学检查

凡符合以下条件的皆应进行组织病理学检查:

6.7.7.1 高浓度组与对照组的器官和组织。

6.7.7.2 各组动物大体解剖有异常发现的器官和组织。

6.7.7.3 如高剂量组动物的器官或组织有组织病理学病变,则应扩展至其它剂量组和相应器官和组织。

6.7.7.4 怀疑发生感染的动物的肝、肺、肾。

6.7.7.5 附加组动物被其他试验证明有病变的器官和组织。

#### 6.8 结果统计与分析

##### 6.8.1 结果处理

试验结果以表格形式总结,内容包括:各组动物数、出现毒效应的动物数、毒效应的类型和出现每种毒效应动物的百分比。采用适当的统计学方法进行评价。

##### 6.8.2 结果评价

综合临床观察、临床检查、大体解剖、组织病理学检查的结果,对受试样品吸入14/28d染毒有无毒作用及其毒作用特点,包括受试样品的靶器官、蓄积毒性等做出初步评价;对是否需要进行更长时间的毒理学试验及其剂量和观察指标提出建议。如发现试验组与对照组有显著性差异或能得出剂量—效应或剂量—反应曲线时,应对无可见有害作用浓度(NOEL)和最低可见有害作用浓度(LOEL)作出初步评价。

## 7 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外,还应包括以下方面:

7.1 受试样品及赋形剂的有关理化特性、受试样品的给与方法及浓度、染毒柜中实际测得的受试样品浓度、用标准方法测得的受试样品颗粒物粒度和分散度(均要求均数、标准差、变异系数)。

7.2 试验环境、所用设备及其它条件如试验时染毒柜中温湿度、气流流速等的介绍。

7.3 各组动物染毒开始时间、结束时间、染毒方式、毒物浓度及测定方法的介绍，染毒过程的描述。

7.4 观察次数及持续时间，分性别和观察组描述观察中发现症状出现、消失的时间，对症状特点的文字描述，动物体重及变化，动物死亡及剖检的时间，大体解剖及病理检查所见病变特点的详细文字描述，血液及生化结果并附参考正常值，食物消耗量。

7.5 统计学分析方法及各种效应的频数、发生率或均值及标准差的计算结果。

7.6 有可能时绘出剂量-效应或剂量-反应曲线。

## 8 试验结果的解释

本项试验结果可提供亚急性吸入（14/28d）染毒的毒作用资料。其结果外推至人的有效性有限。

# 亚急性经皮 (21/28 天) 毒性试验

## Sub-acute Dermal Toxicity Test

### 1 范围

本规范规定了动物亚急性经皮毒性试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品的亚急性经皮毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No. 410, May 1981)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.3200, June 1996)

### 3 试验目的

为获得一定时期内反复多次经皮染毒受试样品而引起的健康危害,以明确化学物对动物的蓄积作用及其靶器官,并确定其最大无作用剂量和最低有作用剂量,为亚慢性、慢性毒性或致癌试验的剂量设计提供依据。

### 4 定义

4.1 亚急性经皮毒性 (Subacute Dermal Toxicity): 实验动物在 14~28 天内,每日经皮接触受试样品后所引起的健康损害效应。

4.2 蓄积毒性 (Cumulative Toxicity): 受试样品在体内蓄积引起的有害作用,蓄积有两种形式: (1) 物质蓄积,即长期反复接触受试样品时,由于吸收速度超过消除速度导致的该化学品在体内逐渐增多; (2) 功能蓄积,即受试品虽然在体内的代谢和排出速度快,但其造成的损伤恢复慢,在前一次的损伤未恢复前又发生新的损伤,如此残留损伤的累积称为功能蓄积。

4.3 无可见有害作用水平 (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL): 在规定的试验条件下,用现有的技术手段或检测指标未观察到任何与受试样品有关的毒性作用的最大染毒剂量。

4.4 最低可见有害作用水平 (Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL): 在规定的试验条件下,受试样品引起实验动物形态、功能、生长发育等发生有害改变的最低染毒剂量。

4.5 附加组(Satellite Group): 指在试验中增设的一组, 该组实验动物数与其他组相同, 染毒剂量与最高剂量组相同, 在高剂量组染毒停止后需继续观察 14d, 以研究毒作用的可逆性、持续性和迟发效应。

## 5 试验基本原则

在 21d 或 28d 内, 以不同剂量受试样品每日给各组实验动物连续经皮染毒, 染毒期间每日密切观察动物的毒性反应, 期间死亡或试验结束被处死的动物要进行解剖。

## 6 试验方法

### 6.1 受试样品

液态受试样品一般使用原液。固体受试样品应研磨, 过 100 目筛, 并用水或其它无毒、无刺激性、不影响其经皮吸收、也不与受试样品反应的赋形剂配制成溶液或混悬液, 以保证受试样品与皮肤的良好接触。

### 6.2 实验动物和饲养环境

#### 6.2.1 实验动物

一般选用健康成年大鼠、家兔或豚鼠, 其它种属动物亦可使用, 但须说明理由。大鼠体重应为 200~300g; 豚鼠 350~450g; 家兔 2.0~3.0kg, 以保证足够的染毒面积。

#### 6.2.2 饲养条件

动物最好单笼饲养, 大鼠群养时每笼不超过 5 只。动物实验室应符合国家相应规定。

### 6.3 剂量设计

动物应随机分配到试验组与对照组中。试验至少设三个剂量组和一个对照组, 还可增设一个附加组, 每组至少应有 10 只(雌雄各半)皮肤健康的动物。若计划在试验过程中处死动物, 应增加动物数。最高染毒剂量的设计应为引起动物明显毒效应但不造成动物死亡, 中间剂量应引起较轻的可观察到的毒性效应, 低剂量应不出现任何毒效应。剂量组的剂量间距以 2~4 倍为宜。对照组除不接触受试样品外, 其它条件应与染毒组完全相同。如皮肤染毒后出现严重的皮肤刺

激症状，则应降低受试样品的浓度，即使高剂量组由于浓度的降低导致了其它毒性反应的明显下降或消失，也应如此。如试验初皮肤就出现严重损伤症状，应停止试验并以较低剂量进行新的试验。

如果试验中接触水平超过每天 1000mg/kg. bw 尚不能引起可观察到的毒性反应，并且根据文献资料能证明类似结构的化学物质亦不产生明显毒性，就不需要用三个剂量组来进行试验。

#### 6.4 试验步骤

选择在试验环境至少适应 3d 的健康动物。染毒前 24h，将动物躯干背部染毒区的被毛去除，去毛时应小心不可损伤动物皮肤，以免引起皮肤通透性的改变。此后视动物被毛生长情况，大约每周要对染毒部位去毛，各组的去毛时间和去毛面积应相同。受试样品应尽可能薄而均匀地涂敷于整个染毒区域，染毒部位的面积约相当于动物体表面积的 10%，应通过对动物体重的测定确定染毒部位的面积，若受试样品毒性较大，可相对减小染毒区域的面积。应使用玻璃纸和无刺激的胶带将受试样品固定，以保证受试样品与皮肤有良好的接触和防止受试样品脱落。染毒时还应采用必要的措施防止动物舔食受试样品，如对动物进行固定时，应有一定程度的松动。但不推荐完全限制动物活动的方法。

每天染毒 6h，染毒后用适宜的清洁剂清洗，每周染毒 7d，持续 21d 或 28d。但考虑到实际工作情况，也可每周染毒 5d。

#### 6.5 试验观察

##### 6.5.1 临床观察

观察期限一般为 21/28d，每天观察一次，观察并记录皮肤、被毛、眼、粘膜的改变和呼吸系统、循环系统、神经系统、肢体活动、行为方式等变化发生的时间、程度和持续时间。

如发现动物死亡或濒危应及时解剖或冷藏后解剖检查，以减少动物同类互残及死后组织自溶。

##### 6.5.2 体重和摄食量

每日测量一次饲料消耗量，每周测体重一次。

##### 6.5.3 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、血球容积<sup>\*</sup>，

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。

#### 6.5.4 临床血液生化检查

在试验结束时进行。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，还须检测与肝或其它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。还可增加其它脏器以进一步对观察到的毒性反应进行研究。

#### 6.5.5 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。

#### 6.5.6 大体解剖

所有动物皆应进行大体解剖，内容应包括体表、体腔的各开口处，颅、胸、腹腔及其内容物。肝、肺、肾、肾上腺、睾丸（卵巢）、附睾、脾、脑、心脏应在分离后尽快称重，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、睾丸的绝对重量和相对重量（脏器系数=脏器重量/体重 X100%）为必测指标，必要时加测其他脏器重量和脏器系数。应详细检查染毒区皮肤和非染毒区皮肤的损害情况。

#### 6.5.7 病理组织学检查

凡符合以下条件的皆应进行组织病理学检查：

6.5.7.1 所有最高剂量组和对照组动物的肝、肺、肾及染毒区及非染毒区皮肤等重要的和可能受到损伤的器官或组织；

6.5.7.2 如高剂量组动物的器官或组织有病理组织学的变化，则应检查中、低剂量组的相应器官和组织；

6.5.7.3 各剂量组大体解剖有异常的器官和组织；

6.5.7.4 附加组动物的被其它试验组证明有病变的器官和组织。

## 6.6 结果统计与评价

### 6.6.1 结果处理

试验结果以表格形式总结，内容包括各组动物数、出现损伤的动物数、损伤的类型和每种损伤动物的百分比。采用适当的统计学方法进行评价。

### 6.6.2 结果评价

综合临床观察、临床检查、大体解剖、组织病理学检查的结果，对受试样品经皮 21/28d 染毒有无毒作用及其毒作用特点，包括受试样品的靶器官、蓄积毒性等做出初步评价；对是否需要进行更长时间的毒理学试验及其剂量和观察指标提出建议。如发现试验组与对照组有显著性差异或能得出剂量-效应或剂量-反应曲线时，应对无可见有害作用水平(NOEL)和最低可见有害作用水平(LOEL)作出初步评价。

## 7 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外，还应包括以下方面：

- 7.1 受试样品及赋形剂的有关理化特性，受试样品的配制方法。
- 7.2 各组动物染毒开始时间、结束时间，染毒方法介绍，染毒过程的描述，染毒剂量的选择。
- 7.3 观察次数及持续时间，依动物的性别、组别观察试验中症状出现、消失的时间，对症状特点的文字描述，食物消耗量及体重变化，各性别组别动物的毒性反应资料，血液检查及参考正常值，生化检查及正常值，动物死亡及剖检的时间，大体解剖及病理检查所见病变特点的描述。
- 7.4 各种毒性反应的频数、发生率及检测指标的均值和标准差。
- 7.5 所用统计学分析方法及计算结果。
- 7.6 可能时绘出剂量-效应或剂量-反应曲线。

## 8 试验结果的解释

本项试验结果可提供亚急性经皮(21/28d)染毒的毒作用资料。其结果外推至人的有效性有限。

# 亚急性经口（14/28d）毒性试验

## Sub-acute Oral Toxicity Test

### 1 范围

本规范规定了啮齿类动物亚急性经口（14/28d）毒性试验的基本原则、要求和方法。本规范适用于检测化学品的亚急性经口（14/28d）毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No.407, July 1995)

### 3 试验目的

为获得一定时期内反复多次经口染毒受试样品而引起的健康危害,以明确化学物对动物的蓄积作用及其靶器官,并确定其最大无作用剂量和最低有作用剂量,为亚慢性、慢性毒性或致癌试验的剂量设计提供依据。

### 4 定义

4.1 亚急性经口毒性 (Subacute Oral Toxicity): 实验动物在 14~28 天内,每日经口接触受试样品后所引起的健康损害效应。

4.2 剂量 (Dose): 是指经口给予受试样品的量,以重量 g 或 mg 表示,或是实验动物单位体重的受试样品的量 (mg/kg bw)。

4.3 蓄积毒性 (Cumulative Toxicity): 受试样品在体内蓄积引起的有害作用,蓄积有两种形式: (1) 物质蓄积,即长期反复接触受试样品时,由于吸收速度超过消除速度导致的该化学品在体内逐渐增多; (2) 功能蓄积,即受试品虽然在体内的代谢和排出速度快,但其造成的损伤恢复慢,在前一次的损伤未恢复前又发生新的损伤,如此残留损伤的累积称为功能蓄积。

4.4 无可见有害作用水平 (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL): 在规定的试验条件下,用现有的技术手段或检测指标未观察到任何与受试样品有关的毒性作用的最大染毒剂量。

4.5 最低可见有害作用水平 (Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL):

在规定的试验条件下，受试样品引起实验动物形态、功能、生长发育等发生有害改变的最低染毒剂量。

4.6 附加组 (Satellite Group): 是在试验中增设的一组，该组实验动物数与其他组相同，染毒剂量与最高剂量组相同，在高剂量组染毒停止后需继续观察 14d，以研究毒作用的可逆性、持续性和迟发效应。

## 5 试验基本原则

以不同剂量受试样品每日给各组实验动物连续经口染毒 28d，但在某些情况下，也可进行染毒 14d。染毒期间每日密切观察动物的毒性反应，期间死亡或试验结束被处死的动物要进行解剖。

## 6 试验方法

### 6.1 受试样品

根据试验的目的和受试样品的理化特性，经口染毒可采用灌胃、或将受试样品混入饲料、饮水等方式。受试样品应溶解或悬浮于适宜的赋形剂中，建议首选水，其次是植物油（如玉米油），或考虑使用其它赋形剂（如羧甲基纤维素、明胶、淀粉等）。对水以外的赋形剂，应先了解其毒理特性。应确定受试样品在溶液中的稳定性。

### 6.2 实验动物和饲养环境

#### 6.2.1 实验动物

一般首选健康成年大鼠，其它啮齿类动物也可使用。雌性动物应是未交配过的。大鼠以 6~8 周龄（150g 左右）为宜，最大鼠龄不超过 9 w。在试验开始时，同性别动物体重之间相差不得超过平均体重的 20%。

#### 6.2.2 饲养环境

试验前动物应在清洁级动物房试验环境中适应 3d，再随机分配到各试验组和对照组中。

动物最好单笼饲养，大鼠群养时每笼不超过 5 只。动物实验室应符合国家相应规定。

### 6.3 剂量设计

动物应随机分配到试验组与对照组中。试验时至少设三个剂量组和一个对照

组，还可增设一个附加组，每组实验动物至少应有 10 只（雌雄各半）。若计划在试验过程中处死动物，应增加动物数。最高染毒剂量的设计应为引起动物明显毒效应但不造成动物死亡，中间剂量应引起较轻的可观察到的毒性效应，低剂量应不出现任何毒效应。剂量组的剂量间距以 2~4 倍为宜。对照组除不接触受试样品外，其它条件应与染毒组完全相同。

如果试验中接触水平超过每天 1000mg/kg. bw 尚不能引起可观察到的毒性反应，并且根据文献资料能证明类似结构的化学物质亦不产生明显毒性，就不需要用三个剂量组来进行试验。经饮水或喂饲染毒，应以动物体重调整受试样品在水或饲料中的浓度。

#### 6.4 试验步骤

每周染毒 7d，连续 28d。通过调整受试样品溶液浓度使各剂量组经口染毒的容量一致。

以喂饲或饮水方式染毒，受试样品的混入应不影响正常的营养。应根据染毒剂量和动物体重配制饲料中受试样品的浓度（mg/kg）；灌胃染毒时，每周称体重一次，以作为调整受试样品给药量的依据。

#### 6.5 试验观察

##### 6.5.1 临床观察

观察期限一般为 28d，每天一次，观察并记录皮肤、被毛、眼、粘膜的改变和呼吸系统、循环系统、神经系统、肢体活动、行为方式等变化发生的时间、程度和持续时间。如发现动物死亡或濒危应及时解剖或冷藏后解剖检查，以减少动物同类互残及死后组织自溶。

##### 6.5.2 体重和摄食量

每日测量一次饲料或饮水消耗量，每周测体重一次。

##### 6.5.3 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、血球容积<sup>\*</sup>，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。

##### 6.5.4 临床血液生化检查

在试验结束时进行。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, 还须检测与肝或其它器官有关的酶和胆酸, 以及脂类化合物、激素、高铁血红蛋白、胆碱脂酶(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。还可增加其它脏器以进一步对观察到的毒性反应进行研究。

#### 6.5.5 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。

#### 6.5.6 大体解剖

所有动物皆应进行大体解剖。检查体表、体腔的各开口处, 颅、胸、腹腔及其内容物。肝、肺、肾、肾上腺、睾丸(卵巢)、附睾、脾、脑、心脏等脏器应尽快称重, 以防水分丢失。计算脏器系数。

#### 6.5.7 病理组织学检查

6.5.7.1 所有最高剂量组和对照组动物、大体解剖检查有异常的脏器或组织;

6.5.7.2 如高剂量组动物的器官或组织有病理组织学的变化, 则应检查中、低剂量组的相应器官和组织;

6.5.7.3 各剂量组大体解剖有异常的器官和组织;

6.5.7.4 附加组动物的被其它试验组证明有病变的器官和组织。

### 6.6 结果统计与评价

#### 6.6.1 结果处理

试验结果以表格形式总结, 内容包括各组动物数、出现损伤的动物数、损伤的类型和每种损伤动物的百分比。采用适当的统计学方法进行评价。

#### 6.6.2 结果评价

综合临床观察、临床检查、大体解剖、组织病理学检查的结果, 对受试样品经口 28 天染毒有无毒作用及其毒作用特点, 包括受试样品的靶器官、蓄积毒性等做出初步评价; 对是否需要进行更长时间的毒理学试验及其剂量和观察指标提出建议。如发现试验组与对照组有显著性差异或能得出剂量—效应或剂量—反应曲线时, 应对无可见有害作用剂量(NOEL)和最低可见有害作用剂量(LOEL)初步评价。

## 7 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外，还应包括以下方面：

- 7.1 受试样品的配制方法：受试样品掺入饲料和水中的方法及剂量转换的有关计算公式。
- 7.2 动物的分组情况及对照组的选择。染毒剂量的选择。
- 7.3 各组动物染毒开始时间、试验开始时的平均体重、结束时间，染毒方法介绍，染毒过程的描述、染毒过程中动物体重的变化及动物饲料、水的消耗量。
- 7.4 观察次数及持续时间，依动物的性别、组别观察试验中症状出现、消失的时间，症状特点的文字描述，动物死亡及剖检的时间，处死动物的体重及各器官的重量，大体解剖及病理检查所见病变特点的详细文字描述，血液及生化结果并附参考正常值。
- 7.5 各种效应的频数、发生率或均值及标准差。
- 7.6 所用统计学分析方法及计算结果。
- 7.7 可能时绘出剂量-效应或剂量-反应曲线。

## 8 试验结果的解释

本项试验结果可提供亚急性经口（28天）染毒的毒作用资料。其结果外推至人的有效性是有限的。

## 大鼠肝微粒体酶的诱导和 S<sub>9</sub> 的制备

### 1 诱导

最广泛应用的大鼠肝微粒体酶的诱导剂是多氯联苯 (PCB 混合物), 选择健康雄性大鼠体重 200g 左右, 一次腹腔注射诱导剂 500mg/kg. 诱导剂溶于玉米油中, 浓度为 200mg/ml。

### 2 S<sub>9</sub> 制备

动物诱导后第五日段头处死. 处死前 12h 停止饮食, 但可自由饮水。首先, 用 75%酒精消毒动物皮部, 剖开腹部. 在无菌条件下, 取出肝脏, 去除肝脏的结缔组织, 用冰浴的 0.15mol/L 氯化钾淋洗肝脏, 放入盛有 0.15mol/L 氯化钾溶液的烧杯里. 按每克肝脏加入 0.15mol/L 氯化钾溶液 3ml. 用电动匀浆器制成肝匀浆, 再在低温高速离心机上, 在 4℃ 条件下, 以 9000-g 离心 10min, 取其上清液 (S<sub>9</sub>) 分装于塑料管中. 每管装 2~3ml. 储存于液氮生物容器中或 -80℃ 冰箱中备用。

上述全部操作均在冰水浴中和无菌条件下进行。制备肝 S<sub>9</sub> 所用一切手术器械、器皿等, 均经灭菌消毒。S<sub>9</sub> 置备后, 其活力需经诊断性诱变剂进行鉴定。

## 第三阶段试验

# 亚慢性吸入毒性试验

## Subchronic Inhalation Toxicity Test

### 1 范围

本规范规定了啮齿类动物亚慢性吸入毒性试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品的亚慢性吸入毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No. 413, 12 May 1981)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.3465, June 1996)

### 3 试验目的

确定一定时期内经呼吸道反复接触受试化学物引起的毒性效应,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。

### 4 定义

4.1 亚慢性吸入毒性 (Subchronic Inhalation Toxicity): 是指在实验动物部分生存期 (不超过 10% 寿命期) 内, 反复经呼吸道接触受试样品后所引起的健康损害效应。

4.2 无可见有害作用水平 (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL): 在规定的试验条件下, 用现有的技术手段或检测指标未观察到任何与受试样品有关的毒性作用的最大染毒浓度。可用动物每日接触单位体积空气受试样品的质量 ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) 表示。

4.3 最低可见有害作用水平 (Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL): 在规定的试验条件下, 受试样品引起实验动物形态、功能、生长发育等发生有害改变的最低染毒浓度。可用动物每日接触单位体积空气受试样品的质量 ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) 表示。

4.4 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。

## 5 试验基本原则

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（90d），有时候可根据需要染毒 6 个月（180d）。如使用溶剂或其它赋形剂，需设溶剂（赋形剂）对照组。试验期间每日观察动物的毒性反应。在染毒期间死亡的动物要进行尸检。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

在开始本试验之前，应尽量搜集受试样品现有的各种资料。

6.1.1 受试样品的商品名和其他名称（包括 CAS 号）。

6.1.2 受试样品的结构式、分子式和分子量。

6.1.3 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、稳定性、ppm 和  $\text{mg}/\text{m}^3$  换算系数、光化学性质、电离度、粒度等）。

6.1.4 受试样品的分析方法，

6.1.5 受试样品的生产方法、合成路线和杂质。

6.1.6 储存方法：要有长期储存受试样品（包括在赋形剂或饲料中）的合适方法。否则需定期制备新鲜样品。

6.1.7 人类每日可能接触的水平

6.1.8 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，如果较粘稠难以雾化，可加入赋形剂作适当稀释。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粉尘（粒径 $\leq 5\mu$ ）；也可将固体受试样品溶解至适当的溶剂（赋形剂）中雾化后染毒。水是首选的赋形剂，若采用其它赋形剂，应考虑其毒性和刺激性等，并按要求设赋形剂对照。

### 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 6~8 周龄的大鼠。也可使用其它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%。染毒开始前至少要有 5d 时间使实验动物适应实验室饲养环境，并在这段时间内观察实验动物的状态。若本试验为其它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。若计划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，其它条件均与染毒组相同。最高染毒浓度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，则最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)，与最高浓度组一同染毒，在全程染毒结束后继续观察一段时间(一般不少于 28d)，以了解毒性作用的持续性、可逆性或迟发毒作用。但必须注意，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它各组条件的一致(参见 6.6)，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 4~6h，每周 5d。按环境污染物接触方式为每天 23h；留下 1h 给动物喂食和清理染毒柜，每周 7d。受试样品浓度以  $\text{mg}/\text{m}^3$  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物的模式较一致；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，大鼠为30 L/h，小鼠为3 L/h；染毒柜换气次数12~15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。

以下各项包括检查项目和试验结果的评价等可参考亚慢性经口毒性试验，但肺和气管病理检查为必检指标；鉴定报告需提供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。

# 亚慢性经皮毒性试验

## Subchronic Dermal Toxicity Test

### 1 范围

本规范规定了啮齿类动物亚慢性经皮毒性试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品的亚慢性经皮毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (NO. 411, 12 May 1981)

USEPA OPPTS Health effects test guidelines (Series 870-3250, 1996)

### 3 试验目的

确定一定时期内经皮反复接触受试化学物引起的毒性效应, 提供经皮毒作用靶器官的无作用剂量水平, 为确定慢性经皮毒性试验的剂量提供依据。

### 4 定义

4.1 亚慢性经皮毒性(Subchronic Dermal Toxicity): 是指在实验动物部分生存期内, 每日反复经皮接触受试样品后所引起的健康损害效应。

4.2 无可见有害作用水平(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL): 在规定的试验条件下, 用现有的技术手段或检测指标未观察到任何与受试样品有关的毒性作用的最大染毒剂量。

4.3 最低可见有害作用水平(Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL): 在规定的试验条件下, 受试样品引起实验动物形态、功能、生长发育等发生有害改变的最低染毒剂量。

4.4 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。

### 5 试验基本原则

各组实验动物每日经皮肤接触不同剂量的受试样品, 连续染毒 3 个月(90d),

有时候可根据需要染毒 6 个月（180d），染毒期间每日观察动物的毒性反应。在染毒期间死亡的动物要进行尸检。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 在开始本试验之前，应尽量收集受试样品现有的各种资料。

6.1.1 受试样品的商品名和其他名称（包括 CAS 号）。

6.1.2 受试样品的结构式、分子式和分子量。

6.1.3 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）。重要的参数还包括脂水分配系数、稳定性（包括在赋形剂中）等。

6.1.4 受试样品的分析方法。

6.1.5 受试样品的生产方法、合成路线和杂质。

6.1.6 储存方法：要有长期储存受试样品（包括在赋形剂中）的合适方法。否则需定期制备新鲜样品。

6.1.7 人类可能接触的途径或水平。

### 6.2 受试样品

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。

若受试样品为固体，应将其粉碎、过 100 目筛并用适当的赋形剂充分湿润，以保证受试样品与皮肤有良好的接触。水是首选的赋形剂，若采用其它赋形剂，应考虑其毒性和刺激性，并应考虑赋形剂对受试样品皮肤通透性的影响。液体受试样品一般不用稀释。

### 6.3 实验动物和饲养环境

#### 6.3.1 动物的选择和观察

首选初成年大鼠，也可使用其它种属如家兔或豚鼠进行试验。动物要有合适体重以保证足够的涂皮面积，如大鼠 200~300g，兔 2~3kg，豚鼠 350~450 克等，但动物体重的变动范围不应超出平均体重的 20%。染毒开始前至少要有 5d

时间使实验动物适应动物室饲养环境，并在这段时间内观察实验动物的状态。

### 6.3.2 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，皮肤健康，雌性动物必须未曾怀孕。若计划在试验过程中处死动物，则应增加计划处死的动物数。

6.3.3 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。

### 6.4 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，其它条件均与染毒组相同。最高染毒剂量应使动物产生较明显的毒性效应，不引起过多动物死亡(死亡率不应超过 10%)，低剂量组应不出现任何毒性作用。若掌握人群接触水平，则最低染毒剂量应高于人群的实际接触水平。如剂量设计得当，中剂量组会引起较轻的毒性效应，若设多个中剂量组时，应产生不同程度的毒性效应。

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

若受试样品引起严重的皮肤刺激效应，应降低受试样品的使用浓度，尽管这样可导致原来在高浓度(或高剂量)下出现的其它毒性作用减弱或消失。若试验早期动物的皮肤受到严重损伤，则应终止试验，并降低低浓度重新开始试验。

本试验中，如果每天接触水平超过 1000mg/kg bw 时仍未产生可观测到的毒性效应，而且可以根据相关结构化合物预期受试样品毒性时，可考虑不必进行三个剂量水平的全面试验观察。

### 6.5 试验方法

染毒前 24h，将动物躯干背部染毒区的被毛去除，去毛时应小心不可损伤动物皮肤，以免引起皮肤通透性的改变。此后视动物被毛生长情况，大约每周要对染毒部位去毛，各组的去毛时间和去毛面积应相同。受试样品应尽可能薄而均匀地涂敷于整个染毒区域，染毒部位的面积约相当于动物体表面积的 10%(计算方法见急性经皮毒性试验附录)，应通过对动物体重的测定确定染毒部位的面积，

若受试样品毒性较大，可相对减小染毒区域的面积。应使用玻璃纸和无刺激的胶帶将受试样品固定，以保证受试样品与皮肤有良好的接触和防止受试样品脱落。染毒时还应采用必要的措施防止动物舔食受试样品，如对动物进行固定时，应有一定程度的松动。根据剪毛区被毛生长情况，可每周剪毛一次。

每天染毒 6h，理想的染毒周期是每周 7d，但考虑到实际情况，每周也可染毒 5d。

临床检查项目等原则上与亚慢性经口毒性试验相同，但皮肤病理检查为必检指标。鉴定报告可参考亚慢性经口毒性试验。

# 亚慢性经口毒性试验

## Subchronic Oral Toxicity Test

### 1 范围

本规范规定了啮齿类动物亚慢性经口毒性试验的基本原则、要求和方法。  
本规范适用于检测化学品的亚慢性经口毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (NO. 408, November 1998)

USEPA OPPTES Health Effects Test Guidelines (Series 870.3150 June 1996)

### 3 试验目的

确定一定时期内经口反复接触受试化学物引起的毒性效应,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最大无作用剂量,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。

### 4 定义

4.1 亚慢性经口毒性 (Subchronic Oral Toxicity): 是指实验动物在其部分生存期 (不超过 10% 寿命期) 内, 每日反复经口接触受试样品后所引起的健康损害效应。

4.2 无可见有害作用水平 (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL): 在规定的试验条件下, 用现有的技术手段或检测指标未观察到任何与受试样品有关的毒性作用的最大染毒剂量。

4.3 最低可见有害作用水平 (Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL): 在规定的试验条件下, 受试样品引起实验动物形态、功能、生长发育等发生有害改变的最低染毒剂量。

4.4 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。

### 5 试验基本原则

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 (90d),

有时候可根据需要染毒 6 个月（180d），染毒期间每日观察动物的毒性反应。在染毒期间死亡的动物要进行尸检。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

在开始本试验之前，应尽量搜集受试样品现有的各种资料。

6.1.1 受试样品的商品名和其他名称（包括 CAS 号）。

6.1.2 受试样品的结构式、分子式和分子量。

6.1.3 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、密度等）。重要的参数还包括稳定性（包括在赋形剂或饲料中）。

6.1.4 受试样品的分析方法。

6.1.5 受试样品的生产方法、合成路线和杂质。

6.1.6 储存方法

要有长期储存受试样品（包括在赋形剂或饲料中）的合适方法。否则需定期制备新鲜样品。

6.1.7 人类每日可能接触的水平

6.1.8 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 8 周龄（体重 80~120g，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 5d 时间使实验动物适应清洁级动物房饲养环境，并在这段时间内观察实验动物的状态。

6.2.2 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笼饲养，群饲时每笼不超过 5 只。

### 6.2.3 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。

### 6.3 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，其它条件均与染毒组相同。最高染毒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，则最低染毒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)，给予最高剂量受试样品，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。

若为染毒目的加入其它溶剂等赋形剂，这些赋形剂不应影响受试样品的吸收或引起毒性作用，必要时应设相应的赋形剂对照组。

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。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。其它的染毒方式要加以特殊说明。

### 6.4 染毒方法

常用的方法是受试样品混入饲料或饮水中，每周 7d 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 5~7d。试验期间各组动物染毒的方式应完全相同。

## 6.5 限量试验

在试验中，如果剂量预期达每天 1000 mg/kg 或以上时仍未产生可观测到的毒性效应（但人类接触水平的资料表明需用高剂量进行试验），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。

## 6.6 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 28d。

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、眼和粘膜、呼吸、循环、植物神经和中枢神经系统、肢体运动和行活动改变。对死亡动物应进行解剖，对质弱或濒死动物应隔离或处死和解剖。记录每周饲料消耗量，经饮水染毒时还应记录每天饮水消耗量，记录每周体重变化。试验结束时处死动物作相关检查。

## 6.7 临床检查

### 6.7.1 眼科检查

建议在动物染毒前和染毒后，最好对所有实验动物，至少应对最高剂量组和对照组动物，使用眼科镜或其它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。

### 6.7.2 血常规检查和其它血液指标检查

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血球压积、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。

### 6.7.3 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、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶、总胆固醇、甘油三酯、正铁血红蛋白、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它更大范围的临床生化检查,以便进行全面的毒性评价。

#### 6.7.4 尿液检查

一般不需要进行,只有当怀疑存在或观察到相关毒性作用时才进行尿液检查。

#### 6.8 病理检查

##### 6.8.1 大体解剖

所有动物均应进行全面的大体解剖,内容包括动物的外观、体腔开口处、胸腔、腹腔等。肝、肾、肾上腺和睾丸等器官应在分离后尽快称重以防水分丢失。应将主要组织器官保存在固定液中,以备日后进行病理组织学检查。

##### 6.8.2 脏器称重

心、肝、脾、肺、肾、脑、睾丸的绝对重量和相对重量(脏器系数=脏器重量/体重 $\times$ 100%)为必测指标,必要时加测其它脏器重量和脏器系数。

##### 6.8.3 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、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组织学检查。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、肾也做同样的检查。

#### 6.9 结果统计与评价

##### 6.9.1 结果的处理

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。

### 6.9.2 试验结果的评价

亚慢性经口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、死亡效应以及其它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无可见有害作用水平 (NOAEL)。

## 7 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外,还应包括以下方面:

- 7.1 试验方法;
- 7.2 按性别和剂量的毒性反应数据;
- 7.3 试验期内动物死亡的数量和时间;
- 7.4 毒性作用或其它作用;
- 7.5 每种异常症状出现的时间及其转归情况;
- 7.6 动物体重资料、食物摄入量和/或饮水量资料;
- 7.7 眼科检查结果
- 7.8 血液学检查结果;
- 7.9 临床生化检查结果;
- 7.10 大体解剖所见;
- 7.11 病理组织学检查所见的详细描述;
- 7.12 对结果进行处理的统计学方法;
- 7.13 确定无可见有害作用水平 (NOAEL);
- 7.14 结论。

## 8 试验结果的解释

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,但它可为确定人群暴露的无作用水平和允许暴露水平提供有价值的信息。

# 致畸试验

## Teratogenicity Test

### 1 范围

本规范规定了动物致畸试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品的致畸性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guideline for Testing of Chemicals (No.414, May 1981)

USEPA OPPTS Health Effect Test Guideline (Series 870.3700, June 1996)

### 3 试验目的

检测妊娠动物接触化学品后引起胎仔畸形的可能性。

### 4 定义

4.1 致畸性 (Teratogenicity): 在胚胎发育期引起胎鼠永久性结构和功能异常的化学物质特性。

4.2 母体毒性 (Maternal Toxicity): 引起亲代雌性妊娠动物直接或间接的健康损害效应。

4.3 发育毒性 (Developmental Toxicity): 指接触受试样品的妊娠动物的子代在出生以前、围产期和出生以后所显现出的机体缺陷或功能障碍。

### 5 试验基本原则

试验应设多个剂量组。选择处于胚胎发育器官形成期的妊娠动物进行染毒，并在胎鼠出生前将妊娠动物处死，取出子宫，检查其吸收胎、死胎、活胎及胎仔的骨骼和内脏畸形的情况。

### 6 试验方法

#### 6.1 实验动物

首选健康、刚进入性成熟期、未经交配的雌性大鼠和家兔，按雌雄动物比例 2:1 或 1:1 交配。试验前的适应期至少为 5d。

为了获得足够的胎仔数，正确地评价受试样品致畸的可能性。对于大鼠，每个剂量组和对照组至少应有 15 只妊娠动物，家兔至少为 12 只。

#### 6.2 剂量设计

试验至少设三个剂量组、一个阴性对照组和一个阳性对照组。阳性对照物可选用敌枯双或维生素 A。若近期内（一年之内）已从本试验中获得了阳性对照结果，可不设阳性对照组。对照组动物除了不给予受试样品外，其余的处理应与剂量组完全相同。试验可以先采用预试验，了解受试样品引起胚胎或胎仔死亡的剂量。在受试样品理化和生物特性允许的条件下，最高剂量应使母体出现明显的毒性反应，如轻微的体重下降，但不能引起超过 10% 的母体死亡；低剂量应不引起动物任何可观察到的毒性反应；在低剂量和高剂量之间可按几何级数设置中间剂量。如果受试样品的毒性较低，1000mg/kg 体重的剂量对胚胎无明显毒性或致畸作用，则可以采用限量试验，即试验不需要设其它剂量组。若高剂量的预试验对母体确有一定的毒性作用，但对胚胎无不良影响，也可以采用限量试验。

### 6.3 试验方法

#### 6.3.1 染毒途径

通常为经口灌胃，也可以采用其它与人的接触方式相同的给样方式。每天的染毒应在同一时间进行。如果受试样品是通过灌胃给样的，应按每只母体动物的体重来确定每日的给样量。

#### 6.3.2 交配及染毒期限

雄性和雌性动物按 1:1 或 1:2 的比例合笼交配。每天早晨应对雌鼠进行检查，查看阴道中是否有精子或阴栓。将检查到精子或阴栓的当天计为雌鼠妊娠的第 0d。将妊娠动物随机分组后，于胚胎器官的形成期开始染毒（大鼠为孕后 6~15d，家兔为孕后 6~18d），每天一次。

#### 6.3.3 观察期限及指标

6.3.3.1 每日至少对妊娠动物进行一次仔细的临床观察。发现虚弱或濒死的动物，应进行隔离或处死，对死亡的动物应进行尸检。如母体有流产、早产症状者也应处死并作大体检查。

6.3.3.2 每日称取妊娠动物体重，每周记录食物摄入，并观察其临床症状，包括皮肤、毛、眼睛、粘膜、呼吸系统、循环系统、神经系统、四肢活动和行为方式的改变。

6.3.3.3 及时记录任何毒性反应，包括出现的时间、程度和持续的时间。

#### 6.3.4 观察指标

为了避免自然分娩后新生幼仔被咬死或咬伤，于分娩前一天处死妊娠动物（大鼠为妊娠第 20d，小鼠为妊娠第 18d，家兔为妊娠后 29d），立即进行解剖检查。

6.3.4.1 取出子宫，分别称取子宫、胎盘和活胎的重量，记录黄体数、着床数、活胎数、死胎数及吸收胎数（大鼠和家兔）。

6.3.4.2 外观检查：逐一记录活胎仔的身长和尾长。检查外观有无异常，如头部：无脑、脑膨出、露脑、头盖裂、脑积水、小头、颜面裂、小眼、无眼、眼球突出、无耳、小耳、耳位低、无颚、小颚、下颚、兔唇和下颌裂；躯干部：胸骨裂、胸部裂、脊椎裂、脊椎侧弯、脊椎前弯、脊椎后弯、脐疝、尿道下裂、无肛门、短尾、卷尾、无尾和腹裂；四肢：多肢、无肢、短肢、半肢、多趾、无趾、并趾、短趾和缺趾。胎鼠畸形检查方法见附录 3-A。

6.3.4.3 骨骼检查：将每窝 1/2 的胎仔放入茜素红液(配制方法见附录 3-B)中染色，进行骨骼检查。测量囟门大小，矢状缝的宽度，头顶间骨及后头骨缺损情况，然后检查脊柱骨的数目、融合、纵裂、部分裂开、骨化中心数、发育不全、缩窄、脱离和形状；骨盆的弓数目、骨化中心数、形状异常、融合、裂开、缩窄和脱离；四肢骨的形状和数目；腕骨的骨化中心数；掌骨、趾骨的形状；肋骨的数目、形状、融合、分叉、缺损和发育不全；胸骨的形状、完全缺失、胸骨节融合、裂开、形状异常和发育不良等情况。

6.3.4.4 脏器检查：将每窝另一半的胎仔放入 Bouins 液(配制方法见附录 3-C)中，固定两周后作脏器和及软组织检查。检查有无异常，如头部：嗅球发育不良、侧脑室扩张、第三脑室扩张、角膜缺损等；胸部：右心位、房中隔缺损、室间隔缺损、主动脉弓、食道闭锁、气管狭窄、无肺、多肺、肺叶融合、膈疝、气管食管瘘和内脏异位等；腹部：肝分叶异常、肾上腺缺失、多囊肾、膀胱缺失、睾丸缺失、阴睾、卵巢缺失、卵巢异位、子宫缺失、子宫发育不全、肾积水、肾缺失和输尿管积水等。对于家兔每个胎仔都应解剖进行脏器检查和骨骼检查。

## 6.4 试验结果

### 6.4.1 数据处理

数据可以用统一的表格进行统计，表中应显示每组的实验动物数、平均体重、受孕动物数、黄体数、着床数、吸收胎数、活胎数、死胎数及其百分率、胎仔的情况（体重、胎盘重、体长、尾长）、畸胎的类型（包括外观、骨骼和内脏）、数目及百分率。

数据可采用任何一种适当的统计方法进行处理。应将各剂量组的指标相应地与对照组进行显著性检验。其中，以畸胎率最为重要，主要有以下两种：

$$\text{每组动物总畸胎率 (\%)} = \frac{\text{其中出现畸形的活胎总数}}{\text{该组母体所产的活胎总数}} \times 100$$

（凡每一活胎出现一种以上畸形时，均作一个畸胎计）。

当出现的畸胎是以某一种或某几种畸形为主时，就应按畸形种类单独计算该畸形率。

$$\text{每组动物某单项畸胎率 (\%)} = \frac{\text{其中出现某种畸胎总数}}{\text{该组母体所产的活胎总数}} \times 100$$

如果某剂量组的总畸胎率或某单项畸胎率与对照组相比明显增高,且差异有显著性,可表明该剂量有致畸作用。

致畸指数 = 雌性动物  $LD_{50}$  / 最小致畸剂量

#### 6.4.2 结果评价

6.4.2.1 评价时应结合所用动物品系的历史性的资料,包括自发畸变种类和频率进行。

6.4.2.2 试验结果应能得出受试样品是否有母体或胚胎毒性、致畸性,最好能得出无致畸剂量和最小致畸剂量。以最小致畸剂量求得致畸指数,表示致畸强度。

致畸指数小于 10 为基本无致畸危害;

致畸指数 10~100 为有致畸危害;

致畸指数大于 100 为强致畸危害。

### 7 鉴定报告

鉴定报告除总则中规定的一般项目外,还应包括以下内容:

7.1 给予受试样品的方法和期限;

7.2 孕鼠体重增长和妊娠情况;

7.3 受孕动物数、黄体数、着床数、吸收胎数、活胎数、死胎数及其百分率;

7.4 胎仔的情况(体重、胎盘重、体长、尾长)、畸胎的类型(包括外观、骨骼和内脏)、数目及百分率。

### 8 试验结果的解释

解释致畸试验结果时,必须注意种属的差异。试验结果从动物外推到人存在着一定的局限性。

## 附录 3-A 胎鼠畸形检查方法

1. 胎鼠外观检查: 对每只胎鼠先经肉眼检查, 如果肉眼不能确定某种畸形时, 将胎鼠放在解剖显微镜下进一步确定并照象, 胎鼠的检查顺序如下:
2. 胎鼠的头部检查: 有无露脑(无头盖骨), 脑膜膨出, 头部大小(大头可能脑积水、小头为头部发育不良)。眼睛的有无, 眼所在部位, 大小(小眼或大眼), 突眼或开眼等。两耳、鼻和嘴外表是否正常和对称, 上下颌有无唇裂。
3. 四肢的检查: 四肢有无多趾(指)、并趾、少趾、无趾、足内外翻、短肢等畸形。
4. 躯干的检查: 有无脐疝、腹裂(内脏膨出), 脊髓膨出、脊柱裂、脊柱侧突等。
5. 尾部检查: 有无短尾、卷尾、无尾和尾分叉等。
6. 标本的制作: 将每窝 1/2 胎鼠放入 Bouin's 液固定, 作为内脏检查, 另 1/2 放入 95 % 酒精中固定作为骨骼检查。
7. 骨骼标本的制备: 胎鼠放入 1 % KOH 溶液中软化至能很清楚地看见骨骼为止, 必要时中间可更换 1 次 KOH 溶液。
8. 骨骼染色: 将骨骼标本放入茜素红应用液中染色 16h, 直至全部骨骼染成紫红色为止, 中间可更换一次染液。
9. 骨骼透明: 染好色以后, 用自来水冲净标本, 倒掉染液, 将标本置于 50 % 甘油中脱色 3~5 天。
10. 骨骼检查:
  - 10.1 头骨检查: 颅骨是否完整, 有无骨化不全, 骨缝的宽窄, 枕骨的形状。胎鼠上枕骨骨化程度的分级标准如下:
    - 0 级: 上枕骨成片状或哑铃状, 两侧骨化点完全融合, 融合处宽度大于两侧的 1/3。
    - I 级: 上枕骨两侧骨化点相连, 相连处宽度小于两侧的 1/3。
    - II 级: 上枕骨两侧骨化点不相连, 但可清楚地见到两个较大的骨化点。
    - III 级: 上枕骨两侧的骨化点不相连, 仅见小骨化点或仅见一侧骨化点。
    - IV 级: 无上枕骨骨化点。
  - 10.2 胸部骨骼: 正常胸骨为 6 块, 畸形时可有骨骼错位及骨化不全, 注意观察第 2 和 5 胸骨。小鼠正常肋骨为 13 对, 观察有无多肋、少肋、肋骨分叉、融合、波状肋等畸形。
  - 10.3 四肢骨: 检查骨化程度、长短粗细、指趾骨的发育状况。
11. 胎鼠内脏徒手切片检查: 将胎鼠从 Bouin's 液中取出, 自来水冲净。测量每只胎鼠身长及尾长。
12. 头部切片: 将胎鼠放在蜡板或木板上, 第 1 刀由嘴开始经两耳切开, 暴露

舌、腭、上唇和下颌，检查舌有无异常，有无腭、唇裂。将头翻过来前背向上，切剩下的切片。第2刀从眼睛前面切下，暴露鼻中隔、鼻窦，记录鼻腔是否通。第3刀平眼切下，暴露脑鼻叶，鼻中隔后区的大部分及鼻咽腔、眼组织、视网膜、玻璃体、晶状体和角膜，检查这些组织结构有无异常。第4刀从眼后切开，暴露大脑半球和侧脑室，并注意有无畸形和扩张。第5刀横切大脑半球，暴露间脑的第三脑室、侧脑室、脉络膜等检查这些部位有无异常。

13. 内脏切片检查：沿胸腹壁中线和肋下沿水平线各切一刀，暴露胸腔与腹腔内脏，检查各脏器有无异常。

14. 统计：应用 SPSS 统计学软件对数据进行分析处理。各组母鼠平均体重，胎鼠体重、身长、尾长，计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，数据采用 F-检验进行显著性分析。活胎、死胎、畸形、吸收胎等计数资料用百分率表示，数据采用  $\chi^2$  检验进行显著性分析。录入计算机的数据备份软盘并打印。

活胎率 (%) = 活胎数 ÷ 胎鼠数 × 100%

死胎率 (%) = 死胎数 ÷ 胎鼠数 × 100%

吸收胎率 (%) = 吸收胎数 ÷ 着床数 × 100%

畸形率 (%) = 畸形仔鼠数 ÷ 受检胎鼠数 × 100%

孕鼠体重净增长 = 解剖前体重 - 受孕第 6d 体重 - 子宫连胎重

## 附录 3-B

### 茜素红液配制方法

冰醋酸	5ml
纯甘油	10ml
1%水合氯醛	60ml

临用时用 1% KOH 稀释成 1‰ 的应用液。

## 附录 3-C

### Bouins 液配制方法

苦味酸饱和液	75ml
甲醛	25ml
冰醋酸	5ml

混合使用。

# 两代繁殖毒性试验

## Two-Generation Reproduction Toxicity Study

### 1 范围

本规范规定了动物两代繁殖毒性试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品的繁殖毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guideline for Testing of Chemicals (No.416, May 1981)

USEPA OPPTS Health Effect Test Guideline (Series 870.3700, June 1996)

### 3 试验目的

提供关于受试样品对雌性和雄性动物繁殖功能影响的一般性资料：如性腺功能、交配行为、受孕、分娩、哺乳、断乳以及子代的生长发育情况等。同时也可在子代生长发育毒性（新生仔缺陷、死亡和畸形等）方面取得初步资料，为其它有关毒性试验提供参考。

### 4 定义

4.1 生殖毒性 (Reproductive Toxicity)：指由化学品引起的亲代雌性或雄性生殖功能的损伤或生殖能力的降低，如繁殖率的下降；或引起子代的非遗传性不良效应，如生长发育，包括致畸性和哺乳期中的健康损害效应。

4.2 繁殖力的损害 (Impairment of Fertility)：表现为雌性或雄性动物生殖功能或能力的障碍。

4.3 发育毒性 (Developmental Toxicity)：指接触受试样品的妊娠动物的子代在出生以前、围产期和出生以后所显现出的机体缺陷或功能障碍。

### 5 试验基本原则

试验应设多个剂量组。选择生长期中的雌雄动物进行试验。染毒期限亲代雄性动物至少为一个完整的精子发生期（大鼠大约为 56d），亲代雌性动物至少为两个完整的发情周期及交配期、妊娠和哺乳期。F<sub>1</sub>子代断乳后开始染毒，直到交配结束（雄性 F<sub>1</sub>子代）以及对 F<sub>2</sub>子代哺乳结束后（雌性 F<sub>1</sub>子代）。

## 6 试验方法

### 6.1 实验动物

6.1.2 首选健康初成年的大鼠或小鼠。避免选用繁殖率低的品系。所选动物应注明种类、品系、性别、体重和（或）周龄。

#### 6.1.2 性别和试验开始时的年龄

为了正确地评价化学品对动物生殖能力的影响，两种性别的动物都应使用。最常使用 7~8 周龄，至少经过 5d 适应期的动物来进行繁殖毒性试验。雌性动物必须是未经产仔的。

#### 6.1.3 动物数

为了获得足够的试验数据，正确地评价受试样品对两代动物繁殖过程（包括亲代动物繁殖、妊娠和哺育的过程，F<sub>1</sub> 子代从出生到成熟过程中的吸乳、生长发育情况，以及 F<sub>2</sub> 子代从出生到断乳的生长发育过程）可能引起的健康损害效应。雄性和雌性动物通常按 1:1 或 1:2 的比例合笼交配。交配的动物数应保证每个剂量组及对照组都能获得 20 只左右的孕鼠。

本实验动物采用自由饮食。孕鼠临近分娩时，应单笼饲养在分娩笼中，需要时笼中放置造窝垫料。

### 6.2 剂量设计

试验至少设三个剂量组和一个对照组。应考虑受试样品特性（如生物代谢和生物蓄积特性）的影响作用。在受试样品理化和生物特性允许的条件下，最高剂量应使亲代动物出现明显的毒性反应，但不引起动物死亡；中间剂量可引起轻微的毒性反应；低剂量应不引起亲代及其子代动物的任何毒性反应。如果受试样品的毒性较低，1000mg/kg bw 的剂量仍未对繁殖过程有任何毒副作用，则可以采用限量试验，即试验不需要设其它剂量组。若高剂量的预试验观察到明显的母体毒性作用，但对生育无影响，也可以采用限量试验。

### 6.3 试验方法

#### 6.3.1 染毒途径及方法

首选饲料掺入法，也可用饮水给予或其它适当的方法给药。每周应按 7d 进行给样。整个试验过程中所有的动物必须采用相同的给样方式。若使用除水外的其它溶剂或赋形剂时，这些物质应不会引起任何毒副作用，并应设立对照。如果染毒的途径为吸入染毒，参照有关亚慢性吸入毒性试验。对于妊娠期的母鼠，给样量应按妊娠的第 0d 或第 6d 的体重分两阶段计算染毒量。

### 6.3.2 给样期限及繁殖程序（以大鼠为例）

试验周期	亲代 (P)	子一代 (F <sub>1</sub> )	子二代 (F <sub>2</sub> )
第 1~第 8 周末 第 9~第 11 周末	给予受试样品 交配 (给样), 结束后处死 雄性鼠		
第 12~第 14 周末 第 15~第 17 周末 第 18 周	妊娠 (给样) 哺乳 (给样), 结束后处死	出生, 调整每窝只留 8 只动物 母乳喂养 基础饲料喂养	
第 19~第 26 周末 第 27~第 29 周末		给予受试样品 交配 (给样), 结束后处死雄 性鼠	
第 30~第 32 周末		妊娠 (给样)	出生, 调整每窝 只留 8 只动物
第 33~第 35 周末		哺乳 (给样), 结束后处死	断乳后处死

### 6.3.3 交配方法及妊娠检查

雄性和雌性动物按 1:1 或 1:2 的比例进行交配。

以 1:1 的交配方式为例, 雌鼠应始终与同剂量组的同一只, 但不是同窝所生的雄鼠合笼直至受孕, 合笼最长时间可为 3 w。在交配过程中, 每天早晨应对雌鼠进行检查, 查看有无阴栓或阴道中是否有精子。将检查到精子或阴栓的当天计为雌鼠妊娠的第 0d (判为交配成功动物)。大鼠 F<sub>1</sub> 子代至少应长到 9 w 后 (小鼠 11 w) 才能进行交配。交配时, 从 F<sub>1</sub> 子代每窝中随机选择雌雄各一只, 与同剂量组中不同窝的动物以 1:1 的比例交叉配对, 繁殖 F<sub>2</sub> 子代。未被选作交配的 F<sub>1</sub> 子代在断乳后予以处死。

若交配三周后仍未受孕, 应对不育的动物进行检查, 分析其原因。可以将不育的动物与证实过生育功能正常的动物重新配对, 需要时也可进行生殖器官的病理组织学、发情周期和精子发生周期的检查。

### 6.3.4 每窝新生幼鼠数量的调整

F<sub>1</sub> 代出生后的第 4d, 应将仔鼠数尽量随机调整到每窝 4 雌和 4 雄。若得不到 4 雌和 4 雄时可作不均等的调整 (如 5 雄 3 雌)。每窝的幼仔数小于 8 只时, 就不需要进行调整。F<sub>2</sub> 子代按同样的方法进行调整。

## 6.4 观察及检查

6.4.1 每日至少对动物进行一次仔细的观察。记录有无行为改变, 难产或滞产以及所有的毒性反应 (包括死亡)。

6.4.2 在交配前和交配期, 应计算每周的食物摄入量, 在妊娠中可考虑逐日记录。产仔后, 每窝仔鼠需要称量体重时, 母鼠的食物摄入量也应同时计算。

6.4.3 参与繁殖的动物 (亲代和 F<sub>1</sub> 子代) 应在给样的第一天进行称重, 以后每

周称量体重一次。数据应逐只进行记录。

6.4.3.1 交配结束时,采集亲代雄鼠附睾的精子,显微镜下计数 200 个精子,观察其活动性、形状及数量。

6.4.4 妊娠周期应该从怀孕的第 0d 开始计算。生产下的仔鼠应尽早分辨性别,记录每窝的出生数、活仔数以及幼仔外观有无异常和畸形。同时记录母鼠或仔鼠在生理上和行为上的异常表现。

6.4.5 以每窝为单位,对仔鼠于出生的当天上午、第 4d、第 7d、第 14d 和第 21d 进行称重。

#### 6.4.6 大体解剖检查

死亡和到期处死的亲代和成年的 F<sub>1</sub> 子代动物都应解剖进行大体检查,肉眼观察有无组织器官形态上的改变,特别是生殖器官。死亡或濒临死亡的仔鼠也应接受检查,查看是否有外观或器官形态的缺陷。

#### 6.4.7 病理组织学检查

保留上述剖检的所有亲代和 F<sub>1</sub> 子代动物的卵巢、子宫、子宫颈、阴道、睾丸、附睾、精囊、前列腺、脑下垂体和靶器官标本。先对最高剂量组和对照组的动物标本以及剖检中发现异常的标本进行组织病理学检查。如最高剂量组没有发现有意义的病变,其它剂量组的标本可不必再进行病理检查。反之,若最高剂量组发现有意义的病理改变,则其它剂量组相关的标本也应作进一步的检查。

### 6.5 结果统计与评价

#### 6.5.1 繁殖指数

交配成功率(%) = (交配成功动物数/用于交配的雌性动物数) × 100%

受孕率(%) = (受孕动物数/用于交配的雌性动物数) × 100%

活产率(%) = (产生活仔的雌性动物数/受孕动物数) × 100%

出生存活率(%) = (出生后 4d 幼仔存活数/出生当时存活仔数) × 100%

哺育成活率(%) = (21d 断奶时幼仔成活数/出生后 4d 幼仔存活数) × 100%

#### 6.5.2 数据处理

数据可以用表格进行统计,表中应显示每组的实验动物数、交配的雄性动物数、受孕的雌性动物数、各种毒性反应及其出现动物百分数。

数据应进行统计分析,可采用任何一种适当的统计方法进行处理。

#### 6.5.3 结果评价

逐一比较剂量组动物与对照组动物繁殖指数是否有显著性差异,以评定受试

样品有无繁殖毒性，同时还可根据统计学差异出现在哪个指标上（如体重，观察指标、大体解剖和病理组织学检查结果等），进一步评价繁殖毒性的损害作用特点。

## 7 鉴定报告

鉴定报告除总则中规定的一般项目外, 还应包括以下内容:

- 7.1 亲代和成年 F1 子代动物的食物摄入量和体重资料;
- 7.2 按性别和剂量组分别记录的毒性反应, 包括繁殖、妊娠和发育能力的异常
- 7.3 每窝仔鼠的体重和仔鼠的平均体重, 以及试验后期单个仔鼠的重量;
- 7.4 任何有关繁殖, 子鼠及其生长发育的毒性和其它健康损害效应;
- 7.5 观察到的各种异常症状的出现时间和持续过程。

## 8 试验结果的解释

本试验可反映动物在多次接触某一受试样品后对繁殖功能所产生的影响。在分析结果时, 应将其与亚慢性试验, 致畸试验以及其它试验的结果相结合, 进行综合分析。试验结果能提供无作用剂量水平和人体安全接触水平, 但试验结果外推到人仍存在着一定的局限性。

# 迟发性神经毒性试验

## Delayed Neurotoxicity Test (Organophosphorus Substances)

### 1 范围

本规范适用于有机磷化合物的迟发性神经毒性测定。若某些受试样品的化学结构式与迟发性神经毒性阳性物质相似，也需进行此项试验。试验分为急性和亚急性迟发性神经毒性试验。

### 2 规范引用文件

OECD Guideline for Testing of Chemicals (No. 418、419, May 1981)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.6100, June 1996)

### 3 试验目的

检测和评价受试样品是否具有迟发性神经毒性作用。迟发性神经毒性作用主要表现为运动性共济失调和瘫痪，在组织病理学上神经组织呈脱髓鞘变化。

### 4 定义

4.1 有机磷引起的迟发性神经毒性 (Organophosphorus Induced Delayed Neurotoxicity, OPIDN) 是一种神经综合征，主要的临床症状为四肢无力、上位运动神经元损伤性痉挛。其相关的病理学症状是周围神经和脊髓远端轴突病。其有关的生化作用是神经组织中的神经病靶酯酶 (Neuropathy Target Esterase, NTE) 抑制和老化。暴露引起的 NTE 抑制和随后的老化，其临床体征和病理改变首先见于第 1~2w 间。

4.2 神经病靶酯酶 (Neuropathy Target Esterase, NTE)：又称神经毒性酯酶 (Neurotoxic Esterase) 是膜结合蛋白，催化戊酸苯酯水解。该酶与有机磷共价结合发生磷酸化后，即被抑制或老化，与 OPIDN 之间有着密切关系。并不是所有抑制 NTE 的有机磷都能引起 OPIDN，但是所有引起 OPIDN 的有机磷都能抑制 NTE。

## 5 试验基本原则

OECD 新的指导大纲对原有试验方法进行了改进，要求对实验动物进行 NTE 的测定。在急性迟发性神经毒性试验中，高剂量但采用最大耐受剂量，一次给药后观察 21d。

在亚急性神经毒性试验中，连续给药 28d 后，继续观察 14d。

试验期间需对动物全面观察，内容包括：行为异常、运动失调、瘫痪等，试验中定期进行生化检验，特别是 NTE 测定，并于试验结束时进行神经组织的病理学检查等。

## 6 试验方法

### 6.1 急性迟发性神经毒性试验

#### 6.1.1 实验动物

选用 8-12 个月健康初成年家养母鸡，无疾病、无用药史、无步态异常，体重 1.5-2kg。受试样品组和赋形剂对照组每组至少 12 只，阳性对照组至少 6 只。试验前置于试验环境中观察适应 5d。

#### 6.1.2 饲养条件

单笼饲养，饲养的笼子应足够大，允许母鸡自由行动，并可观察其步态。如果是人工照明，应 12h 开灯，12h 关灯，适当饮食，不限制饮水。

#### 6.1.3 试验分组

6.1.3.1 一般设 3~4 个剂量组，每一剂量组动物要保证至少有 6 只动物用于生化指标检验，6 只动物用于病理解剖。

6.1.3.2 先求出受试样品对母鸡的急性经口半数致死量 ( $LD_{50}$ )。

6.1.3.3 剂量范围可在半数致死量和最大无作用剂量之间设定，应包括人类实际接触量及其 100 倍剂量。

6.1.3.4 当受试样品剂量达每日 2000mg/kg bw，动物未出现毒性效应，更高的剂量则不予考虑，但当人的实际接触剂量较大时，可考虑适当加大剂量。

6.1.3.5 赋形剂对照组除不给受试样品外，其它与受试样品组完全一致。

6.1.3.6 阳性对照组要保证至少有 6 只母鸡（3 只用于生化检验，3 只用于病理解剖）给予迟发性神经毒性阳性物：三邻甲苯磷酸酯 (tri-o-cresylphosphate, TOCP)，剂量为 500mg/kg bw。可同时设阳性对照组或采用近期的阳性对照数据。

#### 6.1.4 试验步骤

##### 6.1.4.1 动物准备

试验前动物隔夜禁食，但不限制饮水。

##### 6.1.4.2 受试样品的配制：

受试样品采用水溶液、混悬液或油溶液。灌胃量可根据各组不同剂量按 5ml/kg bw 给予。如采用注射给药，一般按 1ml/kg bw 给予。

##### 6.1.4.3 染毒：

通常采用一次经口灌胃给药，也可采用胶囊或母鸡翅膀下注射给药。给予受试样品前 10~15 min 应大腿肌肉注射硫酸阿托品作保护处理，用量为 10mg/kg bw，以对抗急性副交感神经中毒症状，同时肌肉注射解磷定 25mg/kg bw，以防止对胆碱酯酶的不可逆抑制。

#### 6.1.5 观察指标

##### 6.1.5.1 临床观察

6.1.5.1.1 给予受试样品后直到 21d 每天至少观察一次，记录有无行为异常，运动性共济失调，瘫痪等症状。在开始给予受试样品的两天应每天至少观察 3~5 次。

6.1.5.1.2 详细记录包括出现中毒症状的时间、程度及持续时间。

6.1.5.1.3 每周至少两次将母鸡拿出笼子强迫活动，以观察有无迟发性神经毒性的最小反应。

6.1.5.1.4 每周测体温一次、称体重一次、记录食量一次。

6.1.5.1.5 出现濒死状态的鸡应立即处死，解剖检查。

6.1.5.1.6 共济失调按以下 5 级进行记录

- 0 无反应；
- A 腿软、站立姿势和步态稍异常；
- B 步态严重异常，行走时不断跌倒；
- C 能勉强站立，但多以足站立；
- D 不能站立，通过扇动翅膀移动身体。

##### 6.1.5.2 生化检验

给予受试样品 24h、48h 分别从各剂量组和赋形剂对照组中随机选择 3 只母鸡处死，阳性对照组随机选择 3 只母鸡于 24h 处死，取脑和腰脊髓进行 NTE 测定，

如果观察临床症状出现非常慢,可将测定时间延迟为给样后 24h 和 72h 处死动物。

必要时可测定这些样品中的乙酰胆碱酯酶 (AChE)。

所有解剖的动物应仔细观察脑和脊髓的形态学改变情况。

#### 6.1.5.3 病理组织学检查

6.1.5.3.1 观察期满将每组剩余的母鸡用空气栓塞法或颈动脉放血法,迅速解剖取材,或用原位灌注固定法处死。

6.1.5.3.2 主要对脑、脊髓及远端周围神经组织进行病理组织学检查。

脑:包括延脑、脑桥、小脑及大脑皮质。

脊髓:包括颈段,胸段中部及腰骶结合部。

周围神经:坐骨神经,胫骨神经及其侧支。

#### 6.1.5.3.3 神经组织切片染色

除常规苏木精伊红 (HE) 染色外,同时要要进行髓鞘或轴索等特殊染色。

### 6.2 亚急性迟发性神经毒性试验

6.2.1 动物:同急性迟发性神经毒性试验 6.1.1。

6.2.2 饲养条件:同急性迟发性神经毒性试验 6.1.2。

#### 6.2.3 试验分组

6.2.3.1 设 3 个剂量组和 1 个赋形剂对照组。每组应有足够的母鸡数,保证至少有 6 只用做生化检验,6 只于末次给药后继续观察并于试验结束时进行病理形态学观察。

6.2.3.2 剂量选择应参考急性毒性测试结果和有关资料。

高剂量应引起明显的毒性效应,但不能引起死亡或严重伤害。中剂量应出现极轻微中毒变化。低剂量不应出现任何毒作用。

6.2.3.3 如果 1000mg/kg bw 未产生可观察到的毒性作用,则不必进行更高剂量的测试。但当预期的人接触量高于此剂量时则应加大剂量进行测试。

#### 6.2.4 试验步骤

6.2.4.1 受试样品配制 首选灌胃或胶囊给药。受试样品采用水溶液、混悬液或油溶液。灌胃量可根据各组不同剂量按 5ml/kg bw 给予。

#### 6.2.4.2 染毒

每日一次经口给药,每周 7d,连续 28d,末次给药后继续观察 14d。

#### 6.2.5 观察指标

#### 6.2.5.1 临床指标

给药期间和观察期间每天至少观察一次，记录有无行为异常，运动性共济失调，瘫痪等症状。具体观察和记录见 6.1.5.1。

#### 6.2.5.2 生化检验

观察期间进行生化检验，分别于末次给药后 24h 和 48h 各从每个受试样品组和赋形剂对照组随机选择 3 只母鸡进行 NTE 和 AChE 测定。

#### 6.2.5.3 病理组织学检查

观察期满处死剩余母鸡，每组 6 只解剖取脑、脊髓及远端周围神经组织进行病理组织学检查。见急性迟发性神经毒性试验 6.1.5.3。

### 6.3 结果统计与评价

6.3.1 评价内容包括临床神经毒性症状、生化检验和病理检查结果及可观察到的其他毒性效应。对发生率、严重程度及相关性作出评价。

6.3.2 将受试样品组与阳性对照组、赋形剂对照组做比较，进行统计分析，以确认是否有迟发性神经毒作用。

6.3.3 阳性对照组应出现共济失调障碍，病理组织学证实有脱髓鞘改变，赋形剂对照组无上述改变。

6.3.4 出现阳性时，需求得无作用剂量，进一步评价受试样品与神经毒性的反应关系、发生率和严重程度。

#### 6.3.5 评价要列出以下简表

一般症状变化，出现神经毒性症状的类型、严重程度，计算出百分率；

死亡率；

体重变化；

进食量；

食物利用率： $(\text{每周平均增加体重}/\text{每周平均进食量}) \times 100$ ；

生化检验结果；

病理组织学检查结果及照片。

## 7 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外，还应包括以下方面：

### 7.1 体重的数据；

- 7.2 各剂量的毒性效应，数据包括死亡情况；临床症状的性质，严重程度和持续时间（无论是否可逆）；
- 7.3 生化检验方法和结果：详细描述；
- 7.4 尸检结果；
- 7.5 所有病理组织学检查的详细结果；
- 7.6 结论。

## 8 试验结果的解释

迟发性神经毒性试验能够提供受试样品在急性或亚急性染毒的迟发性神经毒性作用资料。虽然其试验结果仅能有限地外推到人，但它可为确定人群暴露的无作用水平和允许暴露水平提供有价值的信息。

## 第四阶段试验

# 慢性吸入毒性试验

## Chronic Inhalation Toxicity Study

### 1 范围

本规范规定了动物慢性吸入毒性试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品的慢性吸入毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No. 452, 12 May 1981)

USEPA OPPTS Health effect Test Guideline (Serious 870-4100 June 1996)

### 3 试验目的

实验动物呼吸道反复吸入不同浓度的受试样品，观察实验动物的毒性效应、严重程度、靶器官和损害的可逆性，确定无作用浓度，为制定人类接触该受试样品的工作场所职业接触限值（OEL）和每日容许摄入量（ADI）提供依据。由于另设试验研究致癌性，故致癌性并不是本试验的主要内容。若慢性试验与致癌试验在同批动物中联合进行，此时称慢性合并致癌试验。

### 4 定义

4.1 慢性吸入毒性(Chronic Inhalation Toxicity)：动物在正常生命期的大部分时间内经呼吸道接触受试样品所引起的健康损害效应。

4.2 无可见有害作用水平（No Observed Adverse Effect Level, NOAEL）：在规定的试验条件下，用现有的技术手段或检测指标未观察到任何与受试样品有关的毒性作用的最大染毒浓度。可用动物每日接触单位体积空气受试样品的质量（ $\text{mg}/\text{m}^3$ ）表示。

4.3 最低可见有害作用水平（Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL）：在规定的试验条件下，受试样品引起实验动物形态、功能、生长发育等发生有害改变的最低染毒浓度。可用动物每日接触单位体积空气受试样品的质量（ $\text{mg}/\text{m}^3$ ）表示。

4.4 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。

### 5 试验的基本原则

在实验动物的大部分生命期间将受试样品经呼吸道染毒，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，以阐明此受试样品质的慢性毒性。

## 6 试验方法

6.1 受试样品 在开始本试验之前，应尽量搜集受试样品现有的各种资料。

6.1.1 受试样品的商品名和其他名称（包括 CAS 号）。

6.1.2 受试样品的结构式、分子式和分子量。

6.1.3 受试样品的物理、化学性质（可包括：外观、沸点、熔点、比重、折射率、光谱资料、溶解度、挥发性、化学活性、ppm 和 mg/m<sup>3</sup> 换算系数、光化学性质、电离度、粒度、密度等）。重要的参数还包括稳定性（包括在赋形剂或饲料中）。

6.1.4 受试样品的分析方法。

6.1.5 受试样品的生产方法、合成路线和杂质。

6.1.6 储存方法：要有长期储存受试样品（包括在赋形剂或饲料中）的合适方法。否则需定期制备新鲜样品。

6.1.7 人类每日可能接触的水平。

6.1.8 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

为选择合适的动物种类和品系，应该进行有关的急性、亚急性、亚慢性、蓄积毒性甚至毒物动力学试验。所选用的品系应是对该类受试样品的慢性毒性作用敏感。通常需用两种动物进行慢性吸入毒性试验，一种为啮齿类动物，首选大鼠；另一种为非啮齿类动物，常用狗或灵长类动物，但国际上对使用这类动物有诸多限制。如果仅有啮齿类动物的资料，将资料外推到人时敏感性降低。

实验动物和动物试验的环境设施应符合国家相应规定，必须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），不含对试验有影响的杂质，分析结果应在鉴定报告列出。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 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 40 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能满足统计学要求（每组每性别动物应不少于 10 只）。

### 6.4 剂量组和染毒频率

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。

### 6.5 对照组

必须设立对照组。对照组动物不接触受试样品及其它赋形剂，其它条件均与染毒组相同。若染毒必须加入赋形剂，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，同时还应设相应的赋形剂对照组。

### 6.6 染毒途径

6.6.1 用动式染毒系统进行试验，其方法与亚慢性吸入毒性试验相同。

6.6.2 染毒时间，按职业接触方式是每天 6h，每周 5d（称间歇暴露方式）；按环境污染物接触方式为每天 22~24h，留下约 1h 给动物喂食和清理染毒柜，每周 7d（称连续暴露方式）。染毒时间从染毒柜达到预定浓度开始计算。柜内空气中受试样品浓度要求恒定。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 17~18h 恢复，而且在周末恢复时间更长。

采用那一种染毒方式取决于试验设计和人类主要的接触方式。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）。在特殊要求下，也可用气管注入法。

#### 6.6.3 染毒柜

染毒柜的设计必须保证换气次数能达到 12~15 次 /h；柜内氧含量 $\geq 19\%$ ；柜内受试样品浓度均匀；对照组与浓度组动物用柜的设计完全一致；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%；染毒柜应保持一定的负压，以防受试样品意外漏出。

#### 6.6.4 物理参数监测

必须连续监测，保证管道通畅以及各个染毒柜条件相同：

空气流量：需连续监测；

柜内受试样品浓度：尽量保持恒定；

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

粒径大小：粒子应是可吸入大小 [以空气动力学直径表示：半数质量空气动力学直径 (MMAD)  $4 \mu \pm$ ]，在动物呼吸带采样检测。在气溶胶发生装置调试时要做检测，稳定后可定期检测。

#### 6.7 染毒周期

动物连续染毒一年以上，小鼠通常为一年半，大鼠通常为两年。

#### 6.8 临床观察

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、冷藏并剖验，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。

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。

记录体重变化。前 13 周每周记录体重一次，此后每 4 周记录一次。饲料消耗量在前 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可 3 个月记录一次。经饮水染毒时应记录饮水消耗量。

#### 6.9 血常规检查和其它血液指标检查

检查指标可包括血红蛋白浓度、血球压积、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 和第 6 个月各检查一次，此后每隔约 6 个月检查一次，试验结束时一次。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。血细胞分类计数通常先在最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。

#### 6.10 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。应检查下列指标：

外观：每只动物的尿量和尿比重；  
蛋白，糖，酮体，潜血；  
沉淀物镜检（半定量）。

#### 6.11 临床生化检查

在第6个月及试验结束时进行。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。检查指标包括：

总蛋白浓度、白蛋白浓度、肝功能试验（如碱性磷酸酶，谷氨酸氨基转移酶，天门冬氨酸氨基转移酶， $\gamma$ -谷氨酰转肽酶、鸟氨酸脱羧酶等）、糖代谢、肾功能如血尿素氮等。

#### 6.12 病理检查

病理检查，包括肉眼大体检查和镜检是慢性毒性试验的重要部分。应全面检查、详细描述和记录。

##### 6.12.1 肉眼剖检

肉眼剖检（大体解剖和尸检）是病理检查重要方法。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肉眼检查。如果处死动物，处死前应收集其血样进行血细胞分类计数。保存所有肉眼可见病变、肿瘤或可疑肿瘤组织。应分析肉眼剖检与镜检结果的对应情况。

所有的器官组织都应保存并进行镜检。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。

以上有\*号者需称重，大鼠每组每性别可称10只，非啮齿类动物包括甲状腺及甲状旁腺应全部称重。

##### 6.12.2 组织病理检查

6.12.2.1 所有肉眼可见的肿瘤和其他病变都应进行病理检查。

6.12.2.2 对所有有病变的组织器官进行镜检并详细描述，包括：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。

6.12.2.3 较低剂量组动物的病变，而且这些病变是由于受试样品引起或可能由受试样品引起的。

6.12.2.4 某一剂量组病理镜检有问题时，下一剂量组需作检查。

6.12.2.5 动物（包括对照组动物）有共同病理损害时，应对剂量组动物的病理改变程度作出评估。

## 6.13 试验结果评价

### 6.13.1 结果的处理

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。

### 6.13.2 试验结果的评价

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、死亡效应以及其它一般或特殊的毒性作用。成功的慢性试验应能够提出统计学上有意义的无作用水平（NOEL）。

## 7 鉴定报告

鉴定报告包含的内容参见亚慢性试验，而且还必须包括以下内容：

- 7.1 该试验在何实验室完成，实验室的名称和地址；
- 7.2 试验日期；
- 7.3 试验和报告负责人；
- 7.4 吸入染毒方法 包括染毒柜的设计、物理参数监测、柜内受试样品浓度、粒径大小等。

此外，鉴定报告还必须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。必须包括摘要、资料分析和结论等，摘要必须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。

## 8 试验结果的解释

慢性经呼吸道吸入毒性试验能够提供在长期接触受试样品时的毒性作用资料，为拟定人类接触受试样品的职业接触限值（OEL）和每日容许摄入量（ADI）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。

# 慢性经皮毒性试验

## Chronic Dermal Toxicity Study

### 1 范围

本规范规定了动物慢性经皮毒性试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品的慢性经皮毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No. 452, 12 May 1981)

USEPA OPPTS Health effect Test Guideline (Serious 870.4100, June 1996)

### 3 试验目的

实验动物经皮途径反复给予不同剂量（浓度）的受试样品，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，确定无作用剂量（浓度），为拟定人类经皮接触该受试样品的职业接触限值的制订（OEL）和每日容许摄入量（ADI）提供依据。由于另设试验研究致癌性，故致癌性并不是本试验的主要内容。若慢性试验与致癌试验在同批动物中联合进行，此时称慢性合并致癌试验。

### 4 定义

4.1 慢性经皮毒性（Chronic Dermal Toxicity）：动物在正常生命期的大部分时间内经皮接触受试样品所引起的健康损害效应。

4.2 无可见有害作用水平（No Observed Adverse Effect Level, NOAEL）：在规定的试验条件下，用现有的技术手段或检测指标未观察到任何与受试样品有关的毒性作用的最大染毒剂量。可用每日单位动物体重接触受试样品的重量（mg/kg·d）表示。

4.3 最低可见有害作用水平（Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL）：在规定的试验条件下，受试样品引起实验动物形态、功能、生长发育等发生有害改变的最低染毒剂量。可用每日单位动物体重接触受试样品的重量（mg/kg·d）表示。

4.4 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。

## 5 试验的基本原则

在实验动物的大部分生命期间将受试样品经皮染毒，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，以阐明此受试样品的慢性毒性。

## 6 试验方法

6.1 受试样品 在开始本试验之前，应尽量搜集受试样品现有的各种资料。

6.1.1 受试样品的商品名和其他名称（包括 CAS 号）。

6.1.2 受试样品的结构式、分子式和分子量。

6.1.3 受试样品的物理、化学性质(可包括：外观、沸点、熔点、比重、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（包括在赋形剂或饲料中）。

6.1.4 受试样品的分析方法。

6.1.5 受试样品的生产方法、合成路线和杂质。

6.1.6 储存方法：要有长期储存受试样品（包括在赋形剂或饲料中）的合适方法。否则需定期制备新鲜样品。

6.1.7 人类每日可能接触的水平。

6.1.8 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

为选择合适的动物种类和品系，应该进行有关的急性、亚急性、亚慢性、蓄积毒性甚至毒物动力学试验。所选用的品系应是对该类受试样品的慢性毒性作用敏感。通常需用两种动物进行慢性试验，一种为啮齿类动物，首选大鼠；另一种为非啮齿类动物，常用狗或灵长类动物，但国际上对使用这类动物有诸多限制。如果仅有啮齿类动物的资料，将资料外推到人时敏感性降低。

实验动物和动物试验的环境设施应符合国家相应规定，必须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），不含对试验有影响的杂质，分析结果应在鉴定报告列出。

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 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 40 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，试验开始时相应增加动物数量。试验结束时各剂量组每种性别的动物能满足统计学要求（每组每性别动物应不少于 10 只）。

### 6.4 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。

若掌握人群接触水平，则最低染毒剂量应高于人群的实际接触水平。

必须设立对照组。对照组动物不接触受试样品及其它赋形剂，其它条件均与染毒组相同。若染毒必须加入溶剂或添加剂，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。

此外，可另设一追踪观察组，即选用 20 只动物（雌雄各半），给予最高剂量受试样品，染毒两年，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。

若受试样品引起严重的皮肤刺激效应，应降低受试样品的使用浓度，尽管这样可导致原来在高浓度（或高剂量）下出现的毒性作用减弱或消失。若试验早期动物的皮肤受到严重损伤，则应终止试验，并降低浓度重新开始试验。

本试验中，如果接触水平每日超过 1000 mg/kg bw 时仍未产生可观测到的毒性效应，而且可以根据相关结构化合物预期受试样品毒性时，可考虑不必进行三个剂量水平的全面试验观察。

## 6.5 试验方法

6.5.1 染毒前 24h, 将动物躯干背部染毒区的被毛去除, 去毛时应小心不可损伤动物皮肤, 以免引起皮肤通透性的改变。此后视动物被毛生长情况, 大约每周要对染毒部位去毛, 各组的去毛时间和去毛面积应相同。受试样品应尽可能薄而均匀地涂敷于整个染毒区域, 染毒部位的面积约相当于动物体表面积的 10%, 应通过对动物体重的测定确定染毒部位的面积, 若受试样品毒性较大, 可相对减小染毒区域的面积。应使用玻璃纸和无刺激的胶带将受试样品固定, 以保证受试样品与皮肤有良好的接触和防止受试样品脱落。染毒时还应采用必要的措施防止动物舔食受试样品, 如对动物进行固定时, 应有一定程度的松动。

6.5.2 每天染毒 6h, 理想的染毒周期是每周 7d, 但考虑到实际情况, 每周也可染毒 5d。每周备皮一次。

6.5.3 通常每天染毒一次。染毒的第一个月每周按体重调节一次染毒量, 以后每月调整一次染毒量, 半年以后每三月调整一次。

### 6.5.4 染毒周期

动物连续染毒一年以上, 小鼠通常为一年半, 大鼠通常为两年。

## 6.6 临床观察

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、冷藏并剖验, 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。

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。

记录体重变化。前 13w 每周记录体重一次, 此后每 4w 记录一次。饲料消耗量在前 13w 每周记录一次, 此后如动物健康状况或体重无异常改变可 3 个月记录一次。经饮水染毒时应记录饮水消耗量。

## 6.7 血常规检查和其它血液指标检查

检查指标可包括血红蛋白浓度、血球压积、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、6、12 和 18 个月各检查一次, 此后每隔约 6 个月检查一次, 试验结束时一次。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。血细胞分类计数通常先在最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。

## 6.8 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。应检查下列指标：

- 外观：每只动物的尿量和尿比重；
- 蛋白，糖，酮体，潜血；
- 沉淀物镜检（半定量）。

## 6.9 临床生化检查

在第 6 个月及试验结束时进行。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。检查指标包括：

总蛋白浓度、白蛋白浓度、肝功能试验（如碱性磷酸酶，谷氨酸氨基转移酶，天门冬氨酸氨基转移酶， $\gamma$ -谷氨酰转肽酶、鸟氨酸脱羧酶等）、糖代谢、肾功能如血尿素氮等。

## 6.10 病理检查

病理检查，包括肉眼大体检查和镜检是慢性毒性试验的重要部分。应全面检查、详细描述和记录。皮肤病理检查为必检指标。

### 6.10.1 肉眼剖检

肉眼剖检是病理检查重要的一环，如果做得好，对镜检有极大帮助。。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肉眼检查。如果处死动物，处死前应收集其血样进行血细胞分类计数。保存所有肉眼可见病变、肿瘤或可疑肿瘤组织。应分析肉眼剖检与镜检结果的对应情况。

所有的器官组织都应保存并进行镜检。一般包括下列器官和组织：脑\*、（髓/脑桥，小脑皮质，大脑皮质）、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。

以上有\*号者需称重，大鼠每组每性别可称 10 只，非啮齿类动物包括甲状腺及甲状旁腺应全部称重。

### 6.10.2 组织病理检查

6.10.2.1 所有肉眼可见的肿瘤和其他病变都应进行病理检查。并可循以下顺序检查：

6.10.2.2 对所有有病变的组织器官进行镜检并详细描述，包括：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。

6.10.2.3 较低剂量组动物的病变，而且这些病变是由于受试样品引起或可能由受试样品引起的。

6.10.2.4 某一剂量组病理镜检有问题时，下一剂量组需作检查。

6.10.2.5 各组动物（包括对照组动物）有共同病理损害时，应对剂量组动物的病理改变程度作出评估。

## 6.11 试验结果处理与评价

### 6.11.1 结果的处理

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。

### 6.11.2 试验结果的评价

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、死亡效应以及其它一般或特殊的毒性作用。成功的慢性试验应能够提出统计学上有意义的无作用水平（NOAEL）。

## 7 鉴定报告

鉴定报告包含的内容参见亚慢性试验，而且还必须包括以下内容：

7.1 该试验在何实验室完成，实验室的名称和地址；

7.2 试验日期；

7.3 试验和报告负责人。

此外，鉴定报告还必须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。必须包括摘要、资料分析和结论等，摘要必须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。

## 8 试验结果的解释

慢性经皮毒性试验能够提供长期接触受试样品的毒性作用资料，为拟定人类接触该受试样品的职业接触限值(OEL)和每日容许摄入量(ADI)提供依据。但由于本试验并不主要研究受试样品的致癌性，确定受试样品致癌性仍有限。

# 慢性经口毒性试验

## Chronic Oral Toxicity Study

### 1 范围

本规范规定了动物慢性经口毒性试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品的慢性经口毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No.452, 12 May 1981)

USEPA OPPTS Health effect Test Guideline (Serious 870.4100, June 1996)

### 3 试验目的

通过经口途经，反复给予试验动物不同剂量的受试化学物，观察试验动物的慢性毒性效应、严重程度、靶器官和损害的可逆性，确定无作用剂量，为拟定人类接触该化学物的工作场所职业接触限值（OEL）和每日容许摄入量（ADI）的制订提供依据。由于另设试验研究致癌性，故致癌性并不是本试验的主要内容。

### 4 定义

4.1 慢性经口毒性（Chronic Oral Toxicity）：动物在正常生命期的大部分时间内经皮接触受试样品所引起的健康损害效应。

4.2 无可见有害作用水平（No Observed Adverse Effect Level, NOAEL）：在规定的试验条件下，用现有的技术手段或检测指标未观察到任何与受试样品有关的毒性作用的最大染毒剂量。可用每日单位动物体重接触受试样品的重量(mg/kg bw·d)表示。

4.3 最低可见有害作用水平（Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL）：在规定的试验条件下，受试样品引起实验动物形态、功能、生长发育等发生有害改变的最低染毒剂量。可用每日单位动物体重接触受试样品的重量(mg/kg bw·d)表示。

4.4 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。

## 5 试验的基本原则

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,以阐明此化学物质的慢性毒性。

## 6 试验方法

6.1 受试样品 在开始本试验之前,应尽量搜集受试样品现有的各种资料。

6.1.1 受试样品的商品名和其他名称(包括CAS号)。

6.1.2 受试样品的结构式、分子式和分子量。

6.1.3 受试样品的物理、化学性质(可包括:外观、沸点、熔点、比重、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(包括在赋形剂或饲料中)。

6.1.4 受试样品的分析方法。

6.1.5 受试样品的生产方法、合成路线和杂质。

6.1.6 储存方法:要有长期储存受试样品(包括在赋形剂或饲料中)的合适方法。否则需定期制备新鲜样品。

6.1.7 人类每日可能接触的水平。

6.1.8 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

为选择合适的动物种类和品系,应该进行有关的急性、亚急性、亚慢性、蓄积毒性甚至毒物动力学试验。所选用的品系应是对该类受试样品的慢性毒性作用敏感。通常需用两种动物进行慢性试验,一种为啮齿类动物,首选大鼠;另一种为非啮齿类动物,常用狗或灵长类动物,但国际上对使用这类动物有诸多限制。如果仅有啮齿类动物的资料,将资料外推到人时敏感性降低。

实验动物和动物实验的环境设施应符合国家相应规定,必须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 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能满足统计学要求（每组每性别动物应不少于 10 只）。

### 6.4 剂量组和染毒频率

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。

### 6.5 对照组

必须设立对照组。对照组动物不接触受试样品及其它赋形剂，其它条件均与染毒组相同。若染毒必须加入溶剂或添加剂，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。

### 6.6 染毒途径

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 天染毒，如灌胃或用药囊法，考虑到实际工作方便，也可每周染毒 5 天，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。

#### 6.7 染毒周期

动物连续染毒 1 年以上，小鼠通常为一年半，大鼠通常为两年。

#### 6.8 临床观察

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、冷藏并剖验，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。

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。

记录体重变化。前 13 周每周记录体重一次，此后每 4 周记录一次。在前 13 周每周记录一次饲料消耗量，此后如动物健康状况或体重无异常改变可 3 个月记录一次。经饮水染毒时应记录饮水消耗量，以便计算受试样品摄入量。

#### 6.9 血常规检查和其它血液指标检查

检查指标可包括血红蛋白浓度、血球压积、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 和第 6 个月各检查一次，此后每隔约 6 个月检查一次，试验结束时一次。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。

在实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。血细胞分类计数通常先在最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。

#### 6.10 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。应检查下列指标：

外观：每只动物的尿量和尿比重；

蛋白，糖，酮体，潜血；

沉淀物镜检（半定量）。

## 6.11 临床生化检查

在第6个月及实验结束时进行。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。检查指标包括：

总蛋白浓度、白蛋白浓度、肝功能试验（如碱性磷酸酶，谷氨酸氨基转移酶，天门冬氨酸氨基转移酶， $\gamma$ -谷氨酰转肽酶、鸟氨酸脱羧酶等）、糖代谢、肾功能如血尿素氮等。

## 6.12 病理检查

病理检查，包括肉眼大体检查和镜检是慢性毒性试验的重要部分。应全面检查、详细描述和记录。

### 6.12.1 肉眼剖检

肉眼剖检是病理检查重要的一环，如果做得好，对镜检有极大帮助。所有动物，包括在实验过程中死亡或濒死而被处死的动物均应进行肉眼检查。如果处死动物，处死前应收集其血样进行血细胞分类计数。保存所有肉眼可见病变、肿瘤或可疑肿瘤组织。应分析肉眼剖检与镜检结果的对应情况。

所有的器官组织都应保存并进行镜检。一般包括下列器官和组织：脑\*、（髓/脑桥，小脑皮质，大脑皮质）、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。

以上有\*号者需称重，大鼠每组每性别可称10只，非啮齿类动物包括甲状腺及甲状旁腺应全部称重。

### 6.12.2 组织病理检查

6.12.2.1 所有肉眼可见的肿瘤和其他病变都应进行病理检查。并可循以下顺序检查：

6.12.2.2 对所有有病变的组织器官进行镜检并详细描述，包括：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。

6.12.2.3 较低剂量组动物的病变，而且这些病变是由于受试样品引起或可能由受试样品引起的。

6.12.2.4 某一剂量组病理镜检有问题时，下一剂量组需作检查。

6.12.2.5 各组动物（包括对照组动物）有共同病理损害时，应对剂量组动物的病理改变程度作出评估。

## 6.13 试验结果处理与评价

### 6.13.1 结果的处理

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。

### 6.13.2 试验结果的评价

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、死亡效应以及其它一般或特殊的毒性作用。成功的慢性试验应能够提出统计学上有意义的无作用水平（NOAEL）。

## 7 鉴定报告

鉴定报告包含的内容参见亚慢性试验，而且还必须包括以下内容：

7.1 该试验在何实验室完成，实验室的名称和地址；

7.2 试验日期；

7.3 试验和报告负责人。

此外，鉴定报告还必须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。必须包括摘要、资料分析和结论等，摘要必须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。

## 8 试验结果的解释

慢性经口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物的职业接触限值（OEL）和每日容许摄入量（ADI）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。

# 致癌试验

## Carcinogenicity Study

### 1 范围

本规范规定了动物致癌试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品的致癌性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No. 452, May 1981)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.4200, June 1996)

### 3 试验目的

通过一定途经（经口、经皮或吸入），动物在正常生命期的大部分时间内反复接触不同剂量（浓度）的受试化学物，观察化学物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剂十分相近时，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。动物致癌性试验为人体长期接触该物质是否引起肿瘤提供资料。

### 4 定义

4.1 化学致癌作用 (Chemical Carcinogenesis)：化学物质引起肿瘤发生率和/或类型增加、潜伏期缩短的效应。

4.2 化学致癌物 (Chemical Carcinogen)：能引起肿瘤，或使肿瘤发生率增加、潜伏期缩短的化学物质。

### 5 试验的基本原则

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

在开始本试验之前，应尽量搜集受试样品现有的各种资料。

6.1.1 受试样品的商品名和其他名称（包括 CAS 号）。

- 6.1.2 受试样品的结构式、分子式和分子量。
- 6.1.3 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<sup>3</sup> 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（包括在赋形剂或饲料中）。
- 6.1.4 受试样品的成分、主要杂质。
- 6.1.5 受试样品的生产方法、合成路线。
- 6.1.6 储存方法：要有长期储存受试样品（包括在赋形剂或饲料中）的合适方法。否则需定期制备新鲜样品。
- 6.1.7 人类每日可能接触的水平。
- 6.1.8 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 动物种系的选择

通常需用两种动物进行致癌性评价，通常选用大鼠和小鼠，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，而且现有相当多生理学和病理学资料。

在选择合适的动物种类和品系时，必须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。

### 6.2.2 应有动物自发肿瘤的资料。

### 6.2.3 动物性别和年龄

必须使用两种性别的动物。通常使用刚断奶的年幼动物来进行致癌试验，尽量使动物在其生命期内有更长的时间接触受试样品。

### 6.2.4 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

杀部分动物数，应适当增加数量。

#### 6.2.5 动物的管理、饲料和饮水

实验动物和动物试验的环境设施应符合国家相应规定。必须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、垫料等都对试验结果产生巨大影响。购入动物需经检疫方能投入试验。

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），不含对试验有影响的杂质或杂质成分不超过标准，目前已明确某些物质（如抗氧化剂、不饱和脂肪酸、硒等）对致癌试验有影响，而某些物质如农药残留、氯烃、多环芳烃、雌激素、重金属等等对试验影响极大。饲料成分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含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。必要时对饮水中的污染物也应监测。食盒内饲料应定期更换，约每周一次。动物自由饮水。

#### 6.3 剂量组和给受试样品的频率

为了评价受试样品的致癌性，至少要设三个剂量组的试验组及一个相应的对照组。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等（减少程度不多于 10%），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，应不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。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。

#### 6.4 对照组

必须设立对照组。对照组动物不接触受试样品及其它赋形剂，其它条件均与染毒组相同。若染毒必须加入溶剂或添加剂，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。

## 6.5 染毒途径

经口、经皮和经呼吸道吸入是三种主要染毒途径。选择何种途径要根据受试样品的理化特性和对人有代表性的接触方式。

### 6.5.1 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 7d 染毒；也可采用灌胃，最好是每周 7d 染毒，但考虑到实际工作方便，可每周灌胃 5d，但染毒停顿可使动物得到恢复，或会影响结果及最后的评价。

### 6.5.2 经皮

皮肤接触方式可能是用于人类接触该化学物的一个主要途径，可作为诱发皮肤病变的试验模型。

### 6.5.3 经呼吸道吸入

按职业接触方式是每天 6h，每周 5d（称间歇暴露方式）；按环境污染物接触方式为每天 22~24h，留下约 1h 给动物喂食和清理染毒柜，每周 7d（称连续暴露方式）。染毒时间从染毒柜达到预定浓度开始计算。无论那种暴露方式，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 17~18h 恢复，而且在周末恢复时间更长。

采用那一种染毒方式取决于试验设计和人类主要的接触方式。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）。

#### 6.5.3.1 染毒柜

染毒柜的设计必须保证换气次数能达到 12~15 次 /h；柜内氧含量  $\geq 19\%$ ；柜内受试样品浓度均匀；对照组与浓度组动物用柜的设计完全一致；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%；染毒柜应保持一定的负压，以防受试样品意外漏出。

#### 6.5.3.2 物理参数监测

必须连续监测，保证管道通畅以及各个染毒柜条件相同：

空气流量：需连续监测；

柜内受试样品浓度：尽量保持恒定；

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

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

置调试时要多做检测，稳定后可定期检测。

## 6.6 染毒周期

致癌试验应尽量覆盖动物的生命期，曾有建议致癌试验应终生染毒，但考虑到部分动物的寿命比平均寿命长许多，如果到全部动物死亡才结束，则试验可能不必要地拖长。因此，在动物寿命大部分的时间染毒便可以，因为绝大多数化学物质如果有致癌性的话，在这一期间应可出现。

小鼠和仓鼠通常染毒 18 个月，大鼠通常为 24 个月。如果选用的动物种系寿命较长或动物自发肿瘤发生率较低，则小鼠和仓鼠应染毒 24 个月，大鼠 30 个月。如果最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明显而造成高剂量组动物过早死亡，此时不应结束试验。

## 6.7 试验应符合下列标准

6.7.1 因自溶，被同类吃掉，或因管理问题所造成的动物损失在任何一组都不能高于 10%；

6.7.2 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%。

## 6.8 临床观察

试验期内每天至少详细观察一次。必要时还应增加观察的次数，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、冷藏并剖验，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。

应记录所有动物临床表现和死亡情况，特别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。

记录体重变化。前 13w 每周记录体重一次，此后每 4w 记录一次。饲料消耗量在前 13w 每周记录一次，此后如动物健康状况或体重无异常改变可 3 个月记录一次。经饮水染毒时应记录饮水消耗量，以便计算受试样品的摄入量。

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。

第 12 个月、18 个月以及处死动物前作血液涂片和血细胞分类计数，通常先检查最高剂量组和对照组动物，如高剂量组有问题才依次再检查较低剂量组动物。

建议在动物染毒前和染毒后，最好对所有实验动物，至少应对最高剂量组和对照组动物，使用眼科镜或其它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。

## 6.9 病理检查

病理检查，包括大体检查和镜检是致癌试验的重要部分。应全面检查、详细描述和记录。

#### 6.9.1 肉眼剖检

所有实验动物都应进行大体解剖检查，包括在试验过程中死亡或濒死而被处死的动物。如果处死动物，处死前应收集其血样进行血细胞分类计数。保存所有肉眼可见肿瘤或可疑肿瘤组织。应分析剖检与镜检结果的对应情况。

所有的器官组织都应保存并进行镜检。一般包括下列器官和组织：大脑、垂体、甲状腺（包括甲状旁腺）、胸腺、肺（包括气管）、心脏、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（及其骨髓）、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腔、咽、喉等均应检查。

如有必要还可进行其它方面的检查，其结果常可向病理检查提供重要提示。

#### 6.9.2 组织病理检查

理论上应对所有脏器进行全面的检查，但为了节省人力物力和时间，可循以下顺序检查：

6.9.2.1 所有组别所有肉眼可见的肿瘤和怀疑肿瘤组织器官；

6.9.2.2 对以下动物所有保存的器官和组织进行镜下检查，详细描述其病变情况特别是增生、癌前病变和癌变情况：试验过程中死亡或处死的动物；所有最高剂量组和对照组动物；

6.9.2.3 如果数据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显著增加，所有组别动物相同的器官均应检查（但如果高剂量组动物生存率很低，则应检查其较低剂量组，然后再作比较）；

6.9.2.4 如果数据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，应再检查其较低剂量组；

6.9.2.5 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），以便评估暴露组动物病变的变化情况。

#### 6.10 结果统计与评价

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，如体重、生化等指标可用方差分析等，而肿瘤发生率用卡方（ $\chi^2$ ）检验法。

试验组与对照组动物的平均寿命要基本相同,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。

#### 6.10.1 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。

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

#### 6.10.2 在分析受试样品致癌性时应注意:

- 6.10.2.1 非同寻常的肿瘤类型;
- 6.10.2.2 在多个部位发生肿瘤;
- 6.10.2.3 不同染毒途经均诱发肿瘤;
- 6.10.2.4 在不同种系动物或两性别动物均诱发肿瘤;
- 6.10.2.5 从癌前病变到癌变的进展情况;
- 6.10.2.6 癌前病变的潜伏期缩短;
- 6.10.2.7 转移;
- 6.10.2.8 肿瘤非同寻常地增大或增多;
- 6.10.2.9 恶性肿瘤的比例;
- 6.10.2.10 剂量-效应关系显著;

#### 6.10.3 诱癌试验阳性的判断标准

采用世界卫生组织提出的四条判断诱癌试验阳性的标准:

- (1) 肿瘤只发生在剂量组动物中,对照组无该类型肿瘤;
- (2) 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;
- (3) 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;

(4) 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。

上述四条中,试验组与对照组之间的数据经统计学处理后任何一条有显著性差异即可认为受试样品的诱癌作用阳性。必须指出,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。

#### 6.10.4 诱癌试验阴性结果的确立

假如动物试验的规模为两种种属、两种性别，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。

### 7 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外，还应包括以下方面：

- 7.1 血液学检查结果；
- 7.2 眼科检查结果；
- 7.3 肿瘤发生的时间及其发展情况；
- 7.4 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；
- 7.5 病理组织学检查所见的详细描述；
- 7.6 对结果进行处理的统计学方法；
- 7.7 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。

### 8 试验结果的解释

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，可认为该化学物对人不具致癌性。

# 慢性毒性/致癌性合并试验

## Combined Chronic Toxicity / Carcinogenicity Study

### 1 范围

本规范规定了动物慢性毒性和致癌性合并试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于同时检测化学品的慢性毒性和致癌性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (NO. 453, 12 May 1981)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.4300, June 1996)

### 3 试验目的

通过一定途经（经口、经皮或吸入），动物在正常生命期的大部分时间内反复接触不同剂量（浓度）的受试化学物，观察实验动物主要的慢性毒性效应，确定无作用剂量（浓度），同时观察化学物对实验动物的致癌作用，求出剂量-效应关系。为拟定人类接触该化学物的职业接触限值（OEL）及每日容许摄入量（ADI）提供依据，为评估人体长期接触该物质是否引起肿瘤提供资料。

### 4 定义

4.1 慢性毒性 (Chronic toxicity): 动物在正常生命期的大部分时间内接触受试样品所引起的健康损害效应。

4.2 无可见有害作用水平 (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL): 在规定的试验条件下, 用现有的技术手段或检测指标未观察到任何与受试样品有关的毒性作用的最大染毒剂量或浓度。

4.3 最低可见有害作用水平 (Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL): 在规定的试验条件下, 受试样品引起实验动物形态、功能、生长发育等发生有害改变的最低染毒剂量或浓度。

4.4 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器官。

4.5 化学致癌作用 (Chemical Carcinogenesis): 化学物质引起肿瘤发生率和/或类型增加、潜伏期缩短的效应。

4.2 化学致癌物 (Chemical Carcinogen): 能引起肿瘤, 或使肿瘤发生率增加、潜伏期缩短的化学物质。

## 5 试验基本原则

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,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,以阐明此化学物质的慢性毒性;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。本试验设计需得当、试验过程需合理,可同时检测受试样品的致癌性和主要的慢性毒性。

## 6 试验方法

6.1 受试样品 在开始本试验之前,应尽量收集受试样品现有的各种资料。

6.1.1 受试样品的商品名和其他名称(包括CAS号)。

6.1.2 受试样品的结构式、分子式和分子量。

6.1.3 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<sup>3</sup>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(包括在赋形剂或饲料中)。

6.1.4 受试样品的成分、主要杂质。

6.1.5 受试样品的生产方法、合成路线。

6.1.6 储存方法:要有长期储存受试样品(包括在赋形剂或饲料中)的合适方法。否则需定期制备新鲜样品。

6.1.7 人类每日可能接触的水平。

6.1.8 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 动物种系的选择

可根据急性、亚慢性毒性试验和毒物代谢动力学试验资料选择合适的动物种系。致癌试验通常选择小鼠或大鼠,而慢性毒性试验通常选用大鼠或狗,因此,选用大鼠作本试验较为理想,但也不排除选用其它动物种系的可能性,总之,应尽可能选择对致癌性和慢性毒性敏感,而自发肿瘤发生率又较低的动物。

6.2.2 动物性别和年龄

必须使用两种性别的动物。

通常使用刚断奶或断奶不久的年幼动物来进行试验,尽量使动物在其生命期内有更长的时间接触受试样品和诱发肿瘤。有时候甚至采用在母体宫内便开始接

触受试样品，在脏器形成期，部分组织器官如神经组织对致癌物敏感。

啮齿类动物断奶和适应环境之后要尽快开始试验，最好在 6 周龄之前。如子宫内染毒或在哺乳期染毒则需特别设计。

### 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；如果需要提前剖杀部分动物，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

实验动物和动物试验的环境设施应符合国家相应规定，至少应使用清洁级动物设施进行试验。必须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。

至少应使用清洁级动物进行试验，购入动物需经检疫方能投入试验。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），不含对试验有影响的杂质或杂质成分不超过标准，目前已明确某些物质（如抗氧化剂、不饱和脂肪酸、硒等）对致癌试验有影响，而某些物质如农药残留、氯烃、多环芳烃、雌激素、重金属等等对试验影响极大。饲料成分分析结果应在鉴定报告中列出。

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含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。

必要时对饮水中的污染物也应监测。

食盒内饲料应定期更换，每周至少一次。动物自由饮水。

## 6.3 剂量组和给受试样品的频率

为了评价致癌性试验，至少要设三个剂量组的试验组及一个相应的对照组。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等（减少

程度不多于 10%)，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，应不影响动物的正常生长、发育和寿命，其剂量一般不应低于高剂量的 10%。中剂量应介于高剂量和低剂量之间。

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。

应在高剂量组和对照组设附加组，以观察受试样品的慢性毒性作用的恢复过程。

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动力学资料而调整。

#### 6.4 对照组

必须设立对照组。对照组动物不接触受试样品及其它赋形剂，其它条件均与染毒组相同。若染毒必须加入溶剂或添加剂，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，同时还应设相应的溶剂或添加剂对照组。

#### 6.5 染毒途径

经口、经皮和经呼吸道吸入是三种主要染毒途径。选择何种途径要根据受试样品的理化特性和对人有代表性的接触方式。

##### 6.5.1 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 7d 染毒；也可采用灌胃，最好是每周 7d 染毒，每周灌胃 5d 也是可以接受的。但染毒停顿可使动物得到恢复，或会影响结果及最后的评价。

##### 6.5.2 经皮

皮肤接触方式可能是用于人类接触该化学物的一个主要途径，可作为诱发皮肤病变的试验模型。

##### 6.5.3 经呼吸道吸入

按职业接触方式是每天 6 h，每周 5 d（称间歇暴露方式）；按环境污染物接触方式为每天 22~24 h，留下约 1 h 给动物喂食和清理染毒柜，每周 7d（称连续暴露方式）。染毒时间从染毒柜达到预定浓度开始计算。无论那种暴露方式，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 17~18 h 恢复，而且在周末恢复时间更长。

采用那一种染毒方式取决于试验设计和人类主要的接触方式。虽然连续暴露方式能够模仿环境暴露条件，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）。

### 6.5.3.1 染毒柜

染毒柜的设计必须保证换气次数能达到 12~15 次 /h；柜内氧含量 $\geq 19\%$ ；柜内受试样品浓度均匀；对照组与浓度组动物用柜的设计完全一致；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%；染毒柜应保持一定的负压，以防受试样品意外漏出。

### 6.5.3.2 物理参数监测

必须连续监测，保证管道通畅以及各个染毒柜条件相同：

空气流量：需连续监测；

柜内受试样品浓度：尽量保持恒定；

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

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要做检测，稳定后可定期检测。

## 6.6 染毒周期

慢性试验/致癌试验应尽量覆盖动物的生命期，曾有建议致癌试验应终生染毒，但考虑到部分动物的寿命比平均寿命长许多，如果到全部动物死亡才结束，则试验可能不必要地拖长。因此，在动物寿命大部分的时间染毒即可，因为绝大多数化学物如果有致癌性的话，在这段时间应可出现。

小鼠和仓鼠通常染毒 18 个月，大鼠通常为 24 个月。如果选用的动物种系寿命较长或动物自发肿瘤发生率较低，如小鼠和仓鼠应染毒 24 个月，大鼠 30 个月。

如果最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，其结束的时间也可不同。个别情况下因受试样品毒性明显而造成高剂量组动物过早死亡，此时不应结束试验。

如需提前剖杀动物（至少包括高剂量组雌雄各 20 只和对照组雌雄各 10 只），至少应该染毒 12 个月以上。其资料用于评价和受试样品有关的慢性毒性作用，但并非因老年性改变所导致的病理改变。

6.7 试验中实验动物因死亡而组织自溶、被同类吃掉、或因管理问题所造成的动物损失在任何一组都不能高于 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%。

## 6.8 临床观察

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、冷藏并剖验，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。

应记录每一只动物的临床表现包括神经症状、眼睛改变和死亡情况等，对毒性作用包括疑似癌变应记录其发生和发展情况。

记录体重变化。前 13w 每周记录体重一次，此后每 4 周记录一次。饲料消耗量在前 13w 每周记录一次，此后如动物健康状况或体重无异常改变可 3 个月记录一次。经饮水染毒时应记录饮水消耗量，以便计算受试有样品的摄入量。

#### 6.9 血常规检查和其它血液指标检查

第 3、6、12、18 个月以及处死动物前作血液涂片，检查血红蛋白浓度、血球压积、红细胞数、白细胞计数与分类、血小板数、凝血功能等指标。大鼠每组每性别可检查 20 只。每次检查的动物最好相同。而白细胞分类计数通常先检查最高剂量组和对照组动物，如高剂量组有问题再检查中剂量组动物。

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。

#### 6.10 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，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。指标应包括：

外观：每只动物的尿量和尿比重；

蛋白，糖，酮体，潜血；

沉淀物镜检（半定量）。

#### 6.11 临床生化检查

在第 6 个月及试验结束时进行。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。检查指标包括：

总蛋白浓度、白蛋白浓度、肝功能试验（如碱性磷酸酶，谷氨酸氨基转移酶，天门冬氨酸转移酶， $\gamma$ -谷氨酰转肽酶、鸟氨酸脱羧酶等）、糖代谢、脂代谢、肾功能如血尿素氮等。

#### 6.12 眼科检查

建议在动物染毒前和染毒后，最好对所有实验动物，至少应对最高剂量组和对照组动物，使用眼科镜或其它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。

#### 6.13 病理检查

病理检查，包括肉眼大体检查和镜检，是致癌试验的重要部分。应全面检查、详细描述和记录。

#### 6.13.1 剖检

剖检是病理检查重要的一环，如果做得好，对镜检有极大帮助。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肉眼检查。如果处死动物，处死前应收集其血样进行血细胞分类计数。保存所有肉眼可见肿瘤或可疑肿瘤组织。应分析肉眼剖检与镜检结果的对应情况。

所有的器官组织都应保存并进行镜检。一般包括下列器官和组织：脑\*、(髓/脑桥，小脑皮质，大脑皮质)、垂体、甲状腺（包括甲状旁腺）、胸腺、肺（包括气管）、心脏、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、膀胱、淋巴结、胰腺、性腺\*、子宫、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保存更好。对于吸入试验，整个呼吸系统的组织器官包括鼻、咽、喉等均应检查。

以上有\*号者需称重，大鼠每组每性别可称 10 只，非啮齿类动物包括甲状腺及甲状旁腺应全部称重。

如有必要还可进行其它方面的检查，其结果常可向病理检查提供重要提示。

#### 6.13.2 组织病理检查

所有有肉眼可见的肿瘤和病变的组织脏器均应检查，并可循以下顺序检查：

6.13.2.1 对以下动物所有保存的器官和组织进行镜下检查，详细描述其病变情况特别是增生、癌前病变和癌变情况：

6.13.2.2 试验过程中死亡或处死的动物；

6.13.2.3 所有最高剂量组和对照组动物；

6.13.2.4 如果数据显示高剂量组动物某些组织器官的病变情况与对照组比较显著增加，其较低剂量组动物相同的器官均应检查；

6.13.2.5 如果数据显示高剂量组动物的生存期明显缩短而影响到病变的发生和发展，可能因而受到影响时，应再检查其下一剂量组；

6.13.2.6 需参考受试动物自发突变方面的资料（如相同试验条件下的历史资料），以便评估暴露组动物病变的变化情况。

#### 6.14 结果统计与评价

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、出现病变的动

物数、病变类型等。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，如体重、生化等指标可用方差分析等，而肿瘤发生率用卡方( $\chi^2$ )检验法。

试验组与对照组动物的平均寿命要基本相同，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。

#### 6.14.1 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。

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

#### 6.14.2 在分析受试样品致癌性时应注意：

- (1) 非同寻常的肿瘤类型；
- (2) 在多个部位发生肿瘤；
- (3) 不同染毒途经均诱发肿瘤；
- (4) 在不同种系动物或两性别动物均诱发肿瘤；
- (5) 从癌前病变到癌变的进展情况；
- (6) 癌前病变潜伏期缩短；
- (7) 转移；
- (8) 肿瘤非同寻常地增大或增多；
- (9) 恶性肿瘤的比例；
- (10) 剂量-反应关系增加。

#### 6.14.3 致癌试验阳性的判断标准

采用世界卫生组织（WHO，1969）提出的四条判断致癌试验阳性的标准：

- (1) 肿瘤只发生在剂量组动物中，对照组无该类型肿瘤；
- (2) 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；
- (3) 剂量组动物中多发性肿瘤明显，对照组中无多发性或只少数动物有多发性肿瘤；
- (4) 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。

上述四条中，试验组与对照组之间的数据经统计学处理后任何一条有显著性差异即可认为受试样品的致癌作用阳性。必须指出，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。

6.14.4 在试验中，两种性别，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时，可判定本试验结果为阴性。

## 7 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外，还应包括以下方面：

- 7.1 肿瘤发生的时间及其发展情况；
- 7.2 眼科检查结果；
- 7.3 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；
- 7.4 病理组织学检查所见的详细描述；
- 7.5 慢性毒性表现、靶器官、无可见有害作用水平（NOAEL）；
- 7.6 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。

## 8 试验结果的解释

慢性毒性和致癌性合并试验能够提供受试样品在长期反复接触时的毒性和致癌性资料。为拟定人类接触该化学物的职业接触限值（OEL）或每日容许摄入量（ADI）提供依据。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，可认为该化学物对人不具致癌性。

# 毒物代谢动力学试验

## Toxicokinetics Studies

### 1 范围:

本规范规定化学品毒物代谢动力学试验的原理、要求和方法。

本规范适用于化学品的毒物代谢动力学试验。

### 2 规范性引用文件

Code of Federal Regulations, Title 40, Volume 28, PART 799, Subpart H, Sec. 799.9748 TSCA metabolism and pharmacokinetics.

USEPA OPPTS Health Effect Guidelines (Series 870.7485, June 1996)

### 3 试验目的

为了获得足够的有关受试样品的吸收、分布、生物转化、以及排泄的信息，从而了解它的毒作用机制。从试验所获得的受试样品的基本的代谢动力学参数，可以了解受试样品在组织和/或器官内是否具有潜在的蓄积性和诱导生物转化的作用。根据这些资料，我们可以估计，将动物试验的毒性资料（特别是慢性毒性和/或致癌性资料）外推到人时，是否具有充分性和相关性。

### 4 定义

4.1 代谢 (Metabolism): 外源性化学物在生物体内发生化学变化的全过程。

4.2 毒物代谢动力学 (Toxicokinetics): 定量研究毒物在体内吸收、分布、生物转化、排泄等过程随时间变化的动态规律的学科。

### 5 分阶段的试验程序

毒代动力学试验分为第一阶段试验（获取基本的代谢相关资料的试验）和第二阶段试验（附加试验）。是否需要开展第二阶段试验取决于掌握受试样品的毒性资料以及第一阶段的试验结果。第一阶段常采用经口染毒途径，如果受试样品有其它的接触途径，第一阶段试验中也应包括经皮和/或吸入途径染毒。

#### 5.1 预试验

建议通过预试验选择受试样品毒物代谢动力学试验及代谢试验的条件。

#### 5.2 动物选择

首选大鼠进行试验，也可采用其它已被证明的更敏感的动物种属。

### 5.3 受试样品

#### 5.3.1 采用放射性同位素示踪法标记物的要求：

5.3.1.1 放射活性试验物质的纯度最好达到 95%以上

5.3.1.2 同位素标记物的活性强度和给药剂量，应满足标记受试样品及其代谢产物活性测定的最低检测限。同位素标记物应具有相对稳定性。

5.3.1.3 杂质含量等于或大于 20%时，应对杂质的种类和含量进行鉴定并报告。

5.3.2 采用非放射的测定方法，其特异性和敏感性应等于或大于放射性测定方法。

#### 5.3.3 染毒

首选经口灌胃染毒。特殊的情况下，受试样品可经胶囊或混入饲料喂饲染毒。应根据动物体重确定实际的染毒剂量。

### 5.4 分阶段试验

#### 5.4.1 第一阶段试验

目的是测定低剂量一次性染毒后受试样品生物转化和代谢动力学的数据，并可测定所产生的代谢产物从体内排泄的速率、途径以及代谢产物的类型。

##### 5.4.1.1 动物的数量和性别

第一阶段试验中，初成年雄性大鼠至少需要 4 只。如果有证据证明不同性别的动物的毒性存在明显的差别，则应同时使用两种性别的动物。

##### 5.4.1.2 剂量设计

采用一次性给予受试样品的方法。染毒的剂量应保证在排泄物中检测到它的代谢产物。选择剂量时，如果没有其它的毒性资料可参考，可按照 LD<sub>50</sub> 的几分之一计算。

对于低毒性物质，最大的染毒剂量为 1000mg/kg bw。

##### 5.4.1.3 检测分析

###### 5.4.1.3.1 排泄

分别在不同的时相测定尿液、粪便和呼出气的放射活性。试验得到的数据（从尿液、粪便和呼出气中排出的受试样品量占所给予剂量的百分比）可用于测定受试样品排泄的速率和程度，这将有助于建立质量平衡，结合代谢动力学参数评定受试样品吸收的程度。

动物必须放在单独的代谢笼中。排泄物的收集必须在染毒后第 7d 结束，或者当至少 90%的受试样品被排泄时就终止收集。在收集尿液的第一天，应在染毒后第 6、12、24h 分别收集并测定尿液中总的放射活性。第二天起，每天收集 24h 尿液，测定尿液中总的放射活性，直至试验结束。粪便中总的放射活性的测定在染

毒后 24h 开始，之后每天测定一次，直至试验结束。染毒后 24h 内，如果呼出气中受试样品少于 1%时，应终止对 CO<sub>2</sub>或其他挥发性物质的收集。

#### 5.4.1.3.2 组织分布：

5.4.1.3.2.1 第一阶段试验结束时，处死动物，收集并冷冻下列组织：肝脏、脂肪、胃肠道、肾脏、脾脏、全血以及残余的尸体。证实需要测定上述这些组织以及残余的尸体中的放射活性占受试样品总放射活性（结合的和未结合的放射活性）的百分比。如果亚慢性或慢性试验表明受试样品具有靶器官毒性，那么，也应分析靶器官中受试样品的放射活性，比如，吸入试验中的肺组织、经皮染毒试验的皮肤。

5.4.1.3.2.2 也可采用全身自显影技术进行定量测定，可用于测定受试样品在某种器官中是否蓄积或受试样品在某一种组织中特殊的分布类型。

#### 5.4.1.3.3 代谢

收集动物的排泄物，定性、定量测定其中未发生转化的受试样品和其代谢产物的量。建议在每个时相对代谢产物进行简要的描述。如样品量不够或放射活性较低，也可将几个时相尿液以及粪便收集到一起。必须采用适当的方法对受试动物的尿液、粪便和呼出气进行定性和定量测定。受试样品中的代谢产物的含量等于或大于 5%时，尽量测定其中的所有的代谢产物，从而了解受试样品代谢的各种代谢物之间的关系。如果在这一阶段试验中未能实现对其代谢物进行鉴定，那么，在最后的鉴定报告中应对其进行解释。为了对受试样品进行危险性评价，排泄物中代谢产物的含量虽然少于受试样品总量的 5%，也要求对其代谢产物进行鉴定。尽可能对受试样品及其代谢产物的结构用认可的方法进行鉴定。

#### 5.4.2 第二阶段试验

##### 5.4.2.1 吸收

若第一阶段的试验不能确定受试样品吸收程度，或粪便中受试样品的量占给予的受试样品的总量的 20%以上时，要求测定受试样品的吸收程度。测定受试样品的吸收程度时，或者经静脉给予受试样品，然后测定排泄物中的放射活性；或者受试样品经口染毒后，测量胆汁中的放射活性。

经静脉给予受试样品时，对至少 3 只雄性大鼠（某些情况下也同时使用两种性别的动物）进行单剂量一次性给予受试样品（不超过第一阶段经口染毒使用的剂量）。

经口染毒给予受试样品时，按照第一阶段所述的方法对受试样品进行测定。测定胆汁中的受试样品。试验时至少采用 3 只雄性大鼠（某些情况下也同时使用两种性别的动物），将受试样品一次性静脉注射到大鼠体内。通过在其胆管上插管采

集并监测胆汁分泌液中放射活性的大小,观察受试样品是否经胆汁排泄及所占总量的百分比。

#### 5.4.2.2 受试样品在组织中分布的时间过程。

如需要研究受试样品在所选定的组织中的时间过程进一步评价其可能的毒作用方式。对受试样品的半衰期可能较长,在所选定的组织中可能有蓄积时。该试验中选择对哪些组织进行测定取决于已知的有关受试样品靶器官方面的毒性和/或受试样品的致癌毒性;试验中所需要观察的时相取决于第一阶段试验中得到的代谢动力学方面的资料。试验中时相的选择可灵活掌握。

该试验中,每个时相都应采用适当的剂量对3只大鼠经口染毒,然后,测定受试样品在所选定组织中分布随时间变化的过程。使用单性别的实验动物即可,除非不同性别的动物间表现出的靶器官毒性不同。评价组织分布时应使用适当的试验技术对分布于组织的代谢产物的总量以及对代谢产物的分布特点进行评价。

#### 5.4.2.3 血浆代谢动力学

该试验的目的是为了对受试样品的基本代谢动力学参数(半衰期、分布体积、吸收率、分布容积)进行估计。为了了解受试样品的生物可利用性并说明受试样品的清除率的最高值是否取决于受试样品的剂量,应提供有关受试样品代谢动力学的资料。进行该试验时,每组至少应有3只大鼠。至少应设立2个剂量组,常选择主要的毒性试验中所得到的最大无作用剂量和最低有作用剂量。受试样品染毒后,应对每只实验动物在适当的时相按照适当的取样方法进行取样。使用适当的方法分析全血和血浆中总的放射活性(或者,采用非放射性测定方法时,测定受试样品的总量)并计算受试样品在全血及血浆中含量的比率。使用BP97软件进行参数分析。

血浆代谢动力学参数参照《农药登记毒理学试验方法 GB15670-1995》,主要包括:

$T_{1/2a}$  (a相半减期)

$T_{1/2b}$  (b相半减期)

$k_a$  (吸收速率常数)

$k_e$  (排泄速率常数)

$k_m$  (代谢速率常数)

$T_{max}$  (血中最大浓度时间,峰值时间)

$C_{max}$  (血中最大浓度)

$V_c$  (中央室表观容积)

$V_d$  (表观分布容积)

AUC（曲线下面积）

CL（清除率）

F（吸收分数，%）

#### 5.4.2.4 诱导试验

##### 5.4.2.4.1 在下列情况下，应进行生物转化的诱导试验：

受试样品的代谢过程被诱导后其毒性增加；受试样品的剂量和代谢之间非线性关系；第一阶段试验中，通过对受试样品代谢产物鉴定，鉴定出了有毒性的代谢产物。

用可以引起诱导作用的一种因素进行诱导，测定被诱导酶的活性。可用于评价酶诱导作用的方法包括几种体内的和体外的评价方法。如果证实了受试样品的诱导作用，就应说明这种诱导作用与亚慢性和/或慢性毒性的关系。

5.4.2.4.2 如果上述体外或体内试验的结果证明在受试样品的代谢过程中其毒性发生明显的改变，这时应测定 I 相和 II 相反应酶的活性。这些结果有助于将有关的酶与受试样品对人体的危险性联系起来，因为，某些存在于动物体内的同工酶在人体内却不存在，相反，人体的某些同工酶在动物体内不存在。

##### 5.4.2.4.3 生理性模型

在测定药物和外来化学物分布的动力学参数时，常使用传统的方法建立模型，即将哺乳动物用单纯的数学模型表示。另外，最近使用了一些模型，它们考虑了动物本身的生理过程，可以限定受试样品分布的一些生物特点以及组织中剂量与组织反应的关系。应用这些所谓的生理性模型，允许将一种动物的试验结果外推到另一种动物的试验结果，这在进行危险性评价时常常是必需的。该指南鼓励将这种生理性模型作为试验工具来解决与受试样品生物转化和代谢动力学有关的问题。生理性模型所得到的试验结果有助于比较受试样品的生物转化和代谢动力学在所用的动物种属以及人类之间差异，有助于某些染毒方法特殊的受试样品的危险性评价。如果受试样品由生理模型所获得的代谢动力学结果将提供足够的资料来满足本规范的要求并提交鉴定报告。

#### 5.5 鉴定报告

除一般鉴定报告的内容外，还应包括以下方面：

##### 5.5.1 受试样品：

应注明放射性同位素的类型、标记物结合的部位、标记物的比活性以及放射性纯度进行说明。

5.5.2 试验方法：受试样品的配制和所用赋形剂，动物组数及每组的动物数；受试样品的剂量以及给予的体积；染毒途径；染毒次数；禁食时间；每只动物的

总的放射活性；动物管理；样品收集；样品的管理；鉴定各种代谢物所用的分析方法；对各种代谢物进行定性和定量分析；其他的测定试验及其方法（应说明分析代谢产物所采用的方法的合理性）。

#### 5.5.3 统计分析方法：注明毒代动力学参数分析程序

#### 5.5.4 试验结果

5.5.4.1 结果中应综合所有的试验数据，用适当的统计表表示出来；也可给出有代表性的色谱及分光光度法测定的数据。说明受试样品可能的代谢途径和各种代谢产物的分子结构。

5.5.4.2 结果中还应包含下列内容：说明采用其他的染毒途径的正当性；说明代谢动力学及代谢试验中所选择的剂量水平的正当性；对代谢动力学和代谢试验的设计中的预试验进行叙述；说明尿液、粪便和呼出气中放射活性恢复的量及比例，对于经皮染毒的试验，应说明皮肤、皮肤冲洗液以及敷料中残余的放射活性；每克组织中所含有的受试样品占给予的受试样品总量的百分比及微克数；经相关的途径染毒后，血浆中代谢产物的含量及其代谢动力学参数；经相关的途径染毒后，受试样品吸收的速率和程度；排泄物中受试样品及其代谢产物（其含量占染毒总量的百分比）的量；有关每只动物的资料。

#### 5.5.5 结论

讨论和结论中应包含如下内容

5.5.5.1 对受试样品的代谢途径进行合理解释。

5.5.5.2 可能的情况下，应强调采用不同种属和不同性别动物进行试验时，其结果有无区别。

5.5.5.3 对各种代谢产物的性质、含量、清除率、其潜在的生物蓄积性进行讨论，合适的情况下，应说明其在组织中的残余的量。

5.5.5.4 试验者应根据试验结果，简明地提出试验的结论。

## 6 第一阶段试验中其他的染毒途径。

### 6.1 经皮染毒

经皮染毒时，应设立1个（或多个）剂量组。低剂量的选择应符合该部分第5.2段的要求。经皮染毒的受试样品应溶解在适当的溶剂中，采用适当的染毒体积。试验开始前，剪去受试动物躯干区域的毛。若采用刮毛的方法，应在试验前24小时进行。剪毛和刮毛时，应注意避免损伤皮肤，否则，将改变皮肤的通透性。受试样品涂敷的面积约占动物体表面积的10%。对于高毒性物质，其在皮肤的涂敷面积可少于体表面积的10%。用薄膜准确覆盖涂敷部位。试验中所有动物

的染毒面积应相同。涂敷区域应采用适当的方法覆盖。染毒后应将每只动物单独饲养。

**皮肤冲洗试验：**为了对用稀肥皂水或水冲洗染毒部位的受试样品后，受试样品被清除的程度作出估计，必须进行冲洗试验。按照该部分第 5.2 段中叙述的方法，采用单一剂量，对 2 只动物的皮肤进行染毒。染毒后 2~5 min，用稀肥皂水或水冲洗染毒区域的皮肤。必须测定冲洗液中受试样品的量来评价冲洗对受试样品的清除程度。除非在受试样品具有腐蚀性的情况下，涂敷受试样品后，其染毒过程至少为 6h。去掉涂敷物后，必须对染毒部位按皮肤冲洗试验的要求进行冲洗。应测定覆盖物及冲洗液中受试样品的量。试验结束时，处死动物，取下染毒部位的皮肤，并适当地取下其中的一部分，测定皮肤中残留的放射活性。

## 6.2 经吸入染毒。

经吸入染毒时，应采用 1 种（或多种）浓度的受试样品。剂量的选择应符合第 5.4.1.2 段中的要求。吸入染毒时应采用锥形鼻套或头套的方式，防止受试样品经其他途径被吸收。如果针对受试样品的特异性采用了其他的吸入染毒方式，应说明其染毒方式的正当性。每组动物进行一定时间的一次性染毒，染毒时间一般为 4~6h。

## 7 试验结果的解释

本试验能够提供受试样品对实验动物的毒物代谢动力学资料。虽然其试验结果仅能有限地外推到人，但它可为确定人群暴露的危险性评价及其毒作用机制提供有价值的信息。

## 参考试验方法

# 皮肤变态反应试验-局部淋巴结法

## Skin Sensitization-Local Lymph Node Assay

### (LLNA)

#### 1 范围

本规范规定了动物皮肤变态反应试验的基本原则、要求和方法  
本规范适用于动物皮肤变态反应试验。

#### 2 规范性引用文件

OECD Guideline for Testing of Chemicals ( No. 429 Feb.2001)

#### 3 试验目的

局部淋巴结法 (LLNA) 是一个鉴别皮肤致敏化学物或者确定化学物无明显皮肤致敏性的可供选择的方法。

#### 4 定义

皮肤致敏 (过敏性接触性皮炎) (Skin Sensitization, Allergic Contact Dermatitis): 皮肤对一种物质产生的免疫源性皮肤反应。对于人类这种反应可能以瘙痒、红斑、丘疹、水疱、融合水疱为特征。动物的反应不同,可能只见到皮肤红斑和水肿。

#### 5 试验基本原理

LLNA 的基本原理是致敏诱导化学物接触位点淋巴结淋巴细胞增殖。增殖与化学物的剂量 (或致敏原的致敏力) 成比例, 因此可以得到一个简单、客观、定量的致敏作用测量法。LLNA 通过比较受试样品试验组与赋形剂对照组增殖的剂量-反应关系来评估增殖状况。通过测定受试样品试验组与赋形剂对照组的增殖比率即刺激指数 (SI), 当该指数至少为 3 时才能作为潜在皮肤致敏物进一步评估。

LLNA 是一个体内方法, 因此不能排除在评估接触致敏活性中使用动物, 但它可以达到减少实验动物数量的目的。LLNA 在接触致敏试验中动物的使用上有特别的安排。LLNA 是建立在致敏诱导期化学物刺激免疫反应的基础上, 与豚鼠试验不同, LLNA 不进行激发诱导皮肤的超敏反应。LLNA 也不需要辅助试验, 与

豚鼠最大反应试验（GPMT）不同。而且 LLNA 减少动物的伤痛。尽管 LLNA 与传统的 GPMT 比较具有不少优点，但也有它的局限性（比如对一些金属会有假阴性结果，而对一些皮肤刺激会出现假阳性结果）。

## 6 试验方法

### 6.1 受试样品：

包括液态、固体和颗粒状受试样品。

赋形剂应在考虑最大试验浓度及可溶性的基础上选择，使溶液/悬浮液适合于受试样品的使用。推荐赋形剂按优先顺序为：丙酮/橄榄油（4:1，V/V）、二甲基甲酰胺、甲基甲乙酮、丙二醇和二甲基亚砷，如具备充分的科学依据，其它的赋形剂也可用。在某些情况下有必要增加有关的临床溶剂或商品化受试样品作为对照。应注意在赋形剂中加入亲水物质，这样既能湿润皮肤，又不会立即流失，但要避免使用水作为赋形剂。

### 6.2 实验动物和饲养环境

#### 6.2.1 动物种属

首选未生育过和未怀孕的成年雌性小鼠（CBA/Ca或CBA/J品系）。试验时动物龄为8~12w，体重差异应低于平均体重的20%。选择其他种属或性别动物时应说明理由。

#### 6.2.2 动物饲养

动物实验室应符合国家相应规定。常规饲料喂养，自由饮水。

#### 6.2.3 动物数量

每一剂量组至少需要4只动物，设三个剂量组，一个阳性对照组和一个赋形剂对照组。如需收集每只动物的资料，则每组至少需要5只动物。

### 6.3 剂量水平

剂量的选择可以从下列剂量系列中选择：100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%等。在选择三个连续剂量时应考虑现有的急性毒性和皮肤刺激性资料，最高剂量组应避免出现系统毒性和剧烈的局部皮肤刺激性。对照组动物除了不给予受试样品外，其余处理措施同试验组。

### 6.4 试验步骤

#### 6.4.1 试验前准备

将随机选择分组的动物进行编号（不能在耳朵上标记），试验前 5d 置于实验

室饲养以适应实验室条件，并于试验前检查，确认皮肤无损伤后方可进行试验。

#### 6.4.2 对照

##### 6.4.2.1 阳性对照

每个试验均应设立阳性对照。首选的阳性物为己基苯乙烯乙醛（CAS No 101-86-0）和巯基苯并噻唑（CAS No 149-30-4）。根据具体情况，也可以使用其它阳性对照物。如同一实验室以往的阳性对照资料显示，在6个月或更长时间内的阳性反应具有良好的一致性，可每半年进行一次阳性物对照试验。所选择阳性对照物的剂量应能诱导明显的效应，但又不过分严重，与阴性对照相比，其刺激指数（SI）的增加在3倍以上。

##### 6.4.2.2 阴性对照

6.4.2.2.1 溶剂对照 溶剂必须是非致敏物，不与受试样品发生化学反应。首选溶剂是水或水溶性溶剂。

6.4.2.2.2 空白对照 如果没有文献资料或历史性资料证实所用溶剂不具有致敏作用时设定。

#### 6.4.3 试验步骤

第1天：确定并记录每只动物的体重。将25 μl 受试样品稀释液、赋形剂或阳性对照物涂于相应组别的动物耳背。

第2~3天：重复第一天的操作。

第4~5天：不进行处理。

第6天：记录每只动物的体重。将250 μl 含20 μCi (7.4e+5 Bq) <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶脱氧核苷的PBS注入所有试验组和对照组小鼠的尾静脉；或注入250 μl 含2 μCi (7.4e+4 Bq) <sup>125</sup>I-碘脱氧尿嘧啶核苷和10<sup>-5</sup>M 氟脱氧尿嘧啶核苷的PBS。5小时后处死动物。摘取每个试验组动物一只耳朵的淋巴结并浸泡于PBS液中，以每组动物的淋巴结为一个单位浸泡在一起；或摘取每只动物的双侧淋巴结并浸泡于PBS液中，以每只动物的淋巴结为一个单位单独浸泡。（淋巴结确认和解剖的细节及图表参考ICCVAM免疫毒性工作组LLNA草案）。

#### 6.4.4 细胞悬液的准备

淋巴结细胞的单细胞悬液可用200 μm的不锈钢网纱进行轻柔机械离解，然后用PBS洗涤两次，并用5%TCA 4℃沉淀18小时。沉淀物用1ml TCA重新溶解转移至闪烁瓶中（内含1.0ml闪烁液）进行<sup>3</sup>H-计数，或转移至γ计数管中进行<sup>125</sup>I-计数。

#### 6.4.5 细胞增殖测定（合并放射能）

用  $\beta$ -闪烁计数仪测定  $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶脱氧核苷，以每分钟衰变数（dpm）计算；或用  $^{125}\text{I}$ -计数仪测定  $^{125}\text{I}$ -碘脱氧尿嘧啶核苷，亦以 dpm 计算。根据方法的不同，单位分别为 dpm / 试验组或 dpm / 只。

#### 6.4.6 临床观察

仔细观察动物的任何临床征象、用药局部刺激反应或系统毒性。系统观察并记录每只动物的临床表现。

#### 6.4.7 体重

在试验开始和结束时（处死动物前）均应称量并记录每只动物的体重。

#### 6.4.8 结果计算

6.4.8.1 以刺激指数（SI）表示结果。若以组为单位，则 SI 为试验组 dpm / 赋形剂对照组 dpm；若以每只动物为单位，SI 为每个受试样品试验组和阳性对照组的平均 dpm / 赋形剂对照组的平均 dpm。赋形剂对照组的平均 SI 为 1。

6.4.8.2 使用单只动物法计算 SI 更有利于数据的统计分析。在选择合适的统计分析方法时，应注意可能存在的方差不齐和其它相关问题，有必要对数据进行转换或者进行非参数统计分析。用适当的方法解释数据，对试验组和对照组的所有个体资料进行评价，并从最好的剂量-反应曲线计算可信限（CI）。同时应注意可能存在个别异常反应，这时应该选择其它的分析方法（如用中位数而不是平均数）或剔除该异常值。

6.4.8.3 阳性反应的确定包括刺激指数（SI） $\geq 3$ 、存在剂量-反应关系、具有统计学意义。

6.4.8.4 如果需要阐明结果，应该考虑到受试样品的多种特性，包括其是否与已知的皮肤致敏物有结构关系、是否引起严重的皮肤刺激、以及剂量-反应关系的性质。

### 7 鉴定报告

鉴定报告应包括以下内容：

#### 7.1 受试样品

确切的资料（如CAS编号、来源、纯度、已知的杂质和标签号）；

自然属性和理化特性（如挥发性、稳定性和溶解度）；

若为混合物，其成分和相关比例。

## 7.2 赋形剂

确切的资料（纯度、浓度、使用体积）；  
选择的依据。

## 7.3 实验动物

动物品系；  
数量、年龄和性别；  
动物来源、饲养条件等。

## 7.4 试验主要步骤

受试样品准备和使用的详细情况；  
剂量选择的依据（如果进行预试验，列出剂量范围、结果）；  
受试样品和赋形剂的使用浓度及使用总量；  
食物和饮水质量的详细情况（包括饮食类型和来源、饮水来源）；  
实验室现有和/或既往阳性和阴性对照资料。

## 7.5 结果

染毒前和处死前每只动物的体重；  
以表格形式列出整组的dpm平均值/中位数，单只动物的dpm值，以及整组和单只动物的数值范围，每个剂量组（包括赋形剂对照组）的SI；  
统计分析；  
毒性发作和症状出现的时间进程，包括每只动物的局部皮肤刺激反应。

## 7.6 结果讨论与结论

简要的结果评价，剂量-反应关系分析，所用统计分析方法，得出该受试样品是否为皮肤致敏物的结论。

## 8 试验结果的解释

本法可用于筛选具有中度至重度致敏反应的受试样品。但LLNA不能代替豚鼠试验。如果为阳性结果，则受试样品可确定为潜在致敏物，不必进行豚鼠试验。如果如为阴性结果，则需进行豚鼠皮肤致敏试验，以进一步确定受试样品是否为致敏物。

# 大肠杆菌回复突变试验

## *Escherichia coli* Reverse Mutation Assay

### 1 范围

本规范规定了大肠杆菌回复突变试验的基本原理、要求和方法。  
本规范适用于检测化学品的遗传毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No.472,1983)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.5100 June 1996)

### 3 试验目的

检测化学物质的诱变性，预测其遗传危害和潜在致癌作用的可能性。

### 4 定义

回复突变 (Reverse Mutation): 细菌在化学突变物质作用下由营养缺陷型回变到野生型这一过程。

### 5 试验基本原理

大肠杆菌色氨酸和乳糖营养缺陷型突变株 ( $\text{Trp}^-/\text{Lac}^-$ ) 在低限营养培养基上，利用补充微量色氨酸或乳糖和硫胺素后长成很薄尚可见的菌苔。经诱变剂处理，色氨酸及硫胺素耗尽后发生回复性突变，即回复突变为野生型 ( $\text{Trp}^+/\text{Lac}^+$ ) 菌落，能继续生长，冲破菌苔，增殖成明显可见的菌落。

### 6 试验方法

6.1 受试样品配制 用水、二甲基亚砷 (DMSO)、乙醇或氯仿等做溶剂。乙醇和 DMSO 至少应在培养基、水或 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中稀释 20 倍 ( $\leq 5\%$ , V/V)。氯仿只在点试验中用作溶剂。将一定量溶液加在纸片上，使氯仿挥发后才可放到试验用的平板上。所有的受试样品在未配成溶液时，均应放于 4℃ 冰箱。先用最适溶剂配成贮存液。贮液应在溶解度许可下做成最高浓度，并置低温

冰箱避光保存。用于平板掺入法时，应对受试样品进行毒性预测试。根据需要可做成几个不同浓度的稀释样品。对于化学性质不稳定的受试样品应在每次试验时新鲜配制。

## 6.2 剂量设计

测定受试样品的毒性或有效浓度的预备试验方法：取  $2 \times 10^8$  细菌 / ml 的生长培养物，在生长培养基中稀释，制成  $10^7$  细菌/ml 的稀释菌液约 30ml，分装在 8 支试管中，第 1 管 4ml 其余每管 3ml。在第 1 管中配制高剂量受试样品，由此开始，按 1:3ml 向其他各管作顺序稀释。留出最后一管作不加样品的对照（每步稀释用一支干净吸管）。混匀后，置 37℃ 孵育一天或过夜。观察细菌生长抑制的最低受试样品剂量，找出适合回变试验的剂量。一般最高剂量 5mg/皿，至少设 5 个不同剂量组，每一检测剂量至少要做 3 个平行样。

## 6.3 对照组

### 6.3.1 阳性对照 推荐使用以下几种：

4-硝基喹啉氧化物 (4-nitroquinoline-N-oxide)

N-乙基-N-硝基-亚硝基胍

砒甲基甲烷

2-氨基苄 (2-AF)

甲基甲烷磺酸脂 (MMS)

克菌丹 (Captan)

### 6.3.2 阴性对照

6.3.2.1 溶剂对照 溶剂必须是非致突变物，不与受试样品发生化学反应，不影响细菌存活和  $S_9$  活性。首选溶剂是水或水溶性溶剂。二甲基亚砷 (DMSO) 也是常用溶剂，但使用时浓度不应大于 0.5%。

6.3.2.2 空白对照 如果没有文献资料或历史性资料证实所用溶剂不具有有害作用或致突变作用时设定。

6.4 菌株 推荐使用 WP2、WP2UvrA、CM791 和 CM891（分别为带质粒 pKM 101 的 WP2 和 WP2uvrA），其它菌株在适当的条件下也可采用(如下表)。

常规试验大多用 WP2、WP2UvrA 和 CM891。以 CM891 最敏感。Trp<sup>+</sup>回变系统在鉴定碱基置换诱变剂方面非常灵敏，也有一定能力检测非特异移码诱变剂。Lac<sup>+</sup>回变系的两个菌株是检测移码型诱变剂的特异菌株。两个突变系统的菌株适当组合使用，有可能检测众多类型的诱变剂。

### 细菌菌株

菌 株	突变类型	相关基因
E.coli B		
WP2	置换	$\Delta trp$ uv 抗性
CM791	置换	$\Delta trp$ uv 抗性 pKM101
WP2uvrA	置换	$\Delta trp$ $\Delta uvrA$
CM891	置换	$\Delta trp$ $\Delta uvrA$ pKM101
E.coli K12		
ND160	置换	$\Delta lac$ Z $\Delta thi$
MR2-120	置换	$\Delta lac$ Z $\Delta uvrB5$

注:  $\Delta trp$ : 色氨酸基因缺陷  $\Delta lac$ : 乳糖缺陷  $\Delta uvrA$ : 缺失 DNA 修复 *uvrA* 基因

#### 6. 4. 1 菌株生物学特性鉴定

6. 4. 1. 1 色氨酸依赖性鉴定 在含 0. 4%葡萄糖的 Davis. Mingioli 的选择培养基 (D-V 培养基) 上, 倒上含  $10^8$  细菌的顶层软琼脂, 加极微量结晶 L-色氨酸, 置 37°C 温箱孵育 12~24h 观察结果。WP2、WP2UvrA 和 CM891 仅在加色氨酸的区域出现生长菌苔 (白色圆形菌苔)。与未加色氨酸区域形成鲜明对照。表明 WP2、WP2UvrA、CM891 对色氨酸的依赖。

#### 6. 4. 1. 2 乳糖、硫胺素依赖性鉴定

在含 0. 4%乳糖的 D-V 培养基上, 倒上含  $10^8$  细菌的顶层软琼脂, 软琼脂中事先已补充 2. 5% (V/V) 肉汤和 25% (W/V) 的硫胺素。经 37°C 孵育 48h 观察结果, ND160、MR2-102 有菌苔生长。表明 ND160 和 MR2-102 对乳糖和硫胺素的依赖。可用不加乳糖和硫胺素作对照。

6. 4. 1. 3 UvrA/B-紫外线敏感试验 在营养肉汤琼脂培养基上, 用浸湿 WP2UvrA、CM891、MR2-102 培养物的滤纸条或棉拭作平行划线。印上细菌培养物的半边平板, 置紫外光下照射 (15W, 33cm) 8 秒钟, 经 37°C 孵育 24h 后, 照射部分缺乏细菌生长, 未照射部分则有生长, 以 WP2 和 ND160 作为不受抑制的对照。如要作紫外线辐射相对敏感性比较测定, 可调整辐射时间, 分别用 4、6、8、10、12s。

6. 4. 1. 4 R 因子-氨苄青霉素敏感试验 先将 CM891 的培养物划线在营养肉汤琼脂培养基上, 再将浸湿氨苄青霉素 (8mg/ml 0. 02mol/L NaOH) 的滤纸条交叉放在其上。片刻后, 除去纸条, 待干, 放 37°C 温箱孵育 24h。交叉处无细菌生长抑制带, 则表明 CM891 对氨苄青霉素有抗性。可用 WP2 等其他 4 个菌株作对照。

6. 4. 1. 5 回变特性 在含 0. 4%葡萄糖或乳糖的培养基上, 用点试验 (见试验方法) 检查 WP2、WP2UvrA 和 CM891 对甲基甲烷磺酸脂 (0. 03ml/ml, 每纸片  $10 \mu l$ ) 的回变效应。在加有该试剂的纸片周围可见较多回变菌落, 3 个菌株菌落数量顺序为 CM891>WP2 UvrA>WP2。用疟涤平 (50mg/ml, 每纸片  $10 \mu l$ ) 检查 ND160 和 MR2-102

的回变效应。在纸片周围的回变菌落增多，2个菌株菌落数量为ND160>MR2-102。

6.4.1.6 自发回变 在含0.4%葡萄糖或乳糖的D-V培养基上，倒上含 $10^8$ 细菌的低限顶层软琼脂，软琼脂中若事先已补充0.1mg%色氨酸或25 $\mu$ g%硫胺素和2.5%(V/V)营养肉汤，则经37~48h 孵育后的自发回变菌落数(个/皿)为：WP2 15 (11~19)、WP2UvrA 13 (7~23)、CM891 48 (27~69)、ND160 10 (2~19)、MR2-102 3 (1~5)。软琼脂中无色氨酸或硫胺素时，平板中应不出现菌苔，自发回变数甚少，最多只有几个。

经过上述遗传性状鉴定合格的菌株方可用作试验和制备保藏菌种。用同样方法对保藏菌种定期进行复核。如发现有污染、变异及死亡应弃去。

6.4.2 菌种保藏 保藏菌种的目的不只是保存菌种的生命活存，更重要的是保持菌种的生物学特性，即在连续传代中仍保持其原种的典型特征。

6.4.2.1 增菌 取菌种培养物在营养肉汤琼脂平板或斜面培养基上划线接种。经37℃孵育过夜，选生长良好的菌种培养物贮于4℃冰箱，至1个月再划线传代一次。欲使保藏期限延长，应接种于半固体营养肉汤琼脂管。经培育后(37℃过夜，或23℃室温存放数天)，选生长良好之培养物，试管口用融化的固体石蜡小心封闭，不留空隙。置4℃或室温保存。用半固体法贮存，培养物至少可存活数月。

6.4.2.2 保存 用无菌接种针接触平板上的单个菌落，将少量菌种移入营养肉汤，经37℃孵育过夜，在生长良好的过夜培养菌液中，加8%DMSO或12.5%甘油作保护剂。小心分装，每管或每安瓿1ml，储于-80℃低温冰箱或液氮容器内。

## 6.5 试剂配制

6.5.1 20%葡萄糖水溶液 16ml 分装, 0.068MPa 高压灭菌 10min。贮于4℃冰箱。

6.5.2 20%乳糖水溶液 同葡萄糖水溶液配制方法。

6.5.3 5mg%硫胺素水溶液 0.068MPa 高压灭菌 10min。贮于4℃冰箱。

6.5.4 0.1%L-色氨酸水溶液 0.068MPa 高压灭菌 10min。加几滴氯仿，贮于4℃冰箱。如用DL-色氨酸，应用加倍量。

6.5.5 10%酪蛋白水解物水溶液 溶解后，10ml 分装，0.103MPa 高压灭菌 20min，贮存4℃冰箱。

## 6.5.6 Davis-Mingioli 盐 (D-M 盐) (4×) 贮存液

成分：	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4g
	柠檬酸三钠	1g
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4g
	加蒸馏水	至 1000ml

### 6.5.7 选择培养基底层（底层培养基）

成分：	D-M 盐溶液（4×）	200ml
	琼脂	16g
	20%葡萄糖或乳糖溶液	16ml（已灭菌，临用时加）
	蒸馏水	至 800ml

加热使琼脂融化后，将 pH 调节至 7.2，0.103MPa 高压灭菌 20min，待凉至 80℃左右加入 20%葡萄糖或 20%乳糖溶液 16ml（终末浓度为 0.4%，W/V，也可用 1~2%）。充分混匀，然后倒平皿，每皿（直径 9cm）约 25 ml。待凝固，倒置放入温箱中过夜，使表面干燥，剔去污染之平板。此即底层培养基，用于回变试验。

若在上述选择培养基成分中补充 10%酪蛋白水解物 20ml（终末浓度 0.25%）和 0.1%L-色氨酸 0.2ml（终浓度 0.25 μg/ml）可作存活力试验。

### 6.5.8 选择培养基顶层（顶层培养基）

成分：	NaCl	0.5g
	琼脂	0.6g
	蒸馏水	100ml
	0.1%L-色氨酸	0.1ml（已灭菌，临用时加）
	或	
	营养肉汤	2.5ml
	5%硫胺素	0.5ml（已灭菌，临用时加）
	蒸馏水	至 100ml

加热溶解后，0.103MPa 高压灭菌 20min，贮于 4℃冰箱。临用前将其融化，并加入灭菌 0.1%色氨酸 0.1ml（终末浓度为 1 μg/ml，也有用 5 μg/ml，1 μg/ml 已能满足试验要求。用于 3 株色氨酸缺陷型菌株），或加入营养肉汤 2.5ml（也有用 5ml 的）和 5mg% 硫胺素 0.5ml（用于 2 株需乳糖菌）。色氨酸及乳糖和硫胺素的量是培养基的关键成分，必须标准化。用于点试和平板掺入试验，菌株特性鉴定。

6.5.9 D-M 应用液 将稀释液 pH 调至 7.2，根据需要不分装或每 50ml 分装一瓶，0.068MPa 高压灭菌 10min。临用前在试管中再分装成 10ml 一份，并再次高压消毒（高压锅中央放一只盛有蒸馏水的 1 升容量烧杯，以减少液量的损失）。试验刚开始前用无菌操作另做一批 0.9ml 分装管。用于受试样品毒性预备试验，存活力测定，制备生长培养液。

### 6.5.10 生长培养液

成分：D-M 应用液	400ml
20%葡萄糖溶液	8ml
10%酪蛋白水解物溶解	10ml
0.1%L-色氨酸溶液	4ml

灭菌的 D-M 应用液 (pH7.2) 中, 用无菌操作加入其他各成分, 使 L-色氨酸终末浓度为  $10 \mu\text{g/ml}$ 。用于 WP2 系菌株 4~5h 生长培养。

6.5.11 代谢活化系统 用肝混合功能氧化酶混合液 ( $S_9$  混合液)。

### 6.6 试验步骤

#### 6.6.1 点试法

##### 6.6.1.1 增菌

从保存菌种平板、斜面或冰冻管中, 用接种针挑取单个菌落或取一点培养物, 接种至 5~10ml 营养肉汤中或生长培养基中。37°C 振荡孵育过夜 (约 18h), 菌液浓度可达  $1 \sim 2 \times 10^9/\text{ml}$ 。如将过夜培养物再稀释在新鲜生长培养基中 (0.1:10ml), 经 37°C 振荡孵育 4~5h, 可给出  $10^9/\text{ml}$  细菌数。需要时将此对数期生长物经离心、清洗、加等体积 0.1M PBS 做成菌悬液。

##### 6.6.1.2 接种与检测

在小试管中依次加入菌悬液 0.1ml 约  $10^8$  个细菌; 已融化的 45°C 保温的顶层软琼脂 (WP2 品系需含色氨酸, ND160 品系需含硫胺素和肉汤) 2ml; 需要代谢活化时加  $S_9$  混合液 0.3~0.5ml。充分混匀, 立即倒在底层上 (WP2 品系需含葡萄糖, ND160 品系需含乳糖), 铺平、冷凝后, 放上浸渍过或加有  $20 \mu\text{l}$  受试样品的滤纸片, 或直接滴受试样品液在平板上。一块平板上最多可以放 5 张纸片 (或 5 个斑点)。应包括溶剂对照、阳性对照和几个不同剂量的测试受试样品。待受试样品在平板上不再流散, 小心地翻转平板, 放入 37°C 温箱, 避光孵育 48h, 观察纸片或点样周围的回变菌落数。此法只用作样品定性、过筛。但对强烈的挥发性的诱变剂 (如 MMS、克菌丹) 检出效果很好。对其他受试样品此法不灵敏。

#### 6.6.2 平板掺入法

6.6.2.1 平板掺入法与点试验法基本相似, 不同之处在于受试样品直接掺入平板中。在一系列小试管中, 每管可按以下次序加液: 稀释受试样品液 0.1ml,  $S_9$  混合液 0.3~0.5ml (不需代谢活化时可省去), 顶层琼脂 2ml (45°C), 菌悬液 0.1ml,

约  $10^8$  个菌。充分混匀后，立即将其倒在底层平板上。待顶层凝固，将平板翻转放入温箱， $37^\circ\text{C}$  避光孵育 48h。计数平板上的回变菌落个数。

平板掺入法可结合预培养法进行。将稀释受试样品液 0.05ml 置于试管（ $16 \times 100\text{mm}$ ）中，加入  $S_9$  混合液 0.3~0.5ml 或 0.1mol/L PBS (pH7.4) 0.3~0.5ml (后者作无  $S_9$  混合液对照)，再加进细菌培养物 0.1ml， $30^\circ\text{C}$  振荡孵育 30min，经此预培养反应物中加入顶层软琼脂 2ml（ $45^\circ\text{C}$ ），以后操作步骤同平板掺入法。

### 6.6.3 回复突变频率测定

取过夜培养物，离心（4000rpm，10min）洗涤、打碎沉淀，悬浮在 D-M 应用液中，使成  $10^9/\text{ml}$  菌浓（OD<sub>450nm</sub> 0.8）。在小试管中加受试样品稀释液 0.05ml，需要时加  $S_9$  混合液 0.3~0.5ml 和菌悬液 1ml。 $37^\circ\text{C}$  振荡孵育 30min。取其中 0.1ml 经处理的反应物，加至盛有 0.9ml 一管的一系列 D-M 应用液中进行逐级稀释，总的稀释倍数为  $10^5 \sim 10^6$ 。在最后一管中加进 2ml 顶层软琼脂，混匀、倒在底层上，供存活力测定。另一经处理的 0.9ml 反应物，离心（4000rpm，10min），弃去上清液，加 2ml 顶层软琼脂，充分打碎沉淀，混匀后倒在底层上。此用作回变试验。 $37^\circ\text{C}$  孵育 48h，计数菌落。存活力测定也可在补充 0.25% 酪蛋白水解物和  $0.25 \mu\text{g/ml}$  L-色氨酸的底层上做，此时只需孵育 24h 即可计数菌落，且菌落形态较大。作多重突变频率测定时，每个受试样品最好测 2~3 个不同剂量（如 100%、70%、10% 存活），以便接近检测突变的最佳剂量。同样需要设溶剂和阳性试剂对照组。

## 6.7 结果统计与评价

6.7.1 点试验法 若加受试样品的纸片周围出现回变菌落数明显多于溶剂对照者，并经 t 检验处理有显著性差别，则确定为阳性。但阴性结果只意味着突变反应低于该法检测水平。所以，若不用统计处理，则要用平板掺入法证实结果。

6.7.2 平板掺入法 若经受试样品处理的，平均每平板中的回变菌落数为自发回变（溶剂对照）的 2 倍，有重复性、有剂量-效应关系，可判为阳性。阴性结果的判断至少应在 3 次独立的试验中不高出自发回变水平。且试验应在最佳条件下进行，如无杀伤甚至极轻微杀伤，每平板试验  $2 \times 10^8$  细菌，培养基中补充色氨酸量应十分精确等。经预培养处理的结果判断与标准平板掺入法相同。回复突变频率的测定，可用以下近似计算式：

$$\text{回复突变频率} = \frac{\text{每“剂量”平板回变菌落数} - \text{每对照平板回变菌落数}}{\text{每“剂量”平板存活菌落数}}$$

## 7 鉴定报告

鉴定报告应包括以下内容：

- 7.1 受试样品名称、理化性状、配制方法、使用溶剂。
- 7.2 试验菌株。
- 7.3 代谢活化系统、诱导剂及 S<sub>9</sub>混合液配制方法或来源。
- 7.4 试验方法、受试样品检测剂量组及阴性、阳性对照物质名称、所用溶剂。
- 7.5 结果。
- 7.6 结论。

## 8 试验结果解释

阳性结果表明在该试验条件下，受试样品可引起大肠杆菌回复突变。

阴性结果表明在该试验条件下，受试样品不引起大肠杆菌回复突变。

# 酵母菌基因突变试验

## *Saccharomyces cerevisiae* Gene Mutation Assay

### 1 范围

本规范规定了酵母菌真核微生物体链的基因突变，检测置换或移码基因突变的基本原理、要求和方法。

本规范适用于检测化学品引起的真核微生物基因突变。

### 2 规范性引用文件

OECD Guideline for testing of chemicals (NO.480, 1986)

USEPA Health Effects Test Guidelines (OPPTS 870.5575, 1998)

### 3 试验目的

用于检测酵母菌（一种真核微生物）的基因突变，预测其遗传危害和潜在致癌作用的可能性。

### 4 定义

4.1 碱基置换突变剂 (Base Substitution Mutagens): 可引起 DNA 碱基改变的化学物，在回复突变试验中，这种碱基改变可能发生在基因组原发突变位点或第二个突变位点。

4.2 移码突变剂 (Frameshift Mutagens): 在 DNA 分子中引起单个或多个碱基对增加或丢失的化学物。

### 5 试验基本原理

在酵母菌中许多单倍体和多倍体菌株的突变系统中，如菌落为红色的腺嘌呤依赖的突变株 (ade-1, ade-2) 经受试样品的诱导，突变为依赖两个腺嘌呤的突变株，其菌落为白色，可判断该受试样品为致突变物。

## 6 试验方法

### 6.1 受试样品配制

固体受试样品应溶解或悬浮于适合的溶剂中，并稀释至一定浓度。液体受试样品可直接使用或予以稀释。受试样品应在使用前新鲜配制，否则就必须证实贮存不影响其稳定性。

### 6.2 剂量设计

至少应设 5 个剂量。在确定剂量时应考虑细胞毒性和受试样品溶解度。最低剂量必须对细胞活性无影响，最高剂量应该不引起细胞存活率下降 5~10%。难溶性受试样品应使用适当的方法使其溶解度达到饱和。易溶于水的、无毒的物质，最高浓度应视具体情况而定。

每个试验剂量至少使用 3 个平皿来检测。在使用以 **hom 3-10** 为标记物的低突变率菌株试验时，平皿数量应满足统计学分析的要求。

### 6.3 对照

#### 6.3.1 阳性对照

每一个试验应分别设置加入或不加入代谢活化系统的阳性对照。

##### 6.3.1.1 不需经代谢活化的阳性化学物质有：

methylnmethanesulphonate

乙基亚硝基脲 (ethyl methanesulphonate)

4-硝基喹啉-N 氧 (4-nitroquinoline)

ICR-170

##### 6.3.1.2 需经代谢活化的阳性化学物质有：

N-亚硝基二甲胺 (N-nitrosodimethyl)

环磷酰胺 (cyclophosphamide)

#### 6.3.2 阴性对照

6.3.2.1 溶剂对照 受试样品的溶剂，在所选用剂量下不引起毒性效应，不与受试样品发生化学反应，不影响细菌存活和  $S_9$  活性，首选溶剂是培养液或水，避免使用二甲基亚砷 (DMSO)。终末浓度不可明显影响细菌生存能力和生长特性。

6.3.2.2 空白对照 如果没有文献资料或历史性资料证实所用溶剂不具有有害作用或致突变作用时设定。

6.4 菌株 最广泛应用并得到证实的回复突变系统包括单倍体菌株 XV185-<sup>14</sup>C 和

双倍体菌株 D<sub>1</sub>, 其它菌株也可以适当使用。如该菌株携带 ochre 突变 ade2-1、arg4-17、lys-1 和 trp5-48, 就是通过碱基置换位点特异性的突变或诱导 ochre 抑制因子产生回复突变的。XV185-<sup>14</sup>C 也是携带 his1-7 标记物, 第二位点突变主要发生错误性回复突变。而 hom 3-10 标记物则是移码突变剂引起的回复突变。

细菌在富含适宜营养的液体培养基内生长, 然后将其接种在选择性培养基上检测自发回复突变, 剔除自发回复突变高的菌株。

## 6.5 试验步骤

### 6.5.1 试剂配制

6.5.1.1 培养基 可选用富含生长因子的 YEP 葡萄糖培养基, 其它适宜培养基也可使用。

6.5.1.2 代谢活化系统 用肝混合功能氧化酶混合液 (S<sub>9</sub> 混合液)。

### 6.5.2 酵母菌培养

酵母菌的处理通常在液体中进行, 使用稳定期或生长期的细胞。最初的试验使用生长期的细胞,  $1\sim 5\times 10^7/\text{ml}$  细胞在 28~37℃ 温度下连续接触受试样品 18h, 震荡培养。对于需要代谢活化的试验, 试验过程中要加入足量的代谢活化物。试验结束时, 细胞被离心、洗脱并接种在合适的培养基中。28~30℃ 避光培养 4~7d 后, 计算平皿细胞存活数及基因突变诱导数。

如果第一次试验为阴性, 使用稳定期细胞重复一次。如果第一次试验为阳性, 用生长期细胞重复试验进行验证。

### 6.5.3 试验结果评价

6.5.3.1 数据处理 以表格的形式列出试验数据, 包括菌落数量、突变数目、生存数目及突变率。数据应用适宜的统计学方法进行处理。

#### 6.5.3.2 评价原则

6.5.3.2.1 接触剂量与突变率有剂量-效应关系, 并有统计学意义。

6.5.3.2.2 受试样品至少有一个剂量点检出致突变性, 且重现性好、有统计学意义。

6.5.3.2.3 如果一种受试样品引起的突变率既无具统计学意义的剂量-反应关系, 在任何一个剂量点也未检测出重现性好并有统计学意义的阳性反应, 该受试样品将被认为在此试验体系中无致突变活性。

6.5.3.3 在评价中应结合生物学及统计学的显著性进行综合考虑。

## 7 鉴定报告

鉴定报告将包括以下内容：

- 7.1 使用的菌株。
- 7.2 试验条件 稳定期或生长期的细胞、培养基的成分、培养浓度、培养温度、代谢活化系统。
- 7.3 试验方法 剂量水平、试验程序和培养时间、温度、阳性和阴性对照。
- 7.4 菌落计数、突变的菌落数、细菌存活数、突变率、剂量反应关系、经统计学处理的数据。
- 7.5 结论。

## 8 试验结果解释

阳性结果表明在该试验条件下，受试样品引起酵母菌有丝分裂基因回复突变。

阴性结果表明在该试验条件下，受试样品不引起酵母菌有丝分裂基因回复突变。

# 体外哺乳动物细胞正向基因突变试验

## *In Vitro* Mammalian Cell Forward Gene Mutation Test

### 1 范围

本规范规定了体外哺乳动物细胞基因突变试验的基本原则、要求和方法。  
本规范适用于检测体外哺乳动物细胞基因突变。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No.476, 1997)

USEPA Health Effects Test Guidelines (OPPTS 870.5300, 1998)

### 3 试验目的

通过检测受试样品诱发体外培养的哺乳动物细胞基因突变（包括碱基对置换、移码突变和缺失等）的能力，从而评价受试样品的致突变性及其强度。

### 4 定义

4.1 正向突变(Forward Mutation) 从原型（野生型）转变至突变型的基因突变，可引起酶和功能蛋白的改变。

4.2 突变频率(Mutant frequency) 所观察到的突变细胞数与存活细胞数之比值。

### 5 试验基本原理

在加入或不加入肝混合功能氧化酶系统（S<sub>9</sub>混合液）的条件下，使细胞暴露于受试样品一定时间，然后将细胞传代培养，突变细胞在含有 6-硫代鸟嘌呤（6-thioguanine, 6-TG）或三氟胸苷（trifluorothymidine, TFT）的选择性培养液中能继续分裂并形成集落。根据突变集落数可计算突变频率，从而评价受试样品的致突变性。

### 6 试验方法

6.1 受试样品配制 固体受试样品需溶解或悬浮于溶剂中，用前稀释至适合浓度；液体受试样品可以直接加入试验系统/或用前稀释至适合浓度。受试样品应在使用前新鲜配制，否则必须证实储存不影响其稳定性。

6.2 剂量水平 至少应设置 4 个可供分析的剂量。对有细胞毒性的受试样品，最高剂量组的细胞存活率应为 10~20%，最低剂量组的细胞存活率应 >80%。无细胞毒性的受试样品，最高剂量应达到 5 $\mu$ l/ml, 5mg/ml 或 0.01mol/L。应在预试验中确定细胞毒性和溶解度，测定细胞毒性可使用指示细胞完整性和生长情况的指标，如相对集落形成率或相对细胞生长率等，应在 S<sub>9</sub> 系统存在或不存在的条件下测定细胞毒性。

### 6.3 对照

#### 6.3.1 阳性对照

不需 S<sub>9</sub> 代谢活化的阳性对照物

甲磺酸乙脂 (ethyl methanesulphonate, EMS)

甲磺酸甲脂 (methyl methanesulphonate, MMS)

乙基亚硝基脲 (ethyl nitrosourea, ENU) 等

需要 S<sub>9</sub> 代谢活化的阳性对照物

3-甲基胆蒎 (3-methylcholanthrene)

环磷酰胺 (cyclophosphamide, CP)

N-亚硝基胍 (N-nitroso-dimethylamine, MNNG)

7,12-二甲基苯蒎 (7,12-dimethylbenzanthracene, 7,12-DMBA)

苯并 (a) 芘 (benzo(a)pyrene, BaP) 等

#### 6.3.2 阴性对照

6.3.2.1 溶剂对照 溶剂应为非致突变物，不与受试样品发生化学反应，不影响细胞存活和 S<sub>9</sub> 活性。首选溶剂是水或水溶性溶剂，亦可使用二甲基亚砷 (DMSO)，但浓度不应大于 0.5%。

6.3.2.2 空白对照 如果没有文献资料或历史资料证实所用溶剂无致突变作用时应设空白对照。

6.4 细胞株 用于本试验的细胞株对化学致突变物应具有明确的敏感性，高度的繁殖能力以及稳定的自发突变率。应检测细胞是否被支原体感染，若已被感染则不能使用。

HPRT 位点突变分析常使用中国仓鼠肺细胞株 (V79) 和中国仓鼠卵巢细胞株 (CHO)，TK 位点突变分析常用小鼠淋巴细胞株 (L5178Y) 和人类淋巴细胞细胞株 (TK6, WTK1 等)。

### 6.5 试剂配制

6.5.1 完全培养液 应根据试验所用系统和细胞类型来选择适宜的培养基。对于 L5178Y 或 TK6 细胞, 常用 RPMI 1640 培养基加入 10% 马血清和适量抗菌素(青霉素 100IU/ml、链霉素 100 $\mu$ g/ml)。对于 V-79 或 CHO 细胞, 常用 MEM (Eagle) 培养基加入 10% 胎牛血清和适量抗菌素。

6.5.2 血清处理 将过滤除菌后的小牛血清或马血清放入 56 $^{\circ}$ C 水浴中, 保温 30min 以灭活补体, 然后分装, 保存于-20 $^{\circ}$ C 备用。

6.5.3 代谢活化系统 肝混合功能氧化酶 (S<sub>9</sub> 混合液)。

6.5.4 无钙镁磷酸盐缓冲液(无钙镁 PBS, pH 为 7.2~7.4):

成分:	磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.20g
	磷酸氢二钠(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	2.89g
	氯化钾(KCl)	0.20g
	氯化钠(NaCl)	8.00g
	双蒸水(压力蒸气灭菌)	1000ml

6.5.5 胰蛋白酶-EDTA 溶液 分别用无钙镁 PBS 配制胰蛋白酶与 EDTA 溶液, 胰蛋白酶溶液浓度为 0.05%, EDTA 溶液浓度为 0.02%。两溶液按 1:1 混合。存放于-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

6.5.6 姬姆萨染液 取姬姆萨染料 3.8g, 置玛瑙乳钵中, 加少量甲醇研磨。逐渐加甲醇至 375ml, 待完全溶解后, 再加 125ml 甘油, 放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中保温 48h。保温期间振摇数次, 使充分溶解。取出过滤, 2 周后使用, 作为姬姆萨染液原液。使用时, 取 1 份姬姆萨染液原液, 与 9 份 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.8) 混合。

6.5.7 选择剂 6-硫代鸟嘌呤 (6-TG) 建议使用最终浓度为 5 $\mu$ g/ml; 三氟胸苷 (TFT) 建议使用最终浓度为 3 $\mu$ g/ml。

## 6.6 试验步骤

### 6.6.1 HPRT 位点突变分析 (V79)

6.6.1.1 细胞准备 将 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞接种于含完全培养液的直径为 100mm 的平皿中, 除未处理对照组外, 每组 2 皿共 12 皿。于 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24h。

6.6.1.2 接触受试样品 吸去上述供试培养皿中的培养液, 用无钙镁 PBS 洗 2 次。将含有细胞的培养皿分为二大组, 一组加 S<sub>9</sub> 混合液, 另一组不加 S<sub>9</sub> 混合液。加 S<sub>9</sub> 混合液组, 在培养皿中加入 2ml S<sub>9</sub> 混合液, 对不加 S<sub>9</sub> 混合液组, 则用 2ml 无血清培养液代替, 再加不同剂量受试样品的供试液, 最后不含血清的培养液补

足至 10ml。并将培养皿置 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 5h。处理结束后，吸去培养皿中液体部分，用无钙镁 PBS 洗涤细胞 2 次，再加入完全培养液 10ml，在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 19~22h。阳性和阴性对照组也分加与不加 S<sub>9</sub> 混合液两个组，操作方法同上。

6.6.1.3 表达 将培养物用胰蛋白酶-EDTA 消化，待细胞脱落后，加入完全培养液，终止消化。混匀、计数并进行表达和细胞毒性测定。表达时，以  $5 \times 10^5$  个细胞接种于直径为 100mm 的平皿中。培养 3d 后，分传一次，仍接种  $5 \times 10^5$  个细胞，培养 3d 后再进行突变体的选择及集落形成效率（CFE）的测定。

6.6.1.4 细胞毒性测定 将上述消化计数后的细胞，每平皿接种 200 个，每组 5 个平皿，于 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 7d。取出样本，固定并进行姬姆萨染色后，计数各平皿的细胞集落数。以相对 CFE 值表示细胞的毒性。

6.6.1.5 突变体的选择及集落形成率的测定 表达结束后，消化细胞，分别接种，每组 5 个平皿，每平皿接种  $2 \times 10^5$  个细胞。待细胞贴壁后加入 6-TG，终末浓度为 5μg/ml。放入 CO<sub>2</sub> 培养箱培养 7~10d。固定后进行姬姆萨染色，计数平皿内集落数，并计算其突变频率（MF）。

## 6.6.2 TK 位点突变分析

6.6.2.1 取生长良好的细胞，调整密度为  $5 \times 10^5$ /ml，按 1% 体积加入受试样品，37℃ 震荡处理 3h。离心，弃上清液，用 PBS 或不含血清的培养基洗涤细胞 2 遍，重新悬细胞于含 10% 马血清的 PRMI 1640 培养液中，并调整细胞密度  $2 \times 10^5$ /ml。

6.6.2.2 PE<sub>0</sub>（0 天的平板接种效率）测定 取适量细胞悬液，作梯度稀释至 8 个细胞/ml，接种 96 孔板（每孔加 0.2ml，即平均 1.6 个细胞/孔），每个剂量作 1~2 块板，37℃，5%CO<sub>2</sub>，饱和湿度条件下培养 12d，计数每块平板的集落生长的孔数。

6.6.2.3 表达 对步骤 6.6.2.1 所得细胞悬液作 2d 表达培养，每天计数细胞密度并保持密度在  $10^6$ /ml 以下。

6.6.2.4 PE<sub>2</sub>（第 2d 的平板接种效率）测定 第 2d 表达培养结束后，取适量细胞悬液，按步骤 6.6.2.2 作稀释梯度并接种 96 孔板，培养 12d 后计数每块平板有集落生长的孔数。

6.6.2.5 TFT 抗性突变频率（MF）测定 第 2d 表达培养结束后，取适量细胞悬液，调整细胞密度为  $1 \times 10^4$ /ml，加入 TFT（三氟胸苷，终末浓度为 3μg/ml），混匀，接种 96 孔板（每孔加 0.2ml，即平均 2000 个细胞/孔），每个剂量作 2~4 块板，

37℃，5% CO<sub>2</sub>，饱和湿度条件下培养 12d，计数有突变集落生长的孔数。

## 7 试验结果评价

7.1 HPRT 位点突变分析按下列公式计算有关指标：

绝对 CFE = 形成集落数/接种细胞数

相对 CFE = (试验组绝对 CFE/溶剂对照组绝对 CFE) × 100%

突变频率 (MF) = (突变集落数/接种细胞数) × (1/绝对 CFE)

试验结果用 $\chi^2$  检验进行统计处理。

7.2 TK 位点突变分析按下列公式计算有关指标：

平板效率 (PE<sub>0</sub> 和 PE<sub>2</sub>)

$$PE = \frac{-\ln(EW/TW)}{1.6}$$

式中：EW 为无集落生长的孔数；TW 为总孔数；1.6 为每孔接种细胞。

$$\text{相对存活率 (\%RS)} = \frac{PE_0(\text{处理})}{PE_0(\text{对照})} \times 100$$

突变频率 (MF)

$$MF(\times 10^6) = \frac{-\ln(EW/TW)/n}{1.6}$$

式中：EW 为无集落生长的孔数；TW 为总孔数；n 为每孔接种细胞数(2000)。

## 7.3 评价原则

7.3.1 在下列两种情况下可判定受试样品在本试验系统中为阳性结果：

7.3.1.1 受试样品引起突变频率具有统计学意义、并有剂量-效应关系。

7.3.1.2 受试样品在任何一个剂量条件下，引起具有统计学意义，并有可重复性的阳性反应。

7.3.2 阴性结果的判定需在%RS < 20%（即已产生明显细胞毒性）的情况下未见突变频率显著增加时方可作出。评价时应综合考虑生物学和统计学意义。

## 8 鉴定报告

鉴定报告应包括以下内容：

8.1 受试样品名称、有关的理化性状、所用溶剂及其配制、剂量选择（应说明检品对细胞毒性的测定方法、溶解情况等）。

8.2 细胞株名称。

8.3 试验条件和方法。

8.3.1 阳性对照物名称和使用浓度、动物品种和来源、S<sub>9</sub>混合液的制备与配方。

8.3.2 所用培养液名称、血清类别和使用浓度。

8.3.3 接种时的细胞密度以及所用培养瓶的规格。

8.3.4 受试样品与试验系统的接触时间。

8.3.5 表达时间。

8.3.6 结果评价方法。

8.4 结果。

8.4.1 受试样品最高剂量的确定及结果，包括细胞毒性的测定、溶解情况、对 pH 的影响（如果有影响）。

8.4.2 剂量组和对照组的突变频率及统计结果。

8.4.3 阳性对照组和阴性对照组（包括常用溶剂，如 DMSO）在本实验室历史上突变频率范围，均值和标准差（说明样品数）。

8.4.4 结论。

## 9 试验结果解释

阳性结果表明在本试验条件下受试样品可引起所用哺乳动物细胞的基因突变。

阴性结果表明在本试验条件下受试样品不引起所用哺乳动物细胞的基因突变。

# 果蝇伴性隐性致死试验

## Sex-linked Recessive Lethal Test in *Drosophila Melanogaster*

### 1 范围

本规范规定了果蝇伴性隐性致死试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于化学品的遗传毒性检测。

### 2 规范性引用文件

OECD Guideline for Testing of Chemicals (No.477, April 1984)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.5275, June 1996)

### 3 试验目的

检测化学品能否引起果蝇生殖细胞的点突变和小的缺失突变。

### 4 定义

4.1 致死突变 (Lethal Mutation): 是基因组的一种改变, 当表达时引起携带者死亡。

4.2 隐性突变 (Recessive Mutation): 是在纯合子或半合子试验生物中的基因组的一种改变, 但只有纯合子才表达相应的表现型。

4.3 伴性基因 (Sex-linked genes): 基因位于性染色体上, 在本方法中指位于 X 染色体上的基因。

### 5 试验基本原理

根据隐性基因在性遗传中的交叉遗传特征, 即雄蝇的 X 染色体传给 F<sub>1</sub> 代雌蝇。又通过 F<sub>1</sub> 代传给 F<sub>2</sub> 代雄蝇。位于 X 染色体上的隐性基因能在半合子雄蝇中表现出来。据此推断致死突变的存在。

据此, 利用眼睛颜色性状由 X 染色体上的基因决定, 并与 X 染色体的遗传相关联的特征来作为观察在 X 染色体上基因突变的标记, 故以染毒的野生型雄蝇

(红色圆眼, 正常蝇), 与 *Basc* (Muller-5) 雌蝇 (淡杏色棒眼, 在两个 X 染色体上各带一个倒位以防止 F<sub>1</sub> 代把处理过的父系 X 染色体和母系 X 染色体互换) 交配, 如雄蝇经受试样品处理后, 在 X 染色体上的基因发生隐性致死, 则可通过上述两点遗传规则于 F<sub>2</sub> 代的雄蝇中表现出来, 并籍眼睛颜色为标记来判断试验的结果。即根据孟德尔分类可产生四种不同表型的 F<sub>2</sub> 代, 有隐性致死时在 F<sub>2</sub> 代中没有红色圆眼的雄蝇。

## 6 试验方法

### 6.1 试剂与仪器

#### 6.1.1 试剂: 乙醚、75%酒精、丙酸

#### 6.1.2 培养基的制备

大小试管和海绵塞洗净后, 分别于 120℃ 2h 干燥消毒后或晒干后备用。

##### 6.1.2.1 蔗糖 26g、琼脂 3g, 加水 150ml

##### 6.1.2.2 玉米粉 34g、酵母粉 4g, 加水 150ml

6.1.2.3 步骤: 按 6.1.2.1 煮沸后再按 6.1.2.2 倒入混匀、煮沸, 然后加丙酸 2ml, 搅匀, 分装于指管内, 每管厚度约 1.5~2.0cm, 备用。

#### 6.1.3 仪器和器材

电热恒热干燥箱、生化培养箱、立体解剖显微镜、放大镜、空调机、麻醉瓶、培养指管 (3 cm×10 cm)、试管盘及架、白瓷板、海绵垫、毛笔、海绵塞。

### 6.2 实验动物: 果蝇

雄蝇用 3~4d 龄的野生型黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*), 雌蝇用 *Basc* (Muller-5) 品系 3~5d 龄的处女蝇。饲养环境温度控制在 25℃±1℃。

### 6.3 受试样品配制

受试样品应溶于水中或悬浮于适当的赋形剂 (如乙醇、吐温 60 或吐温 80) 中, 然后在给样前用水或生理盐水稀释, 避免用二甲基亚砜 (DMSO) 作为赋形剂。

### 6.4 剂量设计

对受试样品突变进行初步评价时, 测试一个最大耐受剂量或者是可能达到的最高剂量, 如果为了测定剂量-反应关系时, 至少需要设三个剂量组。

### 6.5 染毒途径

可通过口服、注射或直接暴露于气体或蒸汽染毒。受试样品经口喂饲也可以

放入 1~5%的蔗糖溶液中，或必要时受试样品可溶于 0.7%NaCl 溶液。注射染毒可采用胸腔或腹腔注射。

#### 6.6 对照 每次试验必须设置对照组

6.6.1 阳性对照物：常用的阳性对照物有甲基磺酸乙酯 (Methanesulfonate) 和 N-亚硝基二甲胺 (N-Nitrosodimethylamine)。

6.6.2 阴性对照物：所选溶剂。

#### 6.7 试验步骤

##### 6.7.1 处女蝇的收集

开始羽化后，清除管内所有成蝇，然后在 8~10 小时内收集的果蝇即为处女蝇。将处女蝇放入空指管中，每管不超过 20 只。

##### 6.7.2 处理与交配

为检测受试样品对生殖细胞不同阶段敏感性，将雄蝇在接触受试样品以后分别相隔 2~3 天与新处女蝇交配，共 3 次（窝），分别代表对精子、精细胞、精母细胞的效应。每一指管以一只经处理过的雄蝇按上述程序与 1~2 只处女蝇交配，再以所产 F<sub>1</sub>代按雄雌 1:1 或 1:2 进行 F<sub>1</sub>~F<sub>2</sub>交配，12~14 天后观察 F<sub>2</sub>代，记录子代的致死数。试验的设计应具有预定的敏感性与测定的能力。每组的果蝇数量应符合试验设计的需要。通过阴性对照组观察自发突变频数，当试验组的突变率接近对照组突变率时，应重复试验进行验证。

##### 6.7.3 试验结果评价

列表表明试验数据，包括被试验的染色体数、无生育力的雄性果蝇数，每一接触浓度、每一只被处理的雄果蝇和每一次交配期的致死染色体数。运用适合于试验设计的统计学检验。结果评价时应对试验结果将生物学意义和统计学意义同时予以考虑。试验组的观察结果比对照组明显增加，判为阳性，当应用多个剂量时，阳性致死呈现统计学剂量-效应关系时；或至少有一时间点的阳性致死可重复并有统计学意义上的增加，也应判为阳性。

## 7 鉴定报告

鉴定报告应包括以下内容：

7.1 果蝇：所有果蝇品系，昆虫年龄，处理的雄性数，不育的雄性数，已建立的 F<sub>2</sub>培养群的数目，没有后代的 F<sub>2</sub>培养群的数目，所测试的染色体数，在每一生殖

细胞期检测的带有致死基因的染色体数。

7.2 试验条件：详细描述染毒和采样的时间表，剂量，毒性数据，阴性（溶剂）和阳性对照。

7.3 致死突变的标准

7.4 剂量-效应关系

7.5 统计学评价

7.6 结论

## 8 试验结果的解释：

果蝇伴性隐性致死试验阳性结果表明在该试验条件下受试样品引起果蝇生殖细胞突变；阴性结果表明在该试验条件下受试样品对果蝇生殖细胞属非致突变物。

# 枯草杆菌基因重组试验

## *Bacillus Subtilis* DNA Damage or Recombination Assay

### 1 范围

本规范规定了枯草杆菌重组缺陷型重组试验的基本原理、要求和方法。  
本规范适用于检测化学品遗传毒性。

### 2 规范性引用文件

USEPA Health Effects Test Guidelines (OPPTS 870.5500, 1998)

### 3 试验目的

检测化学品的诱变性，预测其遗传危害和潜在致癌作用的可能性。

### 4 定义

枯草杆菌基因重组试验 (*Bacillus Subtilis* DNA Damage or Recombination Assay): 利用一组枯草杆菌重组功能缺陷型 ( $Rec^-$ ) 与修复功能健全 ( $Rec^+$ ) 的试验菌株，测定化学物质所诱发的重组缺陷的试验方法。

### 5 试验基本原理

细胞遭受不同类型的 DNA 损伤，大多数可导致 1~2 次的重组修复。如果细胞的重组功能有缺陷 ( $Rec^-$ )，与修复功能健全 ( $Rec^+$ ) 的细菌比较，前者可表现出对 DNA 损伤的更敏感，即细菌易遭受生长抑制或死亡。根据这种差异，就能对受试样品是否引起 DNA 损伤的作用做出评定。

### 6 试验方法

#### 6.1 受试样品配制

首选是水，若受试样品不溶于水，可用二甲基亚砜 (DMSO) 和丙酮等有机溶剂，这些溶剂单独使用对枯草杆菌几乎没有抑制生长作用，偶尔出现抑制效应可能是混进杂质。若不能溶解在这些溶剂中时，也可以用乙酸乙酯，此物虽不能与水自由混溶，但也可用。

#### 6.2 剂量设计

用标准划线法和芽胞法时，由于滤纸片上的受试样品随剂量的增加， $Rec^+$  抑制区带的长度及其与  $Rec^-$  抑制区带长度之比值也增大。只有加适量受试样品时，

两者的比值才最高，而且结果也容易判定。不仅溶于水的受试样品（如丝裂霉素 C）是如此，难溶于水的受试样品也不例外。因此，对未知毒性的受试样品，初试时最好用最高剂量（如配成饱和液的剂量）。重复测试时，则用较低浓度，以使 Rec<sup>+</sup>菌抑制带长度几乎为零，此时可对结果加以明确判断。

### 6.3 阳性对照（推荐使用）

克菌丹 (Captan, 20μg/片)

二硝散 (Nitit, NBT, 2.6μmol/片)

呋喃基糠酰胺 (AF-2, 2μg/片)

敌克松 (Dexon, DAPA, 20μg/片)

丝裂霉素 C (mytomycin C, 10μg/片)

标准诱变剂应使 M45 优先抑制，M45 抑制效应大于 H17 二倍以上，如丝裂霉素 C，Rec<sup>+</sup>为 2mm，Rec<sup>-</sup>为 13mm。不同诱变剂引起两菌株抑制带差异的具体数值见表 1、2。

**表 1 典型诱变剂的重组修复效应**

方法	诱变剂	剂量 (μg/片)	S9	生长抑制带长度(mm)	
				H17 Rec <sup>+</sup>	M45 Rec <sup>-</sup>
划线法	呋喃基糠酰胺	2	不加入	1	9
	二硝散	2.6 μmol	不加入	0	5
	克菌丹	20	不加入	1	10
	C <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	5	不加入	0	7.5
	丝裂霉素 C	10	不加入	2	13
芽胞法	丝裂霉素 C	0.02	不加入	0	10
	敌克松	20	不加入	1	16
	Trp-P1*	6.5	加入	0	3
	Trp-P2*	37.5	加入	0	12
				最小抑制浓度(μg/mL)	
液体法				H17 Rec <sup>+</sup>	M45 Rec <sup>-</sup>
	丝裂霉素 C		不加入	0.1	0.006
	表氯醇		不加入	3.2	0.1

### 6.4 阴性对照

阴性对经常用卡那霉素、新霉素。新霉素的剂量范围为 7.5~60 μg/片，对两菌型能产生等量非“重组修复效应”，因此它也是一种较理想的阴性对照物。

### 6.5 菌株 推荐使用一对菌株 H17 和 M45，其它菌株也可适当采用。

6.5.1 增菌 将菌株接种在 B-2 肉汤培养基里，振荡培养（120rpm），37℃过夜（15~18h），至对数生长期。

6.5.2 纯化 取过夜培养物，用标准快速划线法将菌种接种在 B-2 肉汤琼脂斜面培养基表面。获得菌落后应将其移种在 B-2 肉汤琼脂平板上，分离并挑出单个

菌落。将单个纯化菌落接种于 B-2 肉汤管振荡培养 (120rpm), 37℃ 过夜 (15~18h), 至对数生长期。

表 2 菌株的基因型和对诱变剂的敏感性

菌株基因型	化学诱变剂*				
	MMC	4-NQO	ICR191	DAPA	NBT
H17rec+argA15 try-3	±	±	±	-	±
M45recA5M45argA15 try-3	++		++	++	
L43 recL43 argA15 try-3	+	±	++	-	+

\* 缩写: MMC(丝裂霉素 C); 4-NQO(4-硝基喹啉-N-氧化物); ICR191(一种吡啶类化学品); DAPA(敌克松); NBT(二硝散)。剂量: 均为 1mg/ml, 每纸片 0.02mL

符号: - 无抑制带; ± <5mm; + 5~10; ++>10mm; +++>20mm

6.5.3 菌种的保存 用接种在斜面上的或接种于 B-2 肉汤培养基中的原菌株制备保存菌种。将斜面置于温箱, 经 37℃ 孵育 3d 以上, 使细菌培养到芽胞充分形成, 这样就可将其保存于 4℃ 冰箱。将 B-2 肉汤培养基经 37℃ 孵育过夜, 在充分生长的培养物中加入细菌保护剂甘油 (如 3ml 培养液中加 50%(W/V) 的甘油 1ml), 使成细菌悬液, 分装后将其保存在-80℃或-20℃低温冰箱中。如在-20℃下保存, 最好每月进行一次传代。

6.5.4 生物学特性鉴定 新获得的或长期保存的菌种, 在试验前必须进行菌株的生物特性鉴定。枯草杆菌的一般生物学性状, 如革兰氏染色法, 在不同培养基上的菌落形态和反应特点等, 可参考医用微生物试验技术有关方法进行鉴别。菌株性状经上述鉴定合格后制成保存菌种。若不符合要求, 需重新挑选单个菌落, 再作鉴别和制成保存菌种。

## 6.6 培养基及试剂

6.6.1 B-2 肉汤培养基	成分: 牛肉浸膏	10g
	蛋白胨干粉	10g
	NaCl	5g
	蒸馏水	至 1000ml

牛肉浸膏中已含 0.5% 的 NaCl 时, 则氯化钠可省去。用 NaOH 或 KOH 调整 pH 为 7.0, 0.068MPa 高压灭菌 20min。用途为制备液体培养物、保藏菌种、制备固体培养基、用于液体法试验。

6.6.2 B-2 肉汤琼脂培养基 成分： B-2 肉汤培养基 1000 ml  
琼脂（粉） 15g

NaOH 或 KOH 调整 pH 为 7.0，0.068MPa 高压灭菌 20min。用途为制备斜面或平板，用于保存菌种或分离菌株，制备“干燥”平板。

6.6.3 “干燥”平板制备 把已灭菌的 B-2 肉汤琼脂融化，倒入直径 9cm 的平皿中，每皿约 40 ml，加盖，待凝固。将平皿倒置放入 37℃ 温箱中 2d，或 42℃ 下 1 天后取出。此时培养基的表面已变为“干燥”，如在“干燥”培养基上面划线接种，就不致菌液流散，影响结果。

6.6.4 改良的 Schaeffer 培养基 成分：

营养肉汤	16g	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	278μg
KCl	2g	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	236mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g	葡萄糖	1g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	19.8g	蒸馏水	1000ml

以上盐类成分逐一溶解在 200ml 蒸馏水中；葡萄糖及营养肉汤中和琼脂（粉）各加 100 和 700ml 蒸馏水。分别高压灭菌（葡萄糖 0.068MPa，10min，其余均 0.068MPa，20min）。待冷至 80℃ 左右，把三瓶成分加在一起，混匀，调整 pH 为 7.0 后浇制平板，每皿 30ml 用途为培养枯草杆菌芽胞。

6.6.5 B-2 肉汤软琼脂培养基

成分： B-2 肉汤培养基 1000ml  
琼脂（粉） 8g

0.103MPa 高压灭菌 20min。用作制备含芽胞平板，用于芽胞法试验。

6.6.6 50% (W/V) 甘油水溶液

成分： 甘油 50g  
蒸馏水 100ml

0.103MPa 高压灭菌 20min。用途为低温保存菌株中的保护剂。

6.6.7 1/15M 磷酸盐缓冲液

成分： KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9.08g/1000ml  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.47g/1000ml

将上述钾、钠盐分别溶解于蒸馏水，然后按 3.89:6.11 (V/V) 或 4.96:5.04 (V/V) 加在一起，即成 pH 为 7.0 或 6.8 的缓冲液。经微孔滤膜装置滤过除菌，4℃ 冰箱保存。

### 6.6.8 缓冲盐溶液

成分: MgCl <sub>2</sub>	76.2mg
KCl	246mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.42g
蒸馏水	100ml

经微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过除菌, 4℃冰箱保存。用途为制备 S<sub>9</sub> 混合物。

### 6.6.9 代谢活化系统 肝混合功能氧化酶混合液 (S<sub>9</sub> 混合液)。

## 6.7 试验步骤

### 6.7.1 划线法

#### 6.7.1.1 标准快速孵育法

6.7.1.2 将固体培养基上保存的 H17Rec<sup>+</sup> 和 M45Rec<sup>-</sup>, 分别取少量接种在 3~5ml B-2 肉汤培养基中, 保持试管直立, 在振荡器上 (120 rpm), 37℃ 孵育过夜 (约 15~18h)。应用前将培养物一直放在冰水中, 至少能保留数小时。

6.7.1.3 把两种新鲜菌液, M45 用对数生长期原菌液, H17 用一倍稀释液, 在“干燥”的 B-2 肉汤琼脂平板上, 作八字形划线。操作如下: 用小吸管 (长 22cm, 容量 0.1ml, 管尖锐圆光滑, 不致划破琼脂表面) 吸取菌液, 先在平板下限, 将 Rec<sup>-</sup> 菌液划一条水平线, 后在上限, 将 Rec<sup>+</sup> 菌液划一条斜线, 与水平线成 40 度。注意两菌液在划线的起点上绝对不能互相混合, 但两条线起点之间的间隔又要合适 (例如 6mm), 它必须比以后要加入受试样品的圆形滤纸片的直径 (如 12mm) 小, 圆形纸片才能遮盖住两条线的起点。一般吸 0.1ml 的菌液足够接种 30 块平板。

6.7.1.4 滤纸片要切成圆形。纸片的直径可根据纸厚薄及加受试样品量的多少而变化, 范围 8~16mm, 一般用直径 12mm, 厚 1mm 的纸片。定性试验时, 将纸片用受试样品液浸或用毛细吸管移受试样品液在纸片上。定量时则要用刻度吸管 (0.1ml) 吸一定剂量的受试样品 0.02~0.1ml, 一般为 0.02ml, 加在滤纸片上。滤纸片放至平板前, 务必使受试样品液均匀一致的浸润滤纸片, 滤纸片盖在两条划线的起点上, 把平板 (不要倒置) 放入 37℃ 恒温箱中, 孵育约 20 小时 (或 30℃ 过夜), 然后取出, 测量抑制带的长度。受试样品在孵育期间逐渐向纸片四周扩散。同时, 细菌在平板上继续生长。受试样品液抑制细菌发育的程度取决于细菌的种类和受试样品的剂量。每次试验应包括溶剂、阳性、阴性对照组。

### 6.7.2 预冷孵育

此法与快速划线温育法的不同处在于用冰冻过的菌液，温育前又经预冷处理。

6.7.2.1 按制备低温保藏菌悬液的方法，制成供试验用冻结菌备用。临用前将其融化并调节菌液为  $10^8/\text{ml}$  按上述标准划线方法，将其接种在“干燥”肉汤琼脂平板表面，然后放上加一定量受试样品液并已均匀浸润的滤纸片。把平板放入  $2\sim 4^\circ\text{C}$  冰箱中作预冷处理，经 24h 后取出，转移至  $37^\circ\text{C}$  温箱中，孵育约 20h，测量细菌生长抑制带长度。

6.7.2.2 经  $4^\circ\text{C}$  预冷有利于受试样品液在琼脂上弥散，且使试验的敏感性提高近 30 倍，这很可能因受试样品对非生长期细菌有更大的效应。

### 6.7.3 芽胞法

6.7.3.1 芽胞制备 将 M45 和 H17 的过夜培养物分别涂布在改良的 Schaeffer 培养基上，放入  $37^\circ\text{C}$  温箱中孵育。H17 株需 3~4d, M45 为 5d。然后将培养基表面的孢子收集起来，用  $1/15\text{mol/L}$  磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 1 次，再将其悬浮在 PBS 中，并在  $37^\circ\text{C}$  下加入溶菌酶 (终末浓度为 1%) 后，继续培养 30min 后，将处理液中的芽胞离心沉淀，用蒸馏水洗 5 次。最后，用蒸馏水将芽胞制成悬浮液。芽胞水悬浮液存放在  $4^\circ\text{C}$  冰箱中性状稳定，使用一年以上仍能获得可重复结果。

6.7.3.2 含芽胞薄层软琼脂平板制备 在厚度固定的薄层软琼脂平板上，任一受试样品均可获得一种恒定的扩散方式。取贮存芽胞水悬浮液，计数后将其调节成约  $2\times 10^7/\text{ml}$ 。吸取 0.1ml 的 H17 或 M45 的稀释芽胞水悬浮液置直径 9cm 平板中，倒入融化、 $42^\circ\text{C}$  保温的 B-2 肉汤软琼脂 10ml (含芽胞数  $2\times 10^5/\text{ml}$ )，混匀。注意平板放平，待凝固。也可在分装成 10ml 一管的软琼脂中，加入 0.1 ml 芽胞水悬浮液 ( $42^\circ\text{C}$ ) 保温)，浇成平板。如需代谢活化，则可先在平板中加  $S_9$  混合液 0.3ml。其他成分和制法同上。含  $S_9$  混合液的平板应在制备后 1~2h 内使用，若放冰箱中可延至数小时，久置会影响  $S_9$  混合液的稳定性，故不宜隔天再用。

### 6.7.3.3 检测

在滤纸圆片 (厚约 1mm，直径 8mm) 上，加  $10\sim 30\ \mu\text{l}$  受试样品液。需代谢活化时，纸片上另加  $20\ \mu\text{l}$  辅助成分。然后将此滤纸片放在含芽胞和  $S_9$  或不含  $S_9$  的薄层软琼脂平板上 (一个平板上同时可放不同剂量的几个滤纸片)。平板在  $37^\circ\text{C}$  温箱中孵育 20~30h，一般孵育 24h。测量纸片周围抑制区带长度。

### 6.7.3.4 芽胞法的生存率测定

6.7.3.4.1 差别杀伤法 当受试样品为不能扩散或缓慢扩散的化学物质，用标

准芽胞法测得受试样品为阳性结果时,为了核实结果的可靠性,可用下述方法进行复检。将  $5 \times 10^3$  左右的芽胞, 0.1~0.3ml 的  $S_9$  混合液和一定量的受试样品液, 加在 10ml 45℃ 融化的 B-2 的肉汤琼脂培养基中, 倒入平皿。待凝固后, 置温箱中 37℃ 孵育 2d, 计数平板上的生存菌落数, 并比较 H17 和 M45 的生长抑制或杀伤的差别。

6.7.3.4.2 液体法 前述方法是借助各种受试样品液在琼脂培养基上形成扩散的浓度梯度而测定的。对溶解度差而难以扩散或不扩散的受试样品, 不适用于上述方法检测时, 可用液体法。经培养后, 比较 H17Rec<sup>+</sup> 和 M45Rec<sup>-</sup> 的存活或杀伤程度, 并以不加受试样品为对照。

在微滴度多孔塑料盘上, 用带有可消毒尖端的可调微量吸管 (100~200  $\mu$ l), 吸取含最高剂量受试样品的 B-2 肉汤培养基 0.2ml, 移入盘的第一个孔中, 其余各孔中分移入不含受试样品的 B-2 肉汤培养基 0.1ml。然后, 从第一孔中移出 0.1ml, 转入第 2 孔中。混匀后, 从第 2 孔中吸出 0.1ml, 加入第 3 孔中。依次作倍量稀释, 使受试样品浓度逐渐降低。每个浓度做两个平行样。

生长过夜的 H17Rec<sup>+</sup> 和 M45Rec<sup>-</sup> B-2 肉汤培养基中按 3:1 加入 50% (V/V) 甘油 (甘油终末浓度为 12.5%) 贮于 -80℃ 冰箱 (或液氮罐), 无此条件用 -20~ -30℃ 冰箱。试验当天, 将贮存冰冻菌液融化, 用新鲜 B-2 肉汤培养基将其稀释 10 倍。然后, 在微滴定多孔盘的每个孔中分别移入 0.01ml H17Rec<sup>+</sup> 或 M45Rec<sup>-</sup> 稀释菌液。再分别加入不同浓度的受试样品, 37℃ 孵育过夜。观察每孔有无细菌生长, 并对 Rec<sup>+</sup> 和 Rec<sup>-</sup> 加以比较和求出最小生长抑制浓度。

如受试样品需代谢活化, 则按上述方法先加好受试样品和细菌, 再向每一孔中逐一加入 0.02ml 的  $S_9$  混合液。以后操作过程均与不加  $S_9$  混合液相同。

使用上述方法的程序, 一般先用标准划线法或预冷培养法, 有条件最好用芽胞法, 然后根据需要结合差别杀伤法和液体法。对某些不易扩散的受试样品也可一开始就采用差别杀伤法或液体法。对标准法可疑的受试样品更适于采用预冷法、芽胞法或液体法以提高检出率。

6.8 试验结果评价 划线法和芽胞法的试验结果均以细菌生长抑制带长度 (mm), 即“重组修复效应”来表示。方法为, 用尺量取自抑制区带的抑制末端或终边至圆形滤纸片切线所引的垂线的长度。

6.8.1 Rec<sup>-</sup> 与 Rec<sup>+</sup> 抑制带长度之差 > 2mm 为阳性。少于此值为阴性。

6.8.2 阳性又可分为:  $\geq 2$ mm 为弱阳性(±),  $\geq 5$ mm (+),  $\geq 10$ mm (++) ,  $\geq 20$ mm (+++)。

6.8.3 测定中应把试验的各种误差估计在内，一般认为测定的 Rec<sup>-</sup>与 Rec<sup>+</sup>的抑制带长度之差在 1mm 以内是没有意义的。对 DNA 有损伤的大部分受试样品，其 Rec<sup>-</sup>与 Rec<sup>+</sup>的抑制带长度之差多在数毫米以上。差值为 1~2mm 的某些受试样品（如咖啡因及 MnCl<sub>2</sub> 等），虽然其重组修复效应有较好的重现性，但也不属对 DNA 重组修复的直接作用，估计可能是因对 DNA 的合成过程发生某种干扰所致。

6.8.4 芽胞差别杀伤法是通过计数平板上的存活菌落数，并计算受试样品与以溶剂对照组存活菌落数的百分比值，分别求得 Rec<sup>+</sup>和 Rec<sup>-</sup> 的存活菌%值。如 Rec<sup>-</sup> 存活菌%值明显低于 Rec<sup>+</sup>，可判为阳性。

6.8.5 液体法的测定结果用受试样品抑制 Rec<sup>+</sup>和 Rec<sup>-</sup> 生长的最低抑制浓度 (MIC, μg/ml) 表示。并采用 MIC (Rec<sup>+</sup>) /MIC(Rec<sup>-</sup>) 的比值来评定 DNA 损伤程度（这种损伤对 Rec<sup>-</sup> 菌无论有无代谢活化均不能修复的）。若与溶剂对照组相比，受试样品的该比值明显降低，则可判断为阳性，此时受试样品的 MIC (Rec<sup>+</sup>) /MIC(Rec<sup>-</sup>) 比值应>1。

## 7 鉴定报告

鉴定报告应包括以下内容：

- 7.1 使用的菌株。
- 7.2 在试验中所使用菌液浓度、状态。
- 7.3 配制受试样品的溶剂。
- 7.4 代谢活化系统的制备。
- 7.5 试验方案，包括剂量水平及剂量确定原则、阳性与阴性对照。
- 7.6 细胞杀伤程度的检测方法。
- 7.7 试验结果及评价原则。
- 7.8 结论。

## 8 试验结果解释

阳性结果表明在该试验条件下受试样品可引起枯草杆菌重组缺陷性突变反应。

阴性结果表明在该试验条件下受试样品不引起枯草杆菌重组缺陷性突变反应。

# 体外哺乳动物细胞程序外 DNA 合成 (UDS) 试验

## *In vitro* Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells

### 1 范围

本规范规定了体外哺乳动物程序外 DNA 合成试验的基本原则、要求和方法。本试验适应于检测化学品的体外哺乳动物细胞 DNA 原发损伤。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No. 482, 1986)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870. 5550 June 1996)

### 3 试验目的

本试验是一项致突变性试验，检测受试样品是否会引起哺乳动物细胞的原发 DNA 损伤，以评价受试样品的潜在致突变性。

### 4 定义

程序外 DNA 合成 (Unscheduled DNA Synthesis, UDS): DNA 受损后的修复合成与按细胞周期进展程序而发生的 S 期半保留 DNA 合成不同，称为程序外 DNA 合成。

### 5 试验基本原理

在加或不加体外代谢活化酶混合液 (S<sub>9</sub> 混合液) 的条件下，将经受试样品作用后的同步培养生长于盖片上的细胞置于含有羟基脲、<sup>3</sup>H-TdR 中，并进行放射自显影或液体闪烁计数显示法处理后，计数细胞核上乳胶层中的显影银粒数或计算 <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C 的放射活性比。

### 6 试验方法

#### 6.1 受试样品配制

固体受试样品应溶解或悬浮于适合的溶剂中，并稀释至一定浓度。液体受试样品可直接使用或予以稀释。受试样品应在使用前新鲜配制，否则就必须证实贮存不影响其稳定性。

## 6.2 剂量设计

设置多个剂量组，最高剂量应产生细胞毒性作用。放射性自显影技术检测 UDS 时每一试验剂量至少设 2 个平行皿，液体闪烁计数法检测 UDS 时每剂量应设 6 个平行皿（或适当调整后小于 6 个）。对水溶性高的受试样品应预先测试其毒性大小；无明显细胞毒性的水溶性受试样品应配制为饱和溶液；对水溶性低的受试样品，采用适当的方式增加其溶解性，或选择适宜的溶剂。

## 6.3 对照

同条件下设置的阳性与阴性对照，都应有加或不加肝混合功能氧化酶混合液（S<sub>9</sub>混合液）。

### 6.3.1 阳性对照物：

7, 12-二甲基苯蒽（7, 12-dimethylbenzanthracene, 7, 12-DMBA）

2-乙酰基氨基芴（2-acetylaminofluorene, 2-AAF）

4-硝基喹啉-N-氧化物（4-nitroquinoline-N-oxide, 4-NQO）

### 6.3.2 阴性对照

6.3.2.1 溶剂对照组 受试样品溶剂，在所选用剂量下不引起毒性效应，不与受试样品发生化学反应，通常用水、植物油、0.5%羧甲基纤维素钠或食用淀粉等。

6.3.2.2 空白对照 如果没有文献资料或历史性资料证实所用溶剂无有害作用或致突变作用时设空白对照。

6.4 细胞株 可选用人成纤维细胞、大鼠原代肝细胞、外周血淋巴细胞等进行试验。

## 6.5 试剂配制

6.5.1 完全培养液 含 15%小牛血清 Eagle 低限培养基（EMEM）中，加入青霉素（终末浓度 100IU/ml）与链霉素（终末浓度 100U/ml），pH 为 7.2~7.4。过滤除菌后，保存于 4℃冰箱备用。

6.5.2 同步培养液 用不含精氨酸的 EMEM 培养基 98 份，加小牛血清 2 份，再加青霉素（终末浓度 100IU/ml）与链霉素（终末浓度 100 μg/ml）配制而成。

6.5.3 小牛血清 将过滤除菌后的小牛血清放入 56℃水浴中，保温 30min 以灭活补体，而后分装，保存于-20℃备用。

6.5.4 无钙镁磷酸盐缓冲液（无钙镁 PBS，pH 为 7.2~7.4）

成分：磷酸二氢钾（KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ）	0.20g
磷酸氢二钠（Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O）	2.89g
氯化钾（KCl）	0.20g
氯化钠（NaCl）	8.00g
双蒸水（压力蒸汽灭菌）	1000ml

6.5.5 胰蛋白酶-EDTA 溶液 分别用无钙镁 PBS 配制胰蛋白酶与 EDTA 溶液，胰蛋白酶溶液浓度为 0.05%，EDTA 溶液浓度为 0.02%。两溶液按 1:1 混合。存放于 -20℃ 备用。

6.5.6 固定液 甲醇:冰醋酸 (3:1, V/V)，临用现配。

6.5.7 贮备液 250mmol/L 羟基脲

6.5.8 1%枸橼酸钠溶液。

6.5.9 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷

6.5.10 核乳胶

6.5.11 显影液及定影液

6.5.12 代谢活化系统 肝混合功能氧化酶混合液 (S<sub>9</sub>混合液)，配制方法见附录 2-A。

## 6.6 试验步骤

### 6.6.1 UDS 放射自显影法

6.6.1.1 将细胞增殖至所需数量后，用完全培养液制成单细胞悬液，浓度为  $0.5 \times 10^5$  个/ml ~  $1.0 \times 10^5$  个/ml。将细胞悬液接种于有小盖玻片的 6 孔细胞培养板中，在 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 1~3d，至细胞 50% 融合。每一剂量组和对照组分别作 2~3 个平行样本。

6.6.1.2 换用同步培养液，培养 3d。

6.6.1.3 在进行放射自显影技术前一日下午，加入羟基脲 (HU) 贮备液，HU 的终末浓度为 10mmol/L。继续在 37℃ 下培养 16h，然后将上述长有细胞的盖片置于含有不同浓度的受试样品、HU (10mmol/L) 及 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷 (5 μCi/ml ~ 10 μCi/ml, 30 μCi/ml) 同步培养液中，在 37℃ 下培养 5h。

6.6.1.4 细胞的固定 孵育结束后，小盖玻片经 Hanks 液充分洗涤后，用 1% 枸橼酸钠处理 10min。随后用乙醇-冰醋酸 (3:1 V/V 新鲜配制) 固定液在 4℃ 固定过夜，空气中干燥后，用小量中性树胶将小玻片粘于载玻片上，长有细胞面朝上，40℃ 烘焙 24h。

6.6.1.5 放射自显影处理 放射自显影处理的全过程需要在暗室中安全红灯下或黑暗中进行。为了获得很薄的乳胶层，将市售的乳胶在临用时作 1:1 稀释。

6.6.1.6 将乳胶液置于 42℃ 水浴中。并不时用玻棒徐徐搅拌，使乳胶液中的空气逸出。10~20min 即可使用。同时将准备做自显影处理的载玻片，置水浴箱平台上预热。而后，将附有样本的载玻片垂直浸渍于乳胶液中约 5s。徐徐将玻片提出 (提出速度愈慢，乳胶层愈薄)，并用纱布或擦镜纸将玻片背面乳胶拭去。

6.6.1.7 已涂了乳胶的玻片移入温度为 29℃ 并保持一定湿度的温箱中。待乳胶干

涸(4h)后,将玻片放入内置一干燥剂(变色硅胶)袋的玻片盒中。玻片盒严密地以黑色避光纸包裹,使完全不透光,置于一塑料袋中。然后移入4℃冰箱中曝光10d左右。

6.6.1.8 曝光结束后,将玻片移入有机玻璃制的玻片架上。在液温为19℃的显影液中显影5min,在停显液中漂洗30s,再在F-5定影液中定影6~10min。用蒸馏水漂洗10~30min(换水4~5次),把水沥去,在空气中干燥。

6.6.1.9 细胞染色 可在放射自显影处理前用地衣红(Orcein)2%冰醋酸溶液,或在显影后用Giemsa染液染色。将玻片用酒精及二甲苯脱水透明后,用盖片封固。

6.6.1.10 镜检 在油镜下,计数各样本细胞核上乳胶层中的显影银粒数,至少计数50个细胞核,同时计数相当面积的本底银粒数,两者之差为细胞核净银粒数。

#### 6.6.2 UDS 液体闪烁计数测量法

6.6.2.1 将细胞增殖至所需数量后,用完全培养液制成单细胞悬液,浓度为 $0.5 \times 10^5$ 个/ml~ $1.0 \times 10^5$ 个/ml。加入 $^{14}\text{C}$ -TdR(25mCi/mmol),使其终末浓度为 $0.01 \mu\text{Ci/ml}$ 。将细胞接种于液体闪烁瓶中,1ml/瓶。在37℃中培养48~72h,除去培养基并用Hanks液洗涤细胞2次。换以含有 $^{14}\text{C}$ -TdR( $0.01 \mu\text{Ci/ml}$ )同步培养基[不含精氨酸的EMEM培养基(ADM)血清浓度0.5~2%],37℃作同步培养2~3d。在试验前一天下午除去含标记物质的培养基,用Hanks液充分洗涤后,换以含10mmol/L羟基脲的ADM培养基。在37℃继续孵育16h。

6.6.2.2 细胞与受试样品接触和UDS的 $^{14}\text{C}$ -TdR标记 同放射自显影显示法。

6.6.2.3 液体闪烁计数样品的制备 细胞经受试样品接触和UDS的 $^3\text{H}$ -TdR标记后,迅速除去培养基,以冰冷盐水洗涤2次。随后用冰冷的0.25N过氯酸溶液处理细胞2次,每次10min,以固定细胞并除去酸不溶性组分。再用75%酒精处理10min和无水酒精洗涤1次以除去脂溶性成分。50℃充分干燥后加入0.5N过氯酸0.5ml,于75~80%恒温箱中水解40min,使掺入的标记物释出。冷却后加入乙二醇乙醚3.5mL及甲苯闪烁液(PPO 0.5%、POPOP 0.03%)5ml。振摇使成均相。或按下述方法制成支持物上的测量样品;细胞与受试样品接触和UDS $^3\text{H}$ -TdR标记结束后,迅速除去培养基,以冰冷盐水洗涤2次。加入0.02%EDTA之无钙镁磷酸缓冲液在37℃中孵育15min。用滴管反复吹吸使细胞自瓶底脱下,并抽吸至直径为2cm的玻璃纤维纸盘上。依次用0.25N过氯酸5ml、75%酒精2ml、无水酒精2ml抽吸洗涤后,在50℃恒温箱中将纸盘烘干。置于含3ml甲苯闪烁液的液体闪烁瓶中。

6.6.2.4 液体闪烁液计数 在进行样本中  $^3\text{H}$  及  $^{14}\text{C}$  放射活性检测前,先选择好两个窗宽连续的测量道的窗宽。使较高能道(道 1)只对  $^{14}\text{C}$  的高能量衰变脉冲计数,而在较低能道(道 2)计数全部  $^3\text{H}$  衰变脉冲及  $^{14}\text{C}$  的较低能量衰变脉冲。在均相测量时,各道的计数效率可利用自动外标准源及预先绘制好的淬灭校正曲线推算而得。设道 1 中  $^{14}\text{C}$  的计数效率为  $C_1$  (根据窗宽选择标准,  $^3\text{H}$  在该道的计数效率  $h_1=0$ )、道 2 中  $^3\text{H}$  和  $^{14}\text{C}$  的计数效率分别为  $h_2$  及  $C_2$ 。则  $^{14}\text{C}$  及  $^3\text{H}$  的放射活性 (dpm) 可自道 1 和道 2 的净计数值  $N_1$  及  $N_2$  (净计数值=实际计数值-本底计数值) 求得。即  $^{14}\text{C}$  (dpm) =  $N_1/C_1$ ;  $^3\text{H}$  (dpm) =  $(N_2 - ^{14}\text{C} \times C_2)/h_2$ 。若所用液体闪烁计数器有在线微处理机,这些计算过程可自动完成。利用无外标准源的双道液体闪烁计数器或测量支持物上的样品时,先根据上述要求选择好窗宽,并测量出两道中  $^3\text{H}$  计数效率比  $k(k=c_2/c_1)$ 、 $^{14}\text{C}$  的总计数效率  $C$  及  $^3\text{H}$  在道 2 中的计数效率  $h_2$ 。则  $^{14}\text{C}$  (dpm) =  $N_1(1+k)/c$ 、 $^3\text{H}$  (dpm) =  $(N_2 - N_1 \times k)/h_2$ 。

6.6.2.5 DNA 含量测定。

## 6.7 试验结果评价

6.7.1 UDS 放射自显影法 计算各样本中银粒数/核的均值及其统计量。在一张玻片上获得的银粒数/核的均值及其标准差,反映该细胞群体中的细胞间的变异度。用  $t$  检验或其它适当的显著性检验方法进行统计学处理。

6.7.1.1 若有统计学差异,并见剂量-反应(效应)关系者可判为阳性。

6.7.1.2 若虽未见剂量-反应(效应)关系,但在某一剂量可重现地诱发羟基脲抗性  $^3\text{H}$ -TdR 掺入的增加,也可判为阳性。

## 6.7.2 液体闪烁计数法

根据液体闪烁计数测量数据,计算出各样本中  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  的放射活性比,后者为单位重量 DNA 中  $^3\text{H}$ -TdR 掺入水平的反映值。令溶剂对照的  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  比的均值为 1.00(100%),计算出各样本对照的变化量,并由此计算出各试验点的有关统计量。

以受试样品剂量为横坐标,相对  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  放射活性比为纵坐标,绘制剂量-反应(效应)关系图。并按  $t$  检验统计分析受试样品组与溶剂对照组均值间的差异程度。

UDS 试验作为致癌性化合物的快速预试验,从一个以评价各短期试验价值的国际协作程序的报告中可以看出是一个较好的测试系统。如以液体闪烁计数技术和以 HeLa 细胞为靶细胞的试验系统对 42 种编码化合物的测试结果,致癌性化合物检出的灵敏度为 0.68、特异性为 0.706、正确性为 0.691(Martin 1981)。而不同实验室用鼠伤寒沙门氏菌/微粒体酶系对这些编码化合物的测试结果,灵敏度在 0.417~0.680、特异性在 0.588~0.824、正确性在 0.538~0.690。若将两

项试验结合进行，对致癌性化合物检出的灵敏度、特异性和正确性分别可达 0.84、0.82 及 0.833。

## 7 鉴定报告

鉴定报告应包括以下内容：

- 7.1 细胞名称、细胞密度、细胞数量、处理时间；
- 7.2 细胞培养方法、培养基、培养温度及 CO<sub>2</sub> 浓度；
- 7.3 受试样品名称、理化性状、配制方法、所用溶剂及其对受试样品的溶解性和稳定性；
- 7.4 肝混合功能氧化酶混合液的配制方法、阳性与阴性对照化合物、阻断剂；
- 7.5 试验步骤；
- 7.6 自显影技术的应用，液体闪烁计数法提取与测量 DNA 含量；
- 7.7 剂量-效应（反应）关系；
- 7.8 统计学评价；
- 7.9 结果分析；
- 7.10 结论。

## 8 试验结果解释

阳性结果表明在该试验条件下，受试样品诱导了 DNA 修复合成，具有 DNA 损伤作用。

阴性结果表明在该试验条件下，受试样品不引起 DNA 损伤作用。

# 体内哺乳动物外周血细胞微核试验

## *In Vivo* Mammalian Peripheral Blood Micronucleus Assay

### 1 范围

本规范规定了哺乳动物外周血红细胞微核试验的基本原则、技术要求和方法。

本方法适用于检测化学品的致突变作用。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No. 474, July 1997)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870. 5395 June 1996)

### 3 试验目的

检测受试样品是否能引起哺乳动物外周血嗜多染红细胞染色体或有丝分裂器损伤而诱导微核细胞发生率增高，以评价受试样品致突变的可能性。

### 4 定义

4.1 微核 (Micronucleus): 是在细胞的有丝分裂后期染色体有规律地进入子细胞形成细胞核时，仍然滞留在细胞质中的染色单体或染色体的无着丝点断片，或因纺锤体受损而丢失的整条染色体。它在末期以后，单独形成一个或几个规则的次核，被包含在子细胞的胞质内而形成，因比主核小，故称为微核。

4.2 着丝粒 (Centromere/Kinetochore): 是细胞分裂中期染色体上纺锤丝附着的区域，借此子代染色体得以有规律地向子代细胞两极移动。

4.3 正染红细胞 (Normochromatic Erythrocyte, NCE): 成熟红细胞，因其核糖体已消失，可通过选择性的染色而与未成熟红细胞区别开来。

4.4 嗜多染红细胞 (Polychromatic Erythrocyte, PCE): 未成熟红细胞，是红细胞成熟过程中的一个中间阶段，此时因胞质内仍含有核糖体，可通过选择性的染色而与成熟红细胞区别开来。

### 5 试验基本原理

动物通过适当的途径接触受试样品，一定时间后处死动物，收集血细胞，涂片并染色，在显微镜下计数含微核的嗜多染红细胞。

## 6 试验方法

### 6.1 仪器和器械

生物显微镜、恒温水浴箱、镊子、注射器、灌胃针头、载玻片、塑料吸瓶、乳钵等。

### 6.2 试剂

#### 6.2.1 姬姆萨 (Giemsa) 染液

成分:	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。

#### 6.2.2 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)

1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液：磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 9.47 g 溶于 1000 ml 蒸馏水中。

1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液：磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 49.07 g 溶于 1000 ml 蒸馏水中。

取 1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液 50ml 与 1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液 50ml 混合。

#### 6.2.3 Giemsa 应用液

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

#### 6.2.4 甲醇 (分析纯)

全部试剂除注明外，均为分析纯，试验用水为蒸馏水。

### 6.3 受试样品配制

受试样品应新鲜配制。除非有资料表明以溶液 (或乳浊液、悬浊液等) 保存具有稳定性。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 (水溶性和/或脂溶性) 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。如不是常用溶剂或载体，应有参考资料说明其成份及选做溶剂的原因。

## 6.4 对照

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

6.4.2 阳性对照组的接触水平要使动物体内应能形成可被检测的高于背景的微核。常用的阳性对照物有：

乙基甲磺酸盐 (Ethyl methanesulphonate, CAS No. 62-50-0) 60mg/kg bw

乙基亚硝基脲 (Ethyl nitrosourea, CAS No. 759-73-9) 50~100mg/kg bw

丝裂霉素 C (Mitomycin C, CAS No. 50-07-7), 10mg/kg bw 腹腔注射

环磷酰胺 Cyclophosphamide (CAS No. 6055-19-2), 40mg/kg bw 经口或 30mg/kg bw ip

三亚乙基噻胺 (Triethylenemelalime, CAS No 51-18-3), 1.0mg/kg bw, 一次 ip

### 6.4.3 阴性对照

6.4.3.1 溶剂对照 溶剂应为非致突变物，无明显毒性，不与受试样品发生化学反应。首选溶剂是水或水溶性溶剂。是否需在每个采样点均设置阴性对照，可依据动物间的变异和历史上对照组资料中的微核频率判断。如果采用一个采样点作阴性对照，最适采样时点是第一采样时点。

6.4.3.2 空白对照 如果没有文献资料或历史资料证实所用溶剂无致突变作用时应设空白对照。

## 6.5 实验动物和饲养环境

6.5.1 小鼠是外周血微核试验常规使用的动物。应使用健康周龄 7~12W 的小鼠，动物体重不能超过雌雄动物同性别平均体重的  $\pm 20\%$ 。动物应随机分组，每个处理组和对照组每性别都必须有至少 5 只能用于分析的动物。如试验设有几个采样时点，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 5d。

6.5.2 动物实验室、实验动物和动物饲料应符合国家相应规定。用常规饲料喂养，自由饮水。如经胃肠道染毒，所选择的饲料应确保受试样品可加入其中。动物应按组按性别分笼饲养，每笼动物数以不干扰动物活动和观察反应为度。

## 6.6 剂量设计

6.6.1 应进行预试验以选择最高剂量，为防止出现假阴性结果，可适当增大剂量范围。如果受试样品具有毒性，应在第一个采样时间点至少设置三个剂量，这些剂量应包括从最大毒性至低毒性或无毒性的范围，以求得微核的剂量-反应关系曲线，随后的采样时间点仅需设置最高剂量。最高剂量的定义是能使动物出现严重中毒反应的剂量。对有特异生物学活性的低毒或无毒受试样品（如激素和丝裂源物质）可采用其他剂量设置标准。最高剂量也可定义为能在骨髓中产生明显毒性的剂量（如外周血中成熟红细胞占总红细胞的比例减少）。按等比级数 2 向下设置中、低剂量组。

6.6.2 如果剂量水平 $\geq 5000$  mg/kg bw，在 24h 内进行一次或两次染毒没有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 最高剂量选用 2000 mg/kg bw d，染毒 14 d 以上选用 1000 mg/kg bw d。如欲外推人群暴露的阈剂量，可能需要采用更高的剂量水平。

## 6.7 试验步骤

### 6.7.1 实验动物的处理和采样时间点

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

6.7.1.2 受试样品溶液一次给予的最大容量不应超过 2 ml/100g bw。

6.7.1.3 一般情况下染毒一次，采样则至少两次。第一次采样不早于染毒后 36 h，两次采样间隔时间可依据第一次采样确定，但不要超过 72 h。如果每日染毒两次以上（如每 24 h 染毒 2 次或更多次），应在最后一次染毒后 36~48 h 采样一次。需要时也可用其他采样时间点，如果在某一采样时间点发现了阳性反应，即不需要额外的采样时间点。

### 6.7.2 制片

6.7.2.1 采血涂片：从尾静脉或其他适当的血管采集外周血直接涂片，空气干燥。

6.7.2.2 固定：干燥的涂片放入甲醇中固定约 10 min。即使当天不染色，也应固定后保存。

6.7.2.4 染色：将固定好的涂片放入 Giemsa 应用液中染色 10~15 min。立即用蒸馏水冲洗、晾干。

### 6.7.3 阅片

6.7.3.1 所有玻片，包括阳性对照和阴性对照，在镜检前要分别编号。

6.7.3.2 选择细胞完整、分散均匀，着色适当的区域，在油镜下观察。以有核细胞形态是否完好、细胞涂抹是否均匀作为判断制片优劣的标准。

6.7.3.3 本方法系观察嗜多染红细胞（PCE）的微核。用 Giemsa 染色法，PCE 呈灰蓝色，正染红细胞（NCE）呈粉红色。典型的微核多为单个的、圆形、边缘光滑整齐，嗜色性与有核细胞核质一致，呈紫红色或紫蓝色，直径通常为红细胞的  $1/20 \sim 1/5$ 。

6.7.3.4 用双盲法阅片。每只动物至少要计数 2000 个 PCE 中含微核的细胞数，微核率以千分率（‰）表示。若一个 PCE 中出现两个或多个微核，仍按一个含微核的细胞计。

6.7.3.5 观察 PCE/NCE 的比值或 PCE/RBC 比例，可作为细胞毒性指标之一，一般前者计数 200 个 PCE，后者至少计数 1000 个红细胞。

## 6.8 数据处理和试验结果评价

6.8.1 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含微核的 PCE 的均值。若雌、雄动物之间的敏感性无明显的性别差异时可合并计算结果。一般用卡方检验、泊松分布或双侧 t 检验等方法进行统计学分析。

6.8.2 评价时应同时考虑生物学意义和统计学意义。受试样品组微核率与溶剂对照组比较，统计学意义上有显著性差异，并有剂量-反应关系，即可认为微核试验阳性。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微核试验阳性。

6.8.3 溶剂对照组和阳性对照组的微核发生率，应与试验所用动物种属及品系的文献报道结果或者是有关的历史数据相一致。应有本实验室所用实验动物的自发微核率作参考。

6.8.4 正常的 PCE/NCE 比值约为 1（正常范围为 0.6~1.2）。若比值  $< 0.1$ ，则表示 PCE 形成受到严重抑制；若比值  $< 0.05$ ，则表示受试样品的剂量过大，试验结果不可靠。这两种情况出现时，均应降低受试样品剂量，重新进行试验。而受试样品组用于分析的涂片，PCE 占红细胞总数的比例不应少于溶剂对照组的 20%。

## 7 鉴定报告

鉴定报告应包括以下内容：

7.1 受试样品名称、分类号、理化性状、纯度、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；

- 7.2 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）；
- 7.3 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；
- 7.4 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，采样部位和时点；
- 7.5 试验方法：简述操作步骤，所用统计学方法，结果判定标准；
- 7.6 结果：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外周血红细胞微核发生率。
- 7.7 结论。

## 8 试验结果的解释

阳性结果表明在试验条件下受试样品能诱导受试动物外周血未成熟红细胞微核形成。阴性结果表明在试验条件下受试样品不能诱导受试动物未成熟红细胞微核形成。

# 体外哺乳动物姊妹染色单体交换（SCE）试验

## *In vitro* Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells

### 1 范围

本规范规定了体外哺乳动物细胞姊妹染色单体互换试验的基本原则、要求和

方法。

本规范适用于检测化学品致突变性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No. 479, 1986)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.5900, 1998)

### 3 试验目的

本试验是一项致突变性试验，检测哺乳动物细胞姊妹染色单体互换频率，以评价受试样品致突变的可能性。

### 4 定义

姊妹染色单体互换（Sister Chromatid Exchange, SCE）：细胞分裂复制期单个染色体内的两个染色体单体臂内部的相互交换。在细胞周期的中期相可见到这种交换，它可能需要 DNA 双螺旋的酶切、转移和连接。

### 5 试验基本原理

哺乳动物体外细胞在有或无混合功能氧化酶系统代谢活化作用下接触受试样品，在分裂的中期相细胞中，每条染色体由两条染色单体组成，每条染色单体由双 DNA 构成 5-溴脱氧尿嘧啶（5-Bromodeoxyuridine, BrdU）作为核苷酸前体取代 DNA 分子中的胸腺嘧啶核苷，经两个细胞周期（即两次复制）后，两条姊妹染色单体的 DNA 双链在化学组成上就有差别，即一条姊妹染色单体的 DNA，其双链全为 BrdU 取代，另一条的 DNA 中仅有一条链中有 BrdU 取代，两者可用分化染色区分。当两等位染色单体间发生交换，可根据每条染色单体内夹着深浅不同的染色片段而被识别。

第一个细胞周期 BrdU 掺入到每条染色单体的 DNA 单链上，每条染色单体均为深染。

第二个细胞周期 BrdU 掺入到一条染色单体的 DNA 单链上，和另一条染色单

体链上，故前者为深染，后者为浅染。

第三个细胞周期 BrdU 掺入到 1/4 条染色单体的 DNA 单链上，和 3/4 条染色单体的双链上，故 1/4 为深染，3/4 为浅染。

## 6 试验方法

6.1 受试样品配制 固体受试样品应溶解或悬浮于适合的溶剂中，并稀释至一定浓度。液体受试样品可直接使用或予以稀释。受试样品应在使用前新鲜配制，否则就必须证实贮存不影响其稳定性。

### 6.2 剂量设计

受试样品至少应设三个剂量，剂量范围建议覆盖两个 10 倍稀释系列。最高剂量在 BrdU 存在下细胞经过两次复制后的细胞总数与对照组相比应明显减少（减少 > 75%），或导致染色体结构畸变的明显增加；对水溶性高的受试样品应预先测试其毒性大小，无明显细胞毒性、溶于水的受试样品应配制成饱和溶液，作为最高剂量；对水溶性低的受试样品，应采用适当方式增加其溶解性或选择适当的溶剂。

### 6.3 对照组

6.3.1 阳性对照 应是已知的断裂剂，能引起可检出的、可重复的阳性结果。

当外源性代谢活化系统不存在时，可使用以下阳性化合物：

甲磺酸甲酯 (methyl methanesulphonate, MMS)

甲磺酸乙酯 (ethyl methanesulphonate, EMS)

丝裂霉素 C (mytomycin C)

乙基亚硝基脲 (ethylnitrosourea)

4-硝基喹啉-N-氧化物 (4-nitroquinoline-N-oxide)

当外源性活化系统存在时，可使用以下阳性化合物：

苯并(a)芘 (benzo(a)pyrene, BaP)

环磷酰胺 (cyclophosphamide, CP)

### 6.3.2 阴性对照

6.3.2.1 溶剂对照 受试样品溶剂，在所选用浓度下不引起毒性效应，不与受试样品发生化学反应，不影响细胞存活和 S<sub>9</sub> 活性，首选溶剂是培养液或水。二甲基亚砷 (DMSO) 也是常用溶剂，但使用时浓度不应大于 0.5%。

6.3.3 空白对照 如果没有文献资料或历史性资料证实所用溶剂无有害作用或致突变作用时设定。

6.4 细胞株 首选中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO) 或中

国仓鼠肺细胞(Chinese hamster lung cell, CHL), 此外也可用人二倍体成纤维细胞和人外周血淋巴细胞(human lymphocyte)。

## 6.5 试验步骤

### 6.5.1. 试剂配制

6.5.1.1 代谢活化系统 用肝混合功能氧化酶混合液(S<sub>9</sub>混合液), 配制方法见附录2-A。

6.5.1.2 低渗液 0.075mol/L 氯化钾

6.5.1.3 固定液 甲醇:冰醋酸=3:1, 临用时配制。

6.5.1.4 姬姆萨染液 取姬姆萨染料 3.8g, 置玛瑙乳钵中, 加少量甲醇研磨。逐渐加甲醇至 375ml, 待完全溶解后, 再加 125ml 甘油, 放入 37℃温箱中保温 48h。保温期间振摇数次, 使充分溶解。取出过滤, 2 周后使用, 作为姬姆萨染液原液。使用时取 1 份姬姆萨染液原液, 与 9 份 1/15 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.8)混合, 配成其应用液。

### 6.5.1.5 磷酸盐缓冲液(PBS)

第一液 取磷酸氢二钠 9.47g 溶于蒸馏水 1000ml 中, 配成 1/15 mol/L 溶液。

第二液 取磷酸二氢钾 49.07g 溶于蒸馏水 1000ml 中, 配成 1/15 mol/L 溶液。

取第一液 49.5ml 加于第二液 50.5ml 中混匀, 即为 pH6.8 的 1/15 mol/L PBS。

6.5.1.6 培养液 采用 MEM (Eagle), 并加入非必需氨基酸和抗菌素(青霉素 100IU/ml、链霉素 100U/ml), 胎牛血清或小牛血清按 10%加入。也可选用其它合适的培养液。

## 6.6 试验步骤

6.6.1 染毒 受试样品应在细胞的指数增生期与细胞接触, CHO 可在种植后 12~24h 取用。多数在接触 1~2h 可产生作用, 但处理时间可延至 2 个细胞周期。开始接种时的细胞密度不宜过密, 在收获细胞时, 细胞融合程度不应大于 50%(CHO) 或 80% (人二倍体成纤维细胞)。体外 SCE 的试验程序有多种设计, 受试样品与细胞接触或在 BrdU 加入之前, 或在 BrdU 存在下的两个细胞周期之间。推荐如下模式:

6.6.1.1 USEPA 试验模式 细胞与受试样品接触 1 h 后, 除去含受试样品的培养基。细胞经洗涤后, 加入含 10~20 μmol BrdU 培养基, 于 37℃ 5~10%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养, 经两个细胞周期后收获细胞 (CHO 约 24h, 人二倍体细胞约 48h)。

加入 BrdU 后, 培养瓶(皿)应避光, 以减少掺入 BrdU 的 DNA 发生光解作用。

6.6.1.2 另一常用的试验模式是在细胞接种后, 加入终浓度为 8~10 μM BrdU

培养基（以后均在避光条件下操作），根据细胞株的细胞周期不同培养一个细胞周期（CHO 约 12h，人二倍体细胞约 24 h），加受试样品使接触 1~2h，倾去含有受试样品的培养物，以 37℃ 预温的 BrdU 的新培养液，继续培养一个细胞周期。

## 6.6.2 收获细胞

6.6.2.1 终止 收获细胞前 1~4h，用秋水仙碱对细胞进行处理，使最终浓度为 0.4~0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，抑制细胞分裂。

6.6.2.2 消化 收获时将培养液吸出至一离心管内，加 0.25% 胰蛋白酶液在 37℃ 下处理 10 分钟，弃去胰酶溶液，加入原培养液少许，反复吸打制成细胞悬液，然后离心，收集细胞。

6.6.2.3 低渗 使水分通过细胞膜向细胞内渗入，使细胞膨胀，导致分裂细胞中本来已分散的染色体更加均匀地分散在一个平面上，有利于分析。

6.6.2.3.1 常用的低渗溶液有 0.075mol/L 氯化钾、1% 枸橼酸钠、稀释的生理盐水和蒸馏水也具有类似的作用，但以氯化钾较好，它使染色体轮廓清楚，可染性增强，减少染色的时间。

6.6.2.3.2 不同的组织低渗处理时间要求不一。太短，使染色体散开不够；过长，使染色体胀得太大而致轮廓模糊，甚至可造成细胞破裂。在离心后可出现一层透明的薄膜，留在低渗液中或离心后不沉淀，即证明细胞已破裂。

6.6.2.3.3 低渗时间还与温度有关，室温高则处理时间应短。一般室温 15~30℃ 时，低渗 20min。30℃ 以上时可缩短为 13~15min，室温较低时应将低渗液置于 37℃ 预热。亦可将离心管置于 37℃ 水浴中低渗 10~20min。

6.6.2.4 固定 固定的目的在于尽快使细胞的结构固定于接近存活的状态，以便作进一步处理。若不固定则可因细胞内蛋白质分解而导致结构变化。为了利于离心后将细胞团块打碎，在低渗后立即加入固定液 1~2ml，然后以 1000 rpm 离心 10min，吸去上清液，加固定液进行固定。

6.6.2.4.1 常用的固定液是甲醇:冰醋酸（3:1）液，冰醋酸能固定核蛋白质，而且渗透力强，易使组织膨胀；甲醇能凝固蛋白质，易使组织收缩，两者混合使用可抵消它们的缺点。

6.6.2.4.2 固定液应在临用前新鲜配制，贮存时间不超过 1h，否则会产生沉淀，影响固定效果。加固定液经 5~10 min 后，用细长吸管将细胞团块充分打碎，继续固定 10~15min。再以 1000rpm 速度离心 10min。吸去上清液，再加固定液约 0.5ml，制片，也可按上述步骤，重复固定一次。

6.6.2.5 制片 载玻片必须严格清洗干净并放在冰箱中数小时，或者一直保存于冰箱。制片时，将沉淀物充分打匀成细胞混悬液。取出冰水中的载玻片，甩去净

水，这时玻片上形成一层薄薄水雾利于细胞分散，吸取混匀的细胞悬液，从 3~5cm 高处滴 4~5 滴在玻片上，滴片要快，使保持玻片冷冻程度以利染色体铺展。滴片后可轻轻吹气，帮助分散。在室温下自然干燥或用酒精灯、热吹风（微热）使干。

6.6.2.6 染色 SCE 的分化染色方法较多，也在不断改进。

6.6.2.6.1 常用方法

6.6.2.6.1.1 标本在 0.5 μg/ml Hoechst 33258 去离子水溶液中浸泡 12min，用去离子水冲洗。日光老化 24h（或 37℃温箱内）。在 60℃的 2×SSC（0.3mol/L 氯化钠和 0.003mol/L 柠檬酸三钠）液中孵育 2h，用蒸馏水冲洗。3%吉姆萨液（pH6.8 磷酸缓冲液稀释）染色 30min。

6.6.2.6.1.2 荧光加姬姆萨法 将吉姆萨原液用 pH6.8 的磷酸缓冲液稀释 10 倍，盛于染色缸中，染色时间长短与气温有关，夏天可短些，冬天需长些，一般在 20~40min 之间。然后向有细胞的玻片背面缓缓冲去多余浮色，干燥后镜检。

染色液的 pH 偏碱，染色体着色发蓝，色泽不鲜；pH 稍酸（pH6.8）染色呈玫瑰色，形态结构清晰，利于分析。

6.6.3 镜检 选择细胞轮廓完整、染色体展开良好、区分染色好、含有二倍体数的细胞观察计数。在体外 SCE 系统，每一试验点应记录 25~50 个中期细胞。

6.6.3.1 记录标准：凡在染色单体端部出现的交换记为一个 SCE，在染色单体中间出现的交换记为两个 SCE。凡在着丝点部位发生一次交换，判明不是两条染色单体在着丝点部位发生的扭转，记为一次 SCE。

6.6.3.2 SCE 自然交换率 不同实验室报告的 SCE 自然交换率不相同，以下提供体外姊妹染色单体自然交换频率参考值。

体外姊妹染色单体自然交换频率

细胞类型	BrdU (mol/L)	交换率 SCE/细胞
人淋巴细胞	10 <sup>-5</sup>	7
	10 <sup>-5</sup>	4~5
	6.5×10 <sup>-5</sup>	14
人纤维母细胞	10 <sup>-5</sup>	9
中国地鼠 (CHO)	10 <sup>-5</sup>	12~13
小鼠	10 <sup>-4</sup>	25

6.6.4 试验结果评价

SCE 资料呈泊松 (Poisson) 分布，求出每一剂量的平均每个细胞的 SCE 数及 Poisson 标准误。然后以剂量组的数据与对照组数据用双尾 *t* 检验进行统计分

析。

6.6.4.1 至少有一剂量超过 SCE 自然交换频率的 2 倍，即相当自然交换频率的三倍者为强阳性。

6.6.4.2 有三个试验点超过 SCE 自然交换频率并有剂量-效应关系，而且其中至少有一个试验点与对照组有显著性差异达  $P < 0.01$  者为弱阳性。

6.6.4.3 若结果虽已有统计差异 ( $P < 0.05$ )，但尚未到达上述阳性判断标准者，可判为暂定阳性物，这类物质或为弱 SCE 诱导剂，或需作进一步试验，如改进体外活化系统和采用较广的剂量范围（最高剂量点用毒性作用阈，如降低细胞有丝分裂指数，引起细胞死亡；在体内试验时表现为动物死亡）。

## 7 鉴定报告

鉴定报告应包括以下内容：

7.1 试验细胞名称及其培养方法。

7.2 试验条件：溶剂、培养箱  $CO_2$  浓度、培养细胞的数量、受试样品剂量、赋形剂、培养温度、处理时间、纺锤体作用时间及其秋水仙碱的浓度和持续时间、哺乳动物代谢活性系统名称、阳性对照与阴性对照、BrdU 浓度。

7.3 制片技术描述。

7.4 每例中期细胞分析的数目。

7.5 每一条染色体，每一细胞 SCE 发生次数。

7.6 SCE 计数标准。

7.7 剂量分组原则。

7.8 剂量-反应关系。

7.9 评价标准。

7.10 结论。

## 8 试验结果解释

阳性结果表明受试样品在本试验条件下具有引起体外哺乳动物细胞姊妹染色单体互换频率增加的作用。

阴性结果表明在本试验条件下受试样品不引起体外哺乳动物细胞姊妹染色单体互换频率增加。

# 体内哺乳动物骨髓细胞姊妹染色体交换（SCE）试验

## *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Sister Chromatid Exchange Assay

### 1 范围

本规范规定了体内哺乳动物骨髓细胞姊妹染色单体交换（SCE）试验的基本原则、技术要求和方法。

本方法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

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.5915 June 1996)

### 3 试验目的

本试验是一项致突变性试验，检测实验动物细胞姊妹染色单体互换频率，以评价受试样品致突变的可能性。

### 4 定义

姊妹染色单体互换（Sister Chromatid Exchange, SCE）：细胞分裂复制期单个染色体内的两个染色体单体臂内部的相互交换。在细胞周期的中期相可见到这种交换，它可能需要 DNA 双螺旋的酶切、转移和连接。

### 5 试验基本原理

给予动物 5-溴脱氧尿嘧啶 (5-BrdU) 后，再通过适当的途径使其接触受试样品，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，制备骨髓细胞中期分裂相标本，染色后在显微镜下观察中期分裂相细胞，进行 SCE 分析。

### 6 试验方法

#### 6.1 仪器和器械

实验室常用设备、生物显微镜、恒温水浴箱 0~100℃、电热恒温箱、离心机、紫外灯、解剖剪、镊子、注射器、灌胃针头、离心管、吸管、滴管、试管架、载玻片、塑料吸瓶、干净纱布、滤纸等。

#### 6.2 试剂

6.2.1 0.1% 秋水仙素：置于棕色瓶中，冰箱保存。

6.2.2 0.9% 氯化钠溶液。

6.2.3 0.075 mol/L 氯化钾溶液。

6.2.4 固定液：甲醇与冰醋酸以 3:1 混合，临用时现配。

6.2.5 姬姆萨 (Giemsa) 染液

成分：	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。

6.2.6 磷酸缓盐冲液 (pH 6.8)

1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液：磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 9.47g 溶于 1000 ml 蒸馏水中。

1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液：磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 49.07g 溶于 1000 ml 蒸馏水中。

取 1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液 50ml 与 1/15mol/L 磷酸二氢钾溶液 50ml 混合。

6.2.7 Giemsa 应用液

取 Giemsa 染液与 1/15 mol/L 磷酸缓盐冲液 (pH 6.8) 混合而成。临用时配制。

6.2.8 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33258 去离子水溶液

6.2.9 2 $\times$ SSC 液 (0.3 mol/L 氯化钠与 0.003 mol/L 柠檬酸三钠)

6.2.10 5-溴脱氧尿嘧啶 (5-BrdU)

全部试剂除注明外，均为分析纯，试验用水为蒸馏水。

6.3 受试样品配制

受试样品应新鲜配制。除非有资料表明以溶液 (或乳浊液、悬浊液等) 保存具有稳定性。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 (水溶性和/或脂溶性) 确定受试样品所用的溶剂或载体。但所用溶剂或载体在所用剂量水平下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。如不是常用溶剂或载体，应有参考资料说明其成份及选做溶剂的原因。

6.4 对照

6.4.1 每次试验每一性别都应设置相应的阳性和阴性对照 (溶剂或载体)，除不

使用受试样品外，其它处理与受试样品组一致。

6.4.2 阳性对照物应是已知的能在所选用的动物品系体内产生 SCE 的化学物质（如：Methyl Methanesulphonate, MMs; Ethyl Methanesulphonate, EMS; Cyclophosphamide, CP）。

6.4.3 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上对照组资料中的细胞染色单体交换率来判断。如果采用一个采样时间点作阴性对照，最适宜采样时间点是第一采样时间点。另外，除非有历史上对照组资料证明所用溶剂或载体无诱导缺失或突变效应，则还应设空白对照。

## 6.5 实验动物和饲养环境

### 6.5.1 实验动物：

大鼠、小鼠和中国仓鼠是骨髓细胞 SCE 试验常规使用动物，其它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 7~12 周为最好。实验初始，动物体重变化应尽量小，即按性别不能超过动物平均体重的  $\pm 20\%$ 。动物应随机分组，每个处理组和对照组每性别都必须有至少 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 5d。

6.5.2 动物实验室、实验动物和动物饲料应符合国家相应规定。用常规饲料喂养，自由摄水。如经胃肠道染毒，所选择的饲料应确保受试样品可加入其中。动物应按组按性别分笼饲养，每笼动物数以不干扰动物活动和观察反应为度。

## 6.6 剂量设计

6.6.1 应进行预试验以选择最高剂量，为避免出现假阴性结果，可适当增大剂量范围。如果受试样品具有毒性，应在第一个采样时间点设三个剂量，这些剂量应包括从最大毒性至低毒性或无毒性的范围。第二次采样时间点仅需设置最高剂量。最高剂量的定义是能使动物出现严重中毒反应的剂量。对有特异生物学活性的低毒或无毒受试样品（如激素和丝裂源物质）可采用其他剂量设置标准。最高剂量也可选择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。

6.6.2 如剂量水平  $\geq 2000$  mg/kg bw，24h 内进行一次或两次染毒，如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 最高剂量选用 2000 mg/kg bw d，染毒 14 d 以

上选用 1000 mg/kg bw d。如欲外推人群暴露的阈剂量，可能需要采用更高的剂量水平。

## 6.7 试验步骤

### 6.7.1 实验动物的处理和采样时间点

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

6.7.1.2 受试样品溶液一次给予的最大容量不应超过 2 ml/100g bw。

6.7.1.3 动物经 5-溴脱氧尿嘧啶处理后，间隔适当时间（依处理方式而定）再行染毒。给予 5-溴脱氧尿嘧啶的方式有多次皮下、或腹腔注射、尾静连续灌输和皮下植入等。

6.7.1.4 一般情况下染毒一次，或者为便于大容量染毒，也可分次染毒，即 24h 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。

6.7.1.5 高剂量组动物分为 A、B 两个亚组，分两次采集样品，A 组于末次染毒后 12~18h 采集样品。B 组于末次染毒后 36~42h 采集样品；中、低剂量组均于末次染毒后 12~18h 采集样品。如果采用多次染毒方式，只需在最后一次染毒后 12~18h 采一次样。

6.7.1.6 于处死动物采集样品前 2h 腹腔注射秋水仙素（4 mg/kg bw）。

### 6.7.2 骨髓细胞染色体标本制备

6.7.2.1 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，剪去两端的骨髓，用带针头的 5 ml 注射器吸取 5 ml 生理盐水，插入骨髓腔内，将骨髓冲洗入 10 ml 离心管，然后用吸管吹打骨髓团块使其均匀，以 1000 rpm 速度离心 10 min，用滴管吸去上清液。

6.7.2.2 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℃ 水浴中低渗 20 min。

6.7.2.3 预固定：立即加入固定液（甲醇：冰醋酸 = 3:1）1 ml，混匀，以 1000 rpm 速度离心 10 min，用滴管吸去上清液。

6.7.2.4 固定：加入 7 ml 固定液，混匀，固定 10 min，以 1000 rpm 速度离心 10 min，用滴管吸去上清液。用同法再固定 2 次。

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

6.7.2.6 制片：在洁净的冷冻玻片上方 3~5 cm 处滴 3~4 滴细胞悬液于玻片上，

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 2~3 张。

6.7.3 染色: SCE 分化染色的方法有很多,但推荐使用的有以下两种。

6.7.3.1 荧光加吉姆萨法 (Fluorescence plus Giemsa, FPG)

6.7.3.1.1 标本在 0.5 $\mu$ g/ml Hoechst 33258 去离子水中浸泡 12min,用去离子水冲洗。

6.7.3.1.2 在日光下老化 24h 。

6.7.3.1.3 在 60 $^{\circ}$ C 的 2 $\times$ SSC 液中孵育 2h,用蒸馏水冲洗。

6.7.3.1.4 Giemsa 应用液染色 30min。

6.7.3.2 紫外线加吉姆萨法 (Ultraviolet plus Giemsa, UPG)

6.7.3.2.1 标本于 37 $^{\circ}$ C 干燥 24h。

6.7.3.2.2 将标本放在 45~48 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅的平面上,玻片上盖上一层 2 $\times$ SSC 液,用 15W 紫外线灯直接照射 30min,灯管距标本约 6cm 。

6.7.3.2.3 用蒸馏水冲洗。

6.7.3.2.4 Giemsa 应用液染色 8~10min。

6.7.4 阅片

6.7.4.1 所有玻片,包括阳性对照和阴性对照,在镜检前要分别编号。

6.7.4.2 在低倍镜下检查制片质量,片中的所有染色体较集中,而各个染色体较分散、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、染色单体区分好。用油镜对含有二倍体的细胞进行 SCE 分析。

6.7.4.3 用双盲法阅片。每只动物分析 25~50 个分散良好的中期分裂相细胞。

6.7.4.4 SCE 记录标准: 凡在染色单体端部出现的交换记为一个 SCE,在染色单体中间出现的交换记为两个 SCE。凡在着丝点部位发生一次交换,判明不是两条染色单体在着丝点部位发生的扭转,记为一次 SCE。

6.8 数据处理与结果评价

6.8.1 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平均每个细胞的 SCE 数。若雌、雄动物之间的敏感性无明显的性别差异时可合并计算结果。一般用双侧 t 检验法进行统计学分析。

6.8.2 评价时应同时注意生物学意义和统计学意义。受试样品组 SCE 频率与阴性

对照组相比，统计学意义上有显著性差异，并有明显的剂量-反应关系，或者至少有一个受试样品组出现 SCE 频率明显增高（超过对照组 SCE 的 2 倍），具有统计学意义，且经重复试验证实，即可认为 SCE 试验结果阳性。

6.8.3 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。

## 7 鉴定报告

7.1 受试样品名称、分类号、理化性状、纯度、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；

7.2 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）；

7.3 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；

7.4 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，采样时间点；5-溴脱氧尿嘧啶的给予方式、剂量及作用时间；

7.5 细胞分裂中期阻断剂名称、使用浓度及处理间隔时间。

7.6 试验方法：简述操作步骤，所用统计学方法，结果判定标准；

7.7 结果：中毒症状、每组动物按性别分别计算平均每个细胞的 SCE 数。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 SCE 频率。

7.8 结论。

## 8 结果解释

阳性结果表明受试样品在试验条件下可诱发受试动物骨髓细胞 DNA 的相互交换。

阴性结果表明在试验条件下受试样品不能诱发受试动物骨髓细胞 DNA 的相互交换。

# 繁殖/生长发育毒性筛选试验

## Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test

### 1 范围

本规范规定了检测化学品动物繁殖/生长发育毒性筛选试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品的致畸性、繁殖及生长发育毒性筛选

本规范可以作为致畸试验、一代和两代繁殖毒性的预试验。

### 2 规范性引用文件

OECD Guideline for Testing of Chemicals (No.421, July 1995)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.3550, July 2000)

### 3 试验目的

对受试样品繁殖/生长发育毒性进行初期评价。提供能否引起动物繁殖和（或）子代生长发育毒性的初步资料，也可以作为毒作用特征不明的化学物的初筛试验，为进一步的繁殖/生长发育试验剂量的选择提供依据。

### 4 定义

4.1 生殖毒性(Reproduction Toxicity)：受试样品对亲代繁殖功能或能力的影响和/或对子代生长发育的损害效应。

4.2 母体毒性 (Maternal Toxicity)：引起亲代雌性妊娠动物直接或间接的健康损害效应。

4.3 繁殖力的损害(Impairment of Fertility)：表现为雌性或雄性动物生殖功能或能力的障碍。

4.4 生长发育毒性(Developmental Toxicity)：妊娠动物接触受试样品而引起的子代在出生以前、围产期和出生以后所显现出的机体缺陷或功能障碍。

### 5 试验基本原则

试验应设多个剂量组。

从试验开始至到期处死，雄性动物的染毒期至少为四周，即交配前期最少染毒两周，交配期和交配后期染毒两周。由于雄性动物交配前期的染毒时间较短，仅以繁殖能力的大小来评价化学品对雄性动物生殖系统的影响是不够的，因此应进行病理组织学检查。以全面评价化学品对雄性动物繁殖力和精子形成的毒性作用。

雌性动物在整个试验中，都应接受染毒。交配前期至少染毒两周（相当于两个完整的发情期），交配期，妊娠期和至少 4d 的分娩后期都需进行染毒，直至试验处死的前一天。雌性动物试验期限大约为 54d，即交配前期至少为 14d，交配期为 14d 左右，妊娠期和哺乳期则分别为 22d 和 4d 左右。

## 6 试验方法

### 6.1 受试样品

受试样品可以是固体、液体、气体或蒸气。试验前应对受试样品的化学特性、纯度（含有的重要杂质）、溶解性、挥发性、稳定性等进行了解。需要时还应知道其熔点/沸点或酸碱度。

### 6.2 实验动物和饲养环境

#### 6.2.1 实验动物

首选健康初成年的大鼠，未经交配，未参加过任何试验。避免选用繁殖力低和生长发育缺陷率高的品系。试验初，动物的体重相差不应超过同性别平均体重的 20%。所选动物应注明种类、品系、性别、体重和（或）周龄。最常使用断乳，7~8 周龄，至少经过 5d 适应期的动物来进行。雌性动物必须是未经交配或产仔的。

#### 6.2.2 动物数

为了获得足够的孕鼠（至少每组 8 只）和子代，正确地评价受试样品对动物繁殖、妊娠和哺育的影响，以及对 F<sub>1</sub> 子代从受孕到出生后 4d 的吸乳、生长发育情况可能引起的健康损害效应，在试验初每个试验组至少应有 20 只动物，雌雄各半。

#### 6.2.3 饲养条件

实验动物和动物试验的环境设施应符合国家相应规定。

动物采用自由饮食。可单笼饲养，或按性别分笼群养（每笼不能超过 5 只），分笼的方法不能影响试验结果。交配过程应在合适的笼具中进行。

### 6.3 剂量设计

试验至少设三个染毒组和一个对照组。剂量水平可以根据受试样品急性毒性试验或多次染毒试验的结果来设定。对照组动物除了不给予受试样品外，其余的处理应与剂量组完全相同。在受试样品理化和生物特性允许的条件下，最高剂量组应使亲代动物出现明显的毒性反应，但不引起动物死亡；低剂量组应不引起亲代及其子代动物的任何毒性反应；中间剂量组可引起轻微的毒性反应。组间距通常为2~4倍。若试验设4个剂量组，第四个剂量组的组距则可以考虑大一些，如10倍。如果受试样品每天以1000mg/kg bw的剂量经口给予，仍未观察到任何毒副作用时，则可以采用限量试验，即试验不需要设其它剂量组。若试验采用的是其它的染毒途径：如吸入或经皮染毒，染毒的最高浓度或剂量通常可由受试样品的理化特性来决定。

### 6.4 试验步骤

#### 6.4.1 染毒途径

将动物按体重随机分为染毒组和对照组，编号后进行染毒。受试样品可以通过灌胃经口给予。灌胃量的多少取决于实验动物的大小，最大的灌胃量通常不超过1ml/100g体重。如果受试样品为水溶液，灌胃量则可以考虑增大到2ml/100g体重。在整个试验过程中，应该采用相同的灌胃体积。每只动物的染毒量应按其体重来确定，且每周进行调整。每周染毒7d，每天应在相同的时间进行。如果受试样品使用赋形剂配制，对照组应采用赋形剂的最大使用量进行平行染毒。在选择赋形剂时，首先应考虑水溶液或水混悬液，再考虑选用油性的溶液、乳化剂或其它溶剂。如果不选用水作为赋形剂时，赋形剂的毒性及受试样品在赋形剂中的稳定性也应明确。

如果将受试样品掺入饲料或溶于饮水中进行染毒，受试样品在饲料或饮水中的含量应恒定，但受试样品的添加量不能破坏普通饲料或饮水中的营养平衡。

#### 6.4.2 给样期限及繁殖程序（以大鼠为例）

试验周期	亲代 (P)	F <sub>1</sub> (子代)
第1~第2周末	雄性与雌性亲代动物开始染毒	
第3~第4周末	交配 (染毒)，4周末处死雄性动物	
第5~第7周末	孕鼠继续染毒 (妊娠及分娩)	F <sub>1</sub> 出生
第8周	哺乳 (染毒)，子代出生4d后处死雌性动物	出生4d后处死 F <sub>1</sub>

#### 6.4.3 交配方法及妊娠检查

雄性和雌性动物按1:1比例合笼交配。雌鼠应始终与同剂量组的同一只，但不是同窝所生的雄鼠合笼直至受孕，合笼时间最长可为两周。在合笼过程中，每

天早晨应对雌鼠进行检查，查看阴道中是否有精子或阴栓。将检查到精子或阴栓的当天计为雌鼠妊娠的第 0d。若交配两周后仍未受孕，可以将不育的动物与证实过生育功能正常的同一剂量组的动物重新配对，再次合笼交配。

## 6.5 观察及检查

6.5.1 每日至少对动物进行一次仔细的观察。如果发现毒性症状，观察的次数应增多。每天的观察时点应固定，并选择在染毒后毒性体征可能出现的高峰期。记录动物有无行为改变，难产或滞产以及所有的毒性反应（包括死亡）；记录观察到的各种异常症状的出现时间、程度和持续时间。

6.5.2 妊娠周期应该从怀孕的第 0d 开始计算。产下的仔鼠应尽早分辨性别，记录每窝的出生数、活仔数、死仔数、低体重仔数以及幼仔外观有无异常和畸形。

6.5.3 以每窝为单位，分别于仔鼠出生的当天和第 4d 进行称重。

6.5.4 动物应在染毒的第一天进行称重，以后每周称量一次。雌鼠还应在妊娠的第 0、7、14 和 20d，以及分娩后的第 0d（或第 1d）和第 4d 称重。数据应逐只进行记录。

6.5.5 在交配前和交配期应计算每天的食物摄入量（交配期分别按雌、雄动物摄入量前一周平均值计算）。如果受试样品是加入饮水中染毒的，水的摄入量也应测量。

## 6.5.6 大体解剖检查

死亡和到期处死的亲代动物都应解剖进行大体检查，肉眼观察有无组织器官形态上的改变，特别是生殖器官，同时记录着床数和黄体数。对所有亲代雄鼠的睾丸和附睾进行称重。死亡的和出生后 4d 被处死的仔鼠也应进行检查。

## 6.5.7 病理检查

保留上述剖检的所有亲代动物的卵巢、睾丸、附睾、其它的生殖附件以及肉眼观察有病变的器官标本。睾丸和附睾组织建议使用 Bouin 液进行固定。先对最高剂量组和对照组的动物标本以及剖检中发现异常的标本进行组织病理学检查。如最高剂量组没有发现有意义的病变，其它剂量组的标本可不必再进行病理检查。反之，若最高剂量组发现有意义的病理改变，则其它剂量组相关的标本也应作进一步的检查。

## 6.6 试验结果评价

### 6.6.1 数据处理

对每只动物的数据，分别进行记录，列表表示试验结果，表中应显示每组的实验动物数、试验中死亡或到期处死的动物数、交配的动物数、受孕动物数、各种毒性反应及其出现动物百分数。详细描述观察到的毒性症状，包括出现的时间、持续时间和程度，病理组织学改变和相关的仔鼠资料。

应采用适当的统计方法对数据进行统计分析。

繁殖/生长发育试验结果汇总表

观察 组别 (单位)	数值			
	对照组	剂量 1	剂量 2	剂量 3
交配对数				
交配过的雌鼠数				
成功受孕的雌鼠数				
交配 1~5d 内受孕的动物数				
交配 6~14d 内受孕的动物数				
妊娠≤21d 的动物数				
妊娠=22d 的动物数				
妊娠≥23d 的动物数				
产下活仔的母鼠数				
活仔出生后 4d 的母鼠数				
母鼠的平均黄体数				
母鼠的平均胎盘数				
分娩时, 每只母鼠的平均活仔数				
分娩 4d 后的平均活仔数				
出生时仔鼠的平均性别比率				
出生后 4d 仔鼠的平均性别比率				
出生时每窝仔鼠的平均体重				
出生后 4d 每窝仔鼠的平均体重				
出生时每只仔鼠的平均体重				
出生后 4d 每只仔鼠的平均体重				
未产下畸形仔鼠的母鼠数				
产下 1 只畸形仔鼠的母鼠数				
产下 ≥2 只畸形仔鼠的母鼠数				
没有吸收胎的母鼠数				
吸收胎为 1 个的母鼠数				
吸收胎为 2 个的母鼠数				
吸收胎 ≥3 个的母鼠数				
死产数为 0 的母鼠数				
死产数为 1 个的母鼠数				
死产数为 2 个的母鼠数				
死产数 ≥3 个的母鼠数				
仔鼠出生后 4d 仍存活的母鼠数				
仔鼠出生后 4d 死亡 1 只的母鼠数				
仔鼠出生后 4d 死亡 2 只的母鼠数				
仔鼠出生后 4d 死亡 ≥3 只的母鼠数				

### 6.6.2 结果评价

受试样品的毒性作用应根据试验观察、大体解剖和病理组织学的检查结果来判断, 并根据受试样品的剂量与畸形的发生率及其程度之间的关系来评价。

## 7 鉴定报告

鉴定报告应包括以下内容：

- 7.1 受试样品名称、理化特性、配制方法（溶剂）；
- 7.2 实验动物的种类、品系、性别、体重、数量和来源（注明合格证号和动物级别）；
- 7.3 实验动物饲养环境，包括饲料、饮水的来源、室温、相对湿度、合笼或单笼饲养、动物实验室合格证号；
- 7.4 试验方法：染毒方法和期限，剂量分组；
- 7.5 动物的食物（或饮水）摄入量和体重资料；
- 7.6 按性别和剂量组分别记录的毒性反应，包括繁殖、妊娠及其子代、子代发育和其它的毒性症状；
- 7.7 着床数、黄体数、每窝仔鼠的多少及重量、活仔数、流产数、肉眼观察到的畸形和体重仔鼠数；
- 7.8 亲代动物脏器的重量；
- 7.9 大体检查的结果；
- 7.10 详述病理检查结果；
- 7.11 统计处理的结果；
- 7.12 结论。

## 8 试验结果的解释

本试验可评价动物在多次接触某一受试样品后所引起的对繁殖/生长发育的毒性作用。可为进一步的生殖毒性试验提供依据。

# 亚急性毒性联合繁殖/发育毒性筛选试验

## Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test

### 1 范围

本规范规定了动物亚急性毒性联合繁殖/发育毒性筛选试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品的亚急性毒性、繁殖毒性及生长发育的影响。

本规范等同于亚急性毒性试验和繁殖/发育毒性筛选试验的联合试验。

### 2 规范性引用文件

OECD Guideline for Testing of Chemicals (No.422, Mar. 1996)

USEPA OPPTS Health Effects Test Guidelines (Series 870.3650, July 2000)

### 3 试验目的

提供化学品可能引起动物的亚急性毒性资料，以及可能对雌性和雄性动物繁殖功能影响的一般性资料：如性腺功能、交配行为、受孕、分娩、哺乳、断乳以及子代的生长发育情况等。本试验还可以初步反映化学品对动物神经系统和免疫系统的影响。

### 4 定义

4.1 生殖毒性(Reproduction Toxicity)：受试样品对亲代繁殖功能或能力的影响和/或对子代生长发育的损害效应。

4.2 母体毒性 (Maternal Toxicity)：引起亲代雌性妊娠动物直接或间接的健康损害效应。

4.3 繁殖力的损害(Impairment of Fertility)：表现为雌性或雄性动物生殖功能或能力的障碍。

4.4 生长发育毒性(Developmental Toxicity)：妊娠动物接触受试样品而引起的子代在出生以前、围产期和出生以后所显现出的机体缺陷或功能障碍。

### 5 试验基本原则

试验应设多个剂量组。

从试验开始至到期处死，雄性动物的染毒期至少为四周，即交配前期最少染

毒两周，交配期和交配后期染毒两周。由于雄性动物交配前期的染毒时间较短，仅以繁殖能力的大小来评价化学品对雄性动物生殖系统的影响是不够的，因此还应作病理组织学检查。以较全面地评价受试样品对雄性动物繁殖力和精子形成的毒性作用。

雌性动物在整个试验中，都应接受染毒。交配前期至少染毒两周（相当于两个完整的发情期），交配期，妊娠期和至少 4d 的分娩后期都需进行染毒，直至试验处死的前一天。雌性动物试验期限大约为 54d，即交配前期至少为 14d，交配期为 14d 左右，妊娠期和哺乳期则分别为 22d 和 4d 左右。

## 6 试验方法

### 6.1 受试样品

受试样品可以是固体、液体、气体或蒸气。试验前应对受试样品的化学特性、纯度（含有的重要杂质）、溶解性、挥发性、稳定性等进行了解。需要时还应知道其熔点/沸点或酸碱度。

### 6.2 实验动物和饲养环境

#### 6.2.1 实验动物

首选健康初成年的大鼠，未经交配，未参加过任何试验。避免选用繁殖力低和生长发育缺陷率高的品系。试验初，动物的体重不应超过同性别平均体重的 20%。如果试验分为预试验和正式试验，所用动物的品系和来源应相同。所选动物应注明种类、品系、性别、体重和（或）周龄。最常使用断乳，7~8 周龄，至少经过 5d 适应期的动物来进行繁殖毒性试验。雌性动物必须是未产过仔的。

#### 6.2.2 动物数

为了获得足够的孕鼠（至少每组 8 只）和子代，正确地评价受试样品对动物繁殖、妊娠和哺育的影响，以及对 F<sub>1</sub> 子代从受孕到出生后 4d 的吸乳、生长发育情况可能引起的不良作用，在试验初每个试验组至少应有 20 只动物，雌雄各半。如果试验中间，需要处死一部分动物进行检查，则试验初就需要增加这一部分的动物数。

为了观察动物的全身毒性反应，试验最高剂量组和对照组的动物需各增加 10 只动物，雌雄各半。这些动物将不合笼交配，仅用作观察可逆的、持久的和迟发的等各种全身毒性症状，而不用于繁殖/发育毒性的评价。

#### 6.2.3 饲养环境

实验动物和动物试验的环境设施应符合国家相应规定。

动物采用自由饮食。可单笼饲养，或按性别分笼饲养（每笼不能超过 5 只），分笼的方法不能影响试验结果。交配过程应在合适的笼具中进行，孕鼠临近分娩

时，应单笼饲养在分娩笼中，需要时笼中放置造窝垫料。

### 6.3 剂量水平

试验至少设三个染毒组和一个对照组。剂量水平可以根据受试样品已知的毒性和毒代动力学的数据来制定，同时还应考虑到妊娠动物对受试样品毒性的敏感程度不同于非妊娠动物。最高剂量应使亲代动物出现毒性反应，但又不引发动物的死亡或明显的痛苦；低剂量应不引起亲代及其子代动物的任何毒性反应；中间剂量可引起轻微毒性反应。组间距通常为 2~4 倍。若试验设 4 个剂量组，第四个剂量组的组距则可以考虑大一些，如 10 倍。如果受试样品以 1000mg/kg bw 的剂量经口给予，仍未观察到任何毒副作用时，则可以采用限量试验，即试验不需要设其它剂量组。若试验采用的是其它的染毒途径：如吸入或经皮染毒，染毒的最高浓度（或剂量）由受试样品的理化特性来决定。

### 6.4 试验步骤

#### 6.4.1 染毒

将动物按体重随机分为染毒组和对照组，编号后进行染毒。受试样品可以通过灌胃经口染毒。灌胃量的多少取决于实验动物的大小，最大的灌胃量通常不超过 1ml/100g 动物体重。如果受试样品为水溶液，灌胃量则可以考虑增大到 2 ml/100g 体重。在整个试验过程中，应该采用相同的灌胃体积。每只动物的给样体积应按其体重来确定，且每周进行调整。每周染毒 7d，每天应在相同的时间进行。对照组动物除了不给予受试样品外，其余的处理应与剂量组完全相同。如果受试样品使用赋形剂，对照组应采用赋形剂的最大使用量进行平行染毒。在选择赋形剂时，首先应考虑水溶液或水混悬液，再考虑选用油性的溶液、乳化剂（植物油）或其它溶剂。如果选用非水的溶剂作为赋形剂时，应明确赋形剂的毒性及受试样品在赋形剂中的稳定性。

如果将受试样品掺入饲料或溶于饮水中进行染毒，受试样品在饲料或饮水中的含量应恒定，但受试样品的添加量不能破坏普通饲料或饮水中的营养平衡。

#### 6.4.2 给样期限及繁殖程序（以大鼠为例）

试验周期	亲代 (P)	F <sub>1</sub> (子代)
第 1~第 2 周末	雄性与雌性亲代动物开始染毒	
第 3~第 4 周末*	交配（给样），4 周末处死雄性动物	
第 5~第 7 周末*	孕鼠继续给样（妊娠及分娩）	F <sub>1</sub> 出生
第 8 周*	哺乳（给样），子代出生 4d 后处死雌性动物	出生 4d 后处死 F <sub>1</sub>
第 9~第 10 周末	未处死的动物，继续染毒 2 周后予以处死	

\*高剂量组和对照组中用于观察全身毒性反应的各 10 只大鼠（雌雄各半），仅继续染毒不作其它处理。

#### 6.4.3 交配方法及妊娠检查

雄性和雌性动物按 1:1 比例合笼交配。雌鼠应始终与同剂量组的同一只、但

不是同窝所生的雄鼠合笼直至受孕，合笼时间最长可为两周。在交配过程中，每天早晨应对雌鼠进行检查，查看阴道中是否有精子或阴栓。将检查到精子或阴栓的当天计为雌鼠妊娠的第 0d。若交配两周后仍未受孕，可以将不育的动物与证实过生育功能正常的同一剂量组的动物重新配对，再次合笼交配。

## 6.5 观察及检查

6.5.1 一般每日至少对动物进行一次仔细的观察，观察时点应固定，并选择在染毒后毒性症状可能出现的高峰期。但对动物发病或死亡的情况，每天至少观察两次。

6.5.2 在染毒前和给样后的每一周，都应对所有的动物进行详细的临床检查。检查皮肤、毛、眼睛、粘膜、分泌物、排泄物、自律活动（如流泪、竖毛、瞳孔的大小、异常的呼吸方式）的变化；观察动物的步态、姿势的变化和对受试样品的反应，如抽搐、僵直、呆滞、过度梳理毛发、反复地转圈；记录动物有无行为改变（如自残、倒走），难产或滞产等现象。

6.5.3 在染毒结束后和采血进行血液和生化检查之前，从各组随机选择 5 雌 5 雄，对其进行感官刺激（如听力、视觉和肢体反应）、抓力和肌肉运动的检查。由于受检查的母鼠正处于哺乳期，母鼠离开仔鼠接受检查的时间不能超过 30~40min。

6.5.4 妊娠周期应该从怀孕的第 0d 开始计算。生产下的仔鼠应尽早分辨性别，记录每窝的出生数、活仔数、死仔数、低体重仔数以及幼仔外观有无异常和畸形。

6.5.5 以每窝为单位，分别于仔鼠出生的当天和第 4d 进行称重。记录仔鼠的任何异常反应。

6.5.6 动物应在染毒的第一天进行称重，以后每周称量一次。雌鼠还应在妊娠的第 0、7、14 和 20d，以及分娩后的第 0d（或第 1d）和第 4d 称重。数据应逐只进行记录。

6.5.7 在交配前和交配期，应测定每天的食物摄入量（交配期间雌、雄动物的摄入量分别按交配前期的周平均值计算）。如果受试样品是加入饮水中给予的，水的摄入量也应计算。

## 6.5.8 血液学检查

到期处死动物之前，应从各组随机选择 5 雌 5 雄，对其进行一次血液学检查，包括血球容积、血红蛋白含量、红细胞计数、白细胞计数及分类、血小板计数和一种检查血凝时间的试验。

### 6.5.9 生化检验

到期处死动物之前，应从各组随机选择 5 雌 5 雄，对其进行一次生化检验。主要检测受试样品对组织，特别是肝、肾的毒性作用。检验的标本可为血浆或血清，检验的指标包括钠、钾、葡萄糖、总胆固醇、尿素、肌酐、总蛋白和白蛋白的含量，以及至少两项肝功能试验（如谷氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶和山梨糖醇脱氢酶）和胆酸。

雄性动物也可以采用尿检代替血生化检查。检查的指标包括定时收集的尿量、外观、渗透压、比重、pH 值、尿蛋白、尿糖和隐血。

若已知受试样品对其它一些生化指标有影响（如钙、磷、空腹甘油三脂和葡萄糖，激素、高铁血红蛋白和胆碱脂酶），应增加这些检测指标。

### 6.5.10 大体解剖检查

所有成熟的动物都应解剖进行大体检查，肉眼观察有无外观和组织器官形态上的改变，包括口、头、胸、腹腔及其内脏组织，特别是生殖系统。雌鼠同时记录着床数和黄体数；对雄鼠的睾丸和附睾进行称重。死亡的和出生后 4d 被处死的仔鼠也应检查有无异常。

此外，从各组随机选择 5 只雌鼠和 5 只雄鼠，取出肝、肾、肾上腺、胸腺、脾、脑和心，并称量它们的湿重。

### 6.5.11 病理检查

保留上述剖检的所有动物的脑、脊髓、胃、肠、肝、肾、肾上腺、胸腺、脾、甲状腺、心、气管、肺、子宫、膀胱、淋巴结、外周神经、骨髓、睾丸、附睾以及肉眼观察有病变的器官标本。睾丸和附睾组织建议使用 Bouin 液进行固定。先对最高剂量组和对照组的动物标本以及剖检中发现异常的标本进行组织病理学检查。如最高剂量组没有发现有意义的病变，其它剂量组的标本可不必再进行病理检查。反之，若最高剂量组发现有意义的病理改变，则其它剂量组相关的标本也应作进一步的检查。

## 6.6 试验结果评价

### 6.6.1 数据处理

应记录每只动物的数据，列表表示试验结果，表中应显示每组的实验动物数、试验中死亡或到期处死的动物数、交配的动物数、受孕的动物数、各种毒性反应及其发病率。详细描述观察到的毒性症状，包括出现的时间、持续时间和程度，病理组织学改变和相关的仔鼠资料。

应采用适当的统计方法对数据进行统计分析。

繁殖/生长发育试验结果汇总表

观察 组别 (单位)	数值			
	对照组	剂量 1	剂量 2	剂量 3
交配对数				
交配过的雌鼠数				
成功受孕的雌鼠数				
交配 1~5d 内受孕的动物数				
交配 6~14d 内受孕的动物数				
妊娠≤21d 的动物数				
妊娠=22d 的动物数				
妊娠≥23d 的动物数				
产下活仔的母鼠数				
活仔出生后 4d 的母鼠数				
母鼠的平均黄体数				
母鼠的平均胎盘数				
分娩时, 每只母鼠的平均活仔数				
分娩 4d 后的平均活仔数				
出生时仔鼠的平均性别比率				
出生后 4d 仔鼠的平均性别比率				
出生时每窝仔鼠的平均体重				
出生后 4d 每窝仔鼠的平均体重				
出生时每只仔鼠的平均体重				
出生后 4d 每只仔鼠的平均体重				
未产下畸形仔鼠的母鼠数				
产下 1 只畸形仔鼠的母鼠数				
产下 ≥2 只畸形仔鼠的母鼠数				
没有吸收胎的母鼠数				
吸收胎为 1 个的母鼠数				
吸收胎为 2 个的母鼠数				
吸收胎 ≥3 个的母鼠数				
死产数为 0 的母鼠数				
死产数为 1 个的母鼠数				
死产数为 2 个的母鼠数				
死产数 ≥3 个的母鼠数				
仔鼠出生后 4d 仍存活的母鼠数				
仔鼠出生后 4d 死亡 1 只的母鼠数				
仔鼠出生后 4d 死亡 2 只的母鼠数				
仔鼠出生后 4d 死亡 ≥3 只的母鼠数				

### 6.6.3 结果评价

受试样品的毒性作用应根据试验观察、大体解剖和病理组织学的检查结果来判断, 包括受试样品的剂量与畸形的发生率及其程度之间的关系, 如肉眼观察到

的损害、特定的靶器官、生育力受损、临床表现异常、受影响繁殖和产仔的行为、体重变化、死亡率的改变以及其它毒性症状。

## 7 鉴定报告

鉴定报告应包括以下内容：

- 7.1 受试样品名称、理化特性、配制方法（溶剂）；
- 7.2 实验动物的种类、品系、性别、体重、数量和来源（注明合格证号和动物级别）；
- 7.3 实验动物饲养环境，包括饲料、饮水的来源、室温、相对湿度、合笼或单笼饲养、动物实验室合格证号；
- 7.4 试验方法：剂量设计的原则，给样方法和期限，剂量分组；
- 7.5 动物的食物（或饮水）摄入量和体重资料；
- 7.6 按性别和剂量组分别记录的毒性反应，包括繁殖、妊娠及其子代、子代发育和其它的毒性症状；
- 7.7 感官、抓力和肌肉运动的检查结果；
- 7.8 血液学、生化检查结果
- 7.9 着床数、黄体数、每窝仔鼠的多少及重量、活仔数、流产数、肉眼观察到的畸形和低体重仔鼠数；
- 7.10 亲代动物脏器的重量；
- 7.11 大体检查的结果；
- 7.12 详述病理检查结果；
- 7.13 统计处理的结果；
- 7.14 结论。

## 8 试验结果的解释

本试验可评价动物多次接触受试样品后所引起的繁殖/发育毒性作用。由于全身毒性和繁殖/发育毒性都是本试验的观察终点，因此本试验所得到的结果可以用于区分没有一般毒性的繁殖/发育毒性作用的受试样品和具有一般毒性和生殖/发育毒性的受试样品，为进一步的毒性试验提供依据。

# 一代繁殖毒性试验

## One-Generation Reproduction Toxicity Study

### 1 范围

本规范规定了动物一代繁殖毒性试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于检测化学品的繁殖毒性。

### 2 规范性引用文件

OECD Guideline for Testing of Chemicals (No.415, May 1983)

### 3 试验目的

提供关于化学品对雌性和雄性动物繁殖功能影响的一般性资料：如性腺功能、交配行为、受孕、分娩、哺乳、断乳以及子代的生长发育情况等。同时也可在生长发育毒性（新生仔缺陷、死亡和畸形等）方面取得初步资料，为其它有关毒性试验提供参考。

### 4 定义

繁殖毒性 (Reproductive toxicity)：指由化学品引起的雌性或雄性生殖功能的损伤或生殖能力的降低，如繁殖率的下降；或引起子代的非遗传性不良效应，如生长发育毒性，包括致畸性和哺乳期中的健康损害效应。

### 5 试验基本原则

试验应设多个剂量组。选择生长期中的动物进行试验，两种性别都应使用。染毒期限雄性动物至少为一个完整的精子发生期，雌性动物至少为两个完整的发情周期及交配期、妊娠和哺乳期。

### 6 试验方法

#### 6.1 受试样品

受试样品可以是固体、液体、气体或蒸气。试验前应对受试样品的化学特性、纯度（含有的重要杂质）、溶解性、挥发性、稳定性等进行了解。需要时还应知道其熔点/沸点或酸碱度。

## 6.2 实验动物和饲养环境

### 6.2.1 种类和品系的选择

首选健康初成年的大鼠或小鼠。避免选用繁殖率低的品系。所选动物应注明种类、品系、性别、体重和（或）周龄。

为了正确地评价化学品对动物生殖能力的影响，两种性别的动物都应使用。最常使用断乳，7~8周龄，至少经过5d适应期的动物来进行繁殖毒性试验。雌性动物必须是未产过仔的。

### 6.2.2 动物数

为了获得足够的试验数据，正确地评价受试样品对动物繁殖、妊娠和哺育情况以及对其子代从出生到断乳期间的吸乳、生长发育存在的潜在影响。雄性和雌性动物通常按1:1或1:2的比例合笼交配。交配的动物数应保证每个剂量组及对照组都能获得20只左右的孕鼠。

### 6.2.3 饲养环境

实验动物和动物试验的环境设施应符合国家相应规定。

本试验动物采用自由饮食。孕鼠临近分娩时，应单笼饲养在分娩笼中，需要时笼中放置造窝垫料。

## 6.3 剂量水平

试验至少设三个剂量组和一个对照组。应根据受试样品特性（如生物代谢和生物蓄积特性）选择适当剂量。在受试样品理化和生物特性允许的条件下，最高剂量应使亲代动物出现明显的毒性反应，但不引起动物死亡；中间剂量可引起轻微的毒性反应；低剂量应不引起动物及其子代的任何毒性反应。如果受试样品的毒性较低，剂量达到1000mg/kg bw时，仍未对繁殖过程产生任何毒作用，则可以采用限量试验，即试验不需要设其它剂量组。若高剂量的预试验观察到明显的母体毒性作用，但对生育无影响，也可以采用预试验的高剂量进行限量试验。

## 6.4 试验步骤

### 6.4.1 染毒

建议将受试样品掺入饲料中或溶于饮水中进行染毒，其它染毒方式也可以。整个试验过程中所有的动物必须采用相同的染毒方式。使用赋形剂时，赋形剂应无任何毒作用。如果染毒的途径为吸入染毒，参照有关亚慢性吸入毒性试验。

每周染毒7d。

染毒前将动物按体重随机分为剂量组和对照组。如果受试样品使用赋形剂，

对照组应采用赋形剂的最大使用量进行平行染毒。如果受试样品引起动物食物摄入量 and 利用率的下降时，那么对照组动物需要与试验组动物配对喂饲。

如果受试样品是通过灌胃或胶囊染毒时，给样量应按每只动物的体重来确定，且每周进行调整。对于妊娠期的母鼠，染毒量应按妊娠的第 0d 或第 6d 的体重计算。

#### 6.4.2 给样期限及繁殖程序（以大鼠为例）

试验周期	亲代 (P)	F <sub>1</sub> (子代)
第 1~第 8 周末	给予雄性与雌性亲代动物受试样品	
第 9~第 11 周末	交配 (染毒)，交配后处死雄性亲代动物	
第 12~第 14 周末	雌性亲代动物继续染毒 (妊娠及分娩)	F <sub>1</sub> 出生
第 15~第 17 周末	哺乳结束后，停止染毒并处死雌性亲代动物	断乳后处死 F <sub>1</sub>

#### 6.4.3 交配方法及妊娠检查

雄性和雌性动物按 1:1 或 1:2 的比例进行交配。

以 1:1 的交配方式为例，雌鼠应始终与同剂量组的同一只雄鼠合笼直至受孕，合笼最长时间可为 3w。在交配过程中，每天早晨应对雌鼠进行检查，查看阴道中是否有精子或阴栓。将检查到精子或阴栓的当天计为雌鼠妊娠的第 0d (判为交配成功动物)。若 3w 后仍未受孕，应对不育的动物进行检查，分析其原因。可以将不育的动物与证实过生育功能正常的动物重新配对，需要时也可进行生殖器官的病理组织学、发情周期和精子发生周期的检查。

#### 6.4.4 每窝新生幼鼠数量的调整

出生后的第 4d，应将仔鼠数尽量随机调整到每窝 4 雌和 4 雄。若得不到 4 雌和 4 雄时可作不均等的调整 (如 5 雄 3 雌)。每窝的幼仔数小于 8 只时，就不需要进行调整。

#### 6.5 观察及检查

6.5.1 每日至少对动物进行一次仔细的观察。记录有无行为改变，难产或滞产以及所有的毒性反应 (包括死亡)。

6.5.2 在交配前和交配期，应测定每只动物每天的食物摄入量 (交配期间雌、雄动物摄食量分别按交配前一周平均值计算)。产仔后，每窝仔鼠需要称量体重时，母鼠的食物摄入量也应同时计算。如受试样品是添加到水中进行给样的，则还应记录水的摄入量。

6.5.3 亲代动物应在给样的第 1d 进行称重，以后每周称量体重一次。数据应逐只进行记录。

6.5.4 妊娠周期应该从怀孕的第 0d 开始计算。生产下的仔鼠应尽早分辨性别，记录每窝的出生数、活仔数以及幼仔外观有无异常和畸形。同时记录母鼠或仔鼠在生理上和行为上的异常表现。

6.5.5 以每窝为单位，对仔鼠于出生的当天上午、第 4d、第 7d、第 14d 和第 21d 进行称重。

#### 6.5.6 大体解剖检查

死亡和到期处死的亲代动物都应解剖进行大体检查，肉眼观察有无组织器官形态上的改变，特别是生殖器官。死亡或濒临死亡的仔鼠也应接受检查，查看是否有外观或器官形态的缺陷。

#### 6.5.7 病理组织学检查

保留上述剖检的所有亲代动物的卵巢、子宫、子宫颈、阴道、睾丸、附睾、精囊、前列腺、脑下垂体和靶器官标本。先对最高剂量组和对照组的动物标本以及剖检中发现异常的标本进行组织病理学检查。如最高剂量组没有发现有意义的病变，其它剂量组的标本可不必再进行病理检查。若最高剂量组发现有意义的病理改变，则其它剂量组相关的标本也应作进一步的检查。

### 6.6 试验结果评价

#### 6.6.1 繁殖指数

交配成功率 (%) = (交配成功动物数/用于交配的雌性动物数) × 100%

受孕率 (%) = (受孕动物数/用于交配的雌性动物数) × 100%

活产率 (%) = (产生活仔的雌性动物数/受孕动物数) × 100%

出生存活率 (%) = (出生后 4d 幼仔存活数/出生当时存活仔数) × 100%

哺育成活率 (%) = (21d 断奶时幼仔成活数/出生后 4d 幼仔存活数) × 100%

#### 6.6.2 数据处理

列表表示试验数据，表中应显示每组的实验动物数、交配的雄性动物数、受孕的雌性动物数、各种毒性反应及其出现动物百分数。

应采用适当的统计方法对数据应进行统计分析。

#### 6.6.3 结果评价

逐一比较剂量组动物与对照组动物繁殖指数是否有显著性差异，以评定受试

样品有无繁殖毒性，同时还可根据出现统计学差异的指标（如体重，观察指标、大体解剖和病理组织学检查结果等），进一步估计繁殖毒性的损害作用特点。

## 7 鉴定报告

鉴定报告应包括以下内容：

- 7.1 受试样品名称、理化特性、配制方法；
- 7.2 实验动物的种类、品系、性别、体重、数量和来源（注明合格证号和动物级别）；
- 7.3 实验动物饲养环境，包括饲料来源、室温、相对湿度、合笼或单笼饲养、动物实验室合格证号；
- 7.4 试验方法：给样方法和期限，剂量分组；
- 7.5 亲代动物的食物摄入量和体重资料；
- 7.6 按性别和剂量组分别记录的毒性反应，包括繁殖、妊娠和发育能力的异常；
- 7.7 试验过程中，动物死亡的时间以及试验到期时是否还有存活的动物；
- 7.8 每窝仔鼠的体重和仔鼠的平均体重，以及试验后期单个仔鼠的重量；
- 7.9 任何有关繁殖，子鼠及其生长发育的毒性和其它健康损害效应；
- 7.10 观察到的各种异常症状的时间和持续过程；
- 7.11 大体解剖检查的结果；
- 7.12 详述病理组织学检查结果；
- 7.13 统计处理的结果；
- 7.14 结论。

## 8 试验结果的解释

本试验可反映动物在多次接触某一受试样品后所产生的生殖毒性。在分析结果时，应将其与亚慢性试验，致畸试验以及其它试验的结果相结合，进行综合分析。试验结果能提供无作用剂量水平和人体安全接触水平，但试验结果外推到人仍存在着一定的局限性。

# 神经毒性筛选组合试验

## Neurotoxicity Screening Battery Test

### 1 适用范围

本规范规定了化学品神经毒性筛选组合试验的基本原理，要求和方法。  
本规范适用于化学品的神经毒性鉴定。

### 2 规范性引用文件

USEPA OPPTS Health Effect Test Guideline (Series 870.6200, June 1996)

### 3 试验目的

神经筛选组合试验是由功能观察组合试验、运动活力试验及神经病理试验组成。功能观察组合试验是一般的神经毒性试验，主要观察受试样品对动物的一般毒性，为定量测定行为毒性及神经病理试验提供重要依据。运动活力试验是用自动分析仪器检测动物的运动活力水平。神经病理试验是观察并描述中枢神经系统和周围神经系统的组织病理变化。这一组合试验是观察评价受试样品对动物神经功能和神经病理的毒性效应是否一致的试验。而对于一种化学物的潜在神经毒性评价，还需结合其它功能和形态学评价试验。

### 4 定义

4.1 运动活力(Motor Activity)：指实验动物的任何活动。

4.2 神经毒性(Neurotoxicity)：指动物接触化学品后对神经系统结构或功能的所有损害。

### 5 试验基本原则

在标准试验条件下，将受试样品按不同剂量分组染毒。对动物进行仔细全面地观察，观察次数要保证能观察到动物所有的行为或神经的异常变化。每只动物的运动活力要通过自动分析仪器来测量。神经病理组织标本采用原位灌注固定后，再制作组织标本进行镜检。观察到有明显毒性效应的试验结果要进行组间比较和确定是否存在剂量-效应关系。

### 6 试验步骤

#### 6.1 受试样品配制：

受试样品应新鲜配制。除非有资料表明以溶液（或乳浊液、悬浊液等）保存

具有稳定性。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。如非常用溶剂或载体，应有参考资料说明其成份及选做溶剂的原因。

## 6.2 实验动物：

通常采用初成年大鼠，雌雄各半，某些情况下可以用小鼠或犬。实验动物应随机分组。行为测试试验的各剂量组和对照组雌雄大鼠至少各 10 只，最后的神经病理试验每组雌雄至少各 5 只。如果要进行神经病理评价，应适当增加动物数。

## 6.3 剂量设计：

试验组应至少设三个剂量，各剂量组间要有适当的剂量间距，以便试验结果能明确反映剂量-效应关系。对于急性试验，应先确定最高的非致死剂量，然后据此进行其它剂量的设定。

### 6.3.1 急性毒性试验：

高剂量组以不超过 2000mg/kg bw 为宜。高剂量组可能会产生明显的神经毒性效应或其它毒性效应，若有动物死亡，其死亡数量不能影响试验的进行及试验结果的评价；中、低剂量根据高剂量按比例依次降低；低剂量应对动物产生轻微毒性作用或无作用。

### 6.3.2 亚慢性及慢性毒性试验：

高剂量组以不超过 1000mg/kg bw 为宜。高剂量组应产生明显的神经毒性作用或其它明显的毒性作用，若有动物死亡，其死亡数量不能影响试验的进行及试验结果的评价；中、低剂量根据高剂量按比例依次降低，低剂量应对动物产生轻微毒性作用或无作用。

## 6.4 对照组设定

### 6.4.1 赋形剂对照组：

试验需设同步赋形剂对照组。赋形剂对照组实验动物不给予受试样品，仅给予赋形剂，其它处理均与试验组相同。如果赋形剂对动物有潜在毒性，应增设空白（或生理盐水）对照组。

6.4.2 阳性对照组：用同一试验方法进行阳性物对照试验必须能观察到明显的神经毒性症状，如四肢无力或瘫软（反复接触丙烯酰胺 acrylamide）、震颤（p-p'-DDT 引起的）及植物神经系统症状（甲萘威 carbaryl）。运动活力检测仪的使用需提供阳性对照物试验数据，这些数据应证明该仪器能检测出阳性物诱导的运动活力的增加和降低。中枢神经系统和周围神经系统的病理阳性对照物分别采用丙烯酰

胺(acrylamide)和三甲基锡(trimethyl tin)。每次试验时,应同时设阳性对照组,如本实验室有同样试验条件及方法所做的阳性对照资料,可不设阳性对照组。

#### 6.5 染毒方法:

对于许多受试样品,可能要使用一种以上的染毒方式。不同的染毒方式,试验结果可能有差异。应通过预试验选择一种最恰当的染毒方式。在重复染毒的试验研究中,喂饲是较好的一种染毒方式。

#### 6.6 运动活力测定:

使用自动活力记录仪进行运动活力测定。

#### 6.7 神经病理组织标本的制作:

为了最大限度地保持组织细胞的完整性,在进行神经病理检查时,神经组织标本的制作可采用适当的固定剂进行原位灌注,血管的灌注方法见参考文献6、12、18、20。详细的取材解剖步骤见参考文献12、18的50章。组织标本进行再固定处理见参考文献0,1,2,13,18或19等。组织包埋可采用石蜡或树脂包埋的方法,中枢神经系统采用石蜡包埋法较好,如果可行的话,中枢神经系统也可尝试采用树脂包埋法。周围神经系统需用树脂包埋法。根据神经病理发生变化的不同情况也可以选择其它方法,如:Bodian's或Bielchowsky's的银染法或胶质纤维酸性蛋白免疫组化法(GFAP)。如果有多余的动物,也可尝试用GFAP放射免疫分析法,见参考文献11。组织切片应采用苏木精-伊红(H&E)染色,或参考有关文献。

组织标本和组织切片标记后要妥善保存。

#### 6.8 试验步骤

6.8.1 急性毒性试验及活力测定试验:至少在动物染毒前、染毒后8h(药效高峰期)、7d和14d进行症状观察和活力测定。为了估测药效高峰,可以选择两三只大鼠进行不同剂量的毒性试验,观察动物步态等反应。

#### 6.8.2 亚慢性和慢性神经毒性试验:

亚慢性神经毒性试验研究中,若采用定时定量染毒,至少在每次染毒前,进行动物观察和活力测定。若定量喂饲染毒,要在4w、8w和13w的同一时间观察并测定运动活力。在慢性毒性试验研究中,若采用定时定量染毒,至少在染毒前、每次染毒前进行动物观察和活力测定,若定量喂饲染毒,每三个月进行观察和测定一次。

#### 6.8.3 观察内容及注意事项

##### 6.8.3.1 功能观察组合试验

##### 6.8.3.1.1 观察的一般原则:

需由不参与染毒、有经验的观察者对动物进行观察,每项试验最好由同一人

进行观察，以减少不同观察者之间的误差。如确需由不同观察者进行观察，必须保证观察结果的可靠性。观察时需将动物从笼内移到笼外进行观察，对观察试验结果有影响的因素如：声音、温度、湿度、照度、气味、观察时间及其它环境因素等要确保恒定。观察指标要客观、量化和有针对。一些观察方法见参考文献 5, 7, 10。功能观察组合试验，要详细、全面观察和记录试验对象的外观、行为、机体各功能等是否正常。对于一些可以分级的试验结果要制定评分标准或分级标准。

#### 6.8.3.1.2 观察指标：

##### 6.8.3.1.2.1 植物神经功能观察：

对流泪、流涎程度，要进行从低到高的评分；观察是否有毛发竖立和眼球突出；记数大小便次数及情况，包括尿频和腹泻；瞳孔扩大或缩小（对光反射）；眼睑闭合程度（如眼睑是否下垂）。

6.8.3.1.2.2 动物笼内笼外异常活动情况：动物在笼内、笼外抽搐、震颤、异常活动发生率的严重程度要进行记录。

6.8.3.1.2.3 动物对一般刺激反应程度分级（如：将动物从笼内移出或用手碰触动物），按动物反应程度进行评分（从无反应到过度反应）。

##### 6.8.3.1.2.4 动物反应警觉水平观察：

在不受外界干扰情况下笼外观察动物警觉反应水平，根据反应程度从麻木到异常警觉依次评分。

##### 6.8.3.1.2.5 动物姿势、步态情况观察：

对动物在笼内、笼外观察到的姿势、步态异常情况及发生率要进行记录。

##### 6.8.3.1.2.6 动物步态异常程度分级：

对动物步态异常进行分级，按严重程度依次评分。

6.8.3.1.2.7 前后肢握力测定：根据 Meyer et al(见参考文献 9)的方法，对前后肢握力进行测定。

6.8.3.1.2.8 撑力指数测定：根据参考文献 3 中的方法对撑力指数进行测量。

##### 6.8.3.1.2.9 听力和痛觉等测定：

根据动物对各种不同模拟声音刺激反应，检测动物的听力缺陷。（痛觉反应可以通过夹尾巴、轻击尾巴或电炉烫来测定，听力反应可以用突然的咔哒、劈啪声来测定）。

6.8.3.1.2.10 体重：每次试验前，所有动物均要称重，染毒过程中，至少每周称重一次。

6.8.3.1.2.11 动物异常行为、症状及发生率：描述动物的异常行为及发生率（如：重复的无意义的动作—即呆滞、消瘦、脱水、毛发改变、口、鼻、眼分泌物和其

它一些影响试验结果的观察数据)。

#### 6.8.3.1.3 其它观察指标:

提倡试用其它一些有效的观察指标。

6.8.3.1.3.1 笼外观察并记录动物后腿站立情况。

6.8.3.1.3.2 纠错能力水平。

6.8.3.1.3.3 体温。

6.8.3.1.3.4 自发过度的发声。

6.8.3.1.3.5 呼吸频度及深度(如肺罗音或呼吸困难等情况)。

6.8.3.1.3.6 对视觉或其它刺激的感觉运动反应。

#### 6.8.3.2 运动活力:

每天试验前必须将自动活力记录仪调整好,避免影响运动活力准确测出的因素。所测不同组别的动物要随机分配,每只动物要单独测定,各组间活力测定时间应充足、均匀,保持一致,最大限度地减少测试过程的人为误差,对声音、笼子尺寸和形状、温度、相对湿度、照度、气味、测试笼及其它环境干扰因素等影响因素要控制好,以免影响测试结果。

#### 6.8.3.3 神经病理

6.8.3.3.1 组织切片观察:应由有经验的病理学家进行镜检,以确定神经病理方面是否有变化。神经系统各部位均要进行观察,对神经毒物敏感的区域,或根据机能试验已确定可能受影响的部位应仔细观察。具体观察部位及方法可参考文献20。观察时可先观察高剂量组,如高剂量组的病理切片发现异常,可依次观察中、低剂量组,如高剂量组的病理切片无明显异常,可不必观察中、低剂量组。

6.8.3.3.2 病理报告:描述病理检查结果,如发现异常,应确定剂量-反应关系。所有出现病理改变的部位都要进行分析(各剂量组的切片编号对阅片者要保密),要详细记录所有损伤程度及损伤类型,所有的片子都阅完后,再进行各组间的统计分析,以确定剂量-反应关系。若观察到有剂量-反应关系的损害,对不同程度损害及损伤出现率应有相关的描述。对于典型的片子要拍照,可以作为组织损害情况的证据,还可作为组织损伤程度分级的依据(从非常轻微的损伤到严重损伤可依次分级0, 1+, 2+, 3+)。

6.8.4 结果评价 对神经毒性筛选组合试验结果的评定需根据以前及现在的毒性研究结果及相关的功能试验、组织病理检查结果进行综合评价。评定时应根据各剂量组是否引起神经毒性效应、产生毒性作用的动物数、损伤程度等之间的相互关系进行综合评价,并根据试验设计采用适当的统计分析方法。运动活力试验必须提供试验组与对照组每次试验结果的统计数据。

## 7 鉴定报告:

鉴定报告应包括以下内容:

7.1 简单介绍所用的试验仪器、规范观察过程及阳性对照试验等情况:

7.1.1 试验设计方案及试验仪器,并简单解释一下设计依据。

7.1.2 详细描述如何规范观察过程,包括试验场地和打分过程。对试验仪器的校正,试验动物如何分组处理,如何减少人为误差也要作详细介绍。

7.1.3 本实验室所做阳性对照试验的数据结果、证明试验步骤、方法灵敏有效,如果所有试验条件均相同,也可以用近期的阳性对照数据。

7.2 试验结果:

7.2.1 每只动物必须以表格的形式提供以下情况。试验动物编号、体重,每次观察症状及打分情况、死亡时间及原因、总的活力测定结果及每天的活力测定值。

7.2.2 各剂量组试验数据总结须包括:试验开始所用的动物数,每次观察并打分的动物数,每次观察后所有动物打分的平均值及标准差。如有必要的话,每次都应进行统计分析。

7.2.3 神经病理观察结果应按不同剂量组分别描述,包括以下内容:

7.2.3.1 每只动物必须提供动物编号、性别、染毒剂量及时间等处理情况。所有动物的神经损伤情况进行详细描述,并列出组织结构改变的部位、类型、发生次数、损伤程度,并配有相应的照片显示损伤类型及程度。对发现的任何神经病理症状及神经损害(包括自然发生的疾病)都要记录。

7.2.3.2 试验组的神经病理改变应列表显示如下内容:

7.2.3.2.1 每组试验所用动物数、发生损害的动物数。

7.2.3.2.2 发生不同类型神经损伤的动物数、发生位置、次数、每种损伤类型的平均分。

7.3 结果评定:运动活力试验必须提供试验组与对照组每次试验结果的统计数据,鉴定报告必须包括剂量-效应曲线,运动活力数值和观察到的总的动物损害及尸检情况。

7.4 结论

---

**注:撑力指数测定:**选用后肢进行撑力试验。将大鼠后肢用墨水标记,用手轻轻抓住大鼠背部,使其处于水平方向,距离下方光滑的着陆台面 32cm,松手让大鼠自由落下,准确观察其着地时双侧后肢爪尖滑开的最远距离,准确量取并记录该两点间的距离,每只大鼠测定四次,取其平均值作为记录值,用 student t test 进行数据统计。

## 参考文献

0. Armed Forces Institute of Pathology. Manual of Histologic Staining Methods. McGraw-Hill, NY (1968).
1. Bennet, H.S. et al. Science and art in the preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technology* 51:71-97 (1976).
2. Di Sant Agnese, P.A. and De Mesy Jensen, K. Dibasic staining of large epoxy sections and application to surgical pathology. *American Journal of Clinical Pathology* 81:25-29 (1984).
3. Edwards, P.M. and Parker V.H. A simple, sensitive and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 40:589-591 (1977).
4. Finger, F.W. Measuring behavioral activity. In: *Methods in Psychobiology* Vol. 2, Ed. R.D. Myers. Academic, NY. pp.1-19 (1972).
5. Gad, S. A neuromuscular screen for use in industrial toxicology. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 9:691-704 (1982).
6. Hayat, M.A. Volume 1. Biological applications. In: *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. Van Nostrand Reinhold, NY (1970).
7. Irwin, S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic quantitative procedure for assessing the behavioral physiological state of the mouse. *Psychopharmacologia* 13:222-257 (1968).
8. Kinnard, E.J. and Watzman, N. Techniques utilized in the evaluation of psychotropic drugs on animals activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 55:995-1012 (1966).
9. Meyer, O.A. et al. A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehavioral Toxicology* 1:233-236 (1979).
10. Moser V.C. et al. Comparison of chlordimeform and carbaryl using a functional observational battery. *Fundamental and Applied Toxicology* 11:189-206 (1988).
11. O'Callaghan, J.P. Quantification of glial fibrillary acidic protein: comparison of slot-immunobinding assays with a novel sandwich ELISA, *Neurotoxicology and Teratology*, 13:275-281 (1991).

12. Palay, S.L. and Chan Palay, V. Cerebellar Cortex: Cytology and Organization. Springer Verlag, NY (1974).
13. Pender, M.P. A simple method for high resolution light microscopy of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods* 15:213-218 (1985).
14. Ralis, H.M. et al. *Techniques in Neurohistology*, Butterworths, London (1973).
15. Reiter, L.W. Use of activity measures in behavioral toxicology. *Environmental Health Perspectives* 26:9-20 (1978).
16. Reiter, L.W. and MacPhail, R.C. Motor Activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehavioral Toxicology* 1--Suppl. 1:53-66 (1979).
17. Robbins, T.W. A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity. *Handbook of Psychopharmacology Vol 7*. Eds. Iversen, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H. Plenum, NY. pp. 37-82 (1977).
18. Spencer, P.S., Schaumburg, H.H. Eds., *Experimental and Clinical Neurotoxicology*, Williams and Wilkins, Baltimore (1980).
19. World Health Organization. *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals (Environmental Health Criteria 60)*, World Health Organizations Publications Center USA, Albany, NY (1986).
20. Zeman, W. and Innes, J.R. *Craigie's Neuroanatomy of the Rat*, Academic, NY (1963).