



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 21788—2008

## 化学品 慢性毒性与致癌性 联合试验方法

Chemicals—Test method of combined chronic  
toxicity/carcinogenicity study

2008-05-12 发布

2008-09-01 实施

数码防伪

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会

发布

## 前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试指南 No. 453(1981 年)《慢性毒性与致癌性联合试验》(英文版)。

本标准作了以下编辑性修改：

——增加了范围；

——计量单位统一改为我国法定计量单位；

——删除 OECD 的参考文献部分。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准负责起草单位：中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本标准参加起草单位：湖北出入境检验检疫局、辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：孙金秀、崔海容、林铮、胡小钟、郭坚、叶诚、陈建军、徐家文。

## OECD 前言

1. OECD 已经发布了很多文件用于慢性、致癌性毒理学或安全性评价;对这些文件的综合表明除了在操作和试验设计上有些差别两个方面是共同通用的。在编写这些指南时参考并引用了很多国家的指南草案。加上组内许多国家的专家努力,感谢世界卫生组织(WHO)和国际癌症研究中心(IARC)除了提供这些组织的专家的意见外,还提供的重要的文件。

2. 检测哺乳动物的大部分生命期内或终生接触受试物后所引起的各种毒效应,包括主要的慢性毒性、致癌性和相应的剂量-反应关系。

3. 该试验设计和操作除检测一般性毒性(包括对神经、生理、生化、血液系统以及与接触相关的病理形态学方面的作用)外,还应检测受试物诱发肿瘤的作用和潜在的致癌作用。

# 化学品 慢性毒性与致癌性 联合试验方法

## 1 范围

本标准规定了啮齿类动物慢性毒性与致癌性联合试验的范围、试验基本原则、试验方法、试验报告。  
本标准适用于化学品的慢性毒性与致癌性联合试验。

## 2 试验基本原则

在实验动物的大部分生命期间内以一定方式长期接触受试物,观察动物的中毒症状,并进行生化指标、血液学指标、病理组织学等检查,以评价受试物的慢性毒性;同时观察动物的肿瘤出现的数量、类型、发生部位及发生时间,评价受试物的潜在致癌性。

## 3 试验方法

### 3.1 经口染毒对试验受试物的基本要求

- 3.1.1 受试物为固体或液体等;
- 3.1.2 受试物化学识别性特征;
- 3.1.3 受试物的纯度(杂质和含量);
- 3.1.4 受试物溶解度;
- 3.1.5 受试物稳定性(包括在与饲料、饮水混合后的制备物中的稳定性);
- 3.1.6 水解与 pH 值的关系;
- 3.1.7 形成复合体的能力;
- 3.1.8 熔点/沸点。

### 3.2 吸入染毒试验对受试物的基本要求

- 3.2.1 气体、挥发性物质或气溶胶/颗粒物;
- 3.2.2 受试物化学识别性特征;
- 3.2.3 受试物纯度及杂质;
- 3.2.4 液体受试物:饱和蒸气压,沸点;
- 3.2.5 气溶胶/颗粒物受试物:颗粒大小,形状和分散度;
- 3.2.6 受试物闪点;
- 3.2.7 受试物爆炸性。

### 3.3 实验动物和饲养环境

#### 3.3.1 动物的选择

在前期所进行的试验所提供的有关急性、亚急性、亚慢性与毒代动力学资料可为选择适当的动物(种属和品系)提供有力的依据。与其他实验指南所讨论的一样,小鼠和大鼠是评价受试物潜在致癌性应用最为广泛的动物,而大鼠和犬在慢性毒性试验中使用最多。

在慢性毒性/致癌结合评价试验中常规应选用大鼠,但也不排除使用其他动物。原则上,所选动物种属和品系对受试物的致癌作用和毒性作用应很敏感,但其肿瘤自发背景不应太高而影响对致癌作用进行有意义的评价。

#### 3.3.2 饲养环境 实验动物的饲养、饲料和饮水

为了得到有意义的试验结果,必须严格控制饲养环境和动物管理操作技术。除严格控制外,对动物

的操作管理和观察要有监视设备,以减少出入动物室的频率。

饲养室环境条件、试验期间发生疾病、对动物应用药物治疗、饲料中的杂质、空气、水、垫料的质量以及对动物操作的熟练程度等因素都会对动物试验的结果有明显的影 响。

如果啮齿动物饲养在无特殊致病生物的环境(SPF)中,那么,控制试验期间的患传染病和寄生虫就较容易。长期试验中作用的垫料应消毒。动物饲养室应该安静,通风条件良好,有可控制的照明、温度及湿度。动物应该在环境适应一定时间后再开始试验。对从外面来源的动物应有足够长的检疫期方能投入使用。

应该避免在一个饲养室内饲养不同种属的动物。为了防止染毒受试物造成相互暴露的交叉,一个饲养室内仅能饲养接触一种受试物的动物。对照动物应饲养在试验动物的饲养室内,如饲养在别的地方,会给资料的评价带来额外的问题。

试验笼、笼架和其他设备必须摆放有序和易于定期清洗,应避免使用消毒剂和农药,特别是动物有可能接触的地方,因为实验动物接触这些有生物活性的物质会对试验结果造成影响。详细的动物饲养的操作和管理可在科学文献、动物福利期刊和 OECD 规定的良好的实验室(GLP)的文件中查找到。

动物饲料应能满足所选择动物种属的营养需求,不应含可能会影响试验结果的杂质。因为饲料中的污染物和各种营养素的水平会改变实验动物的生理过程。应让啮齿类动物自由进食和饮水。对喂饲器内剩余的饲料每周至少要更新替换一次。

目前,主要有三种类型的饲料:常规饲料(标准饲料)、综合性饲料和各种任意配制的饲料。其中,前两种饲料被广泛的用于致癌性动物试验中。不论选择哪种类型的饲料,供应者必须定期检测基础饲料中的营养成分与杂质含量。最好能知道动物这样的饮食方式对代谢、动物的寿命及肿瘤的发展的影响。

当受试物本身是一种营养类物质,如工业制造的蛋白或淀粉、单细胞蛋白、辐照食物等,应特别注意饲料的配方,因为这些产品加入饲料的水平可高达饲料的 20%~60%(如改良的淀粉与未改良的比较、单细胞蛋白与大豆比较),从而损害了相应的营养物(素)。

OECD 对在全世界范围内工农业各种使用方式使用造成的化学品在饮食中化学污染物列出了名单。虽然如此,对通用的已知会影响致癌的饮食成分(如抗氧化剂、不饱和脂肪酸和硒)应不会达到干扰致癌作用的浓度。几种常见对致癌作用评价可能造成潜在影响的饮食污染物应进行检测以确定其在饲料中是否存在,这些包括农药的残留、有机氯、多环芳烃、雌激素、重金属、亚硝胺和霉菌毒素。

此外,实验室应定期对基础饲料测定营养素、意外的污染物,包括致癌物质。应保留这些检查结果并在每个受试物的最终报告中列出。

如果受试物掺于水和饮食中时,受试物必需在其配制物中均匀稳定。在开始慢性实验之前测定受试物的在配制物中的稳定性和均匀性可用来估计饲料制备和抽样监测的次数。

对饲料进行消毒时应该知道消毒操作对受试物和营养成分的影响,根据影响的程度,应对饲料的营养水平进行适当调整。使用化学消毒剂时,要知道化学消毒剂(如氧化乙烯)对生物测试的影响。

致癌试验期间研究者必须知道对所用饮水中是否有潜在污染物。虽然达到人体饮用水标准动物饮水的水质已能满足动物实验的要求,研究者也应该有对所供动物饮水中成分的检测报告资料。

### 3.3.3 动物的性别和开始试验的时间

应当使用两种性别的动物。进行慢性毒性和致癌性试验通常是使用断乳的动物作为起始试验的年龄。这样的操作程序能使动物在生命的绝大部分时间内接触受试物的对诱发的肿瘤作用充分发挥出来。对啮齿类动物应当在断乳后和检疫后尽早开始染毒,可能时最好在 6 周龄前就开始试验。

### 3.3.4 动物数量

为了保证试验结果的可靠性和满足统计学处理的要求,试验要征求统计学家的意见。十分重要的是动物进入试验组还是对照组应严格按照随机操作程序进行。所设计的动物数要保证试验结束时每组都有足够的动物数满足进行生物学和统计学分析的要求。

一般要求每一剂量组和同步对照组至少有 50 只雄性和 50 只雌性的动物;如果设计不同阶段需要

处死部分动物,应适当增加动物数量。如设高剂量附加组,该组是为了评价毒性组织病理学改变,而不是为了评价肿瘤发生率的。该组雌雄动物各 20 只,同时增设附加组的对照组,雌雄动物各 10 只。

需注意,在上述设计下,每组动物数量中等程度的增加不会对试验统计学强度有明显的增强作用。

### 3.4 剂量水平和染毒操作

为了达到致癌危险性评价的目的,至少要设三个剂量组的染毒组及一个同步对照组。最高剂量组可以引起轻微的毒性反应,如血清酶水平改变或体重减轻等(减少程度低于 10%),但不能明显缩短动物寿命(因肿瘤引起的除外)。对混于饲料内染毒,最高的浓度不能超过 5%。最低剂量组在不影响动物的正常生长、发育和寿命的同时,不能引起任何毒性反应,其剂量一般不应低于上一高剂量的 10%。中剂量应介于高剂量和低剂量之间,也可参照受试物的毒代动力学资料进行设计。

进行慢性毒性毒理学评价时,应增设高剂量附加染毒组和该附加组的同步对照。高剂量附加染毒组的染毒剂量应能产生明显毒性,用于显示受试物的毒理学作用特征。

剂量的设定应当根据已有的资料,首选是亚慢性毒性试验的资料。

通常每天均应染毒,但根据染毒途径可有不同。受试物加入饲料或饮水中进行经口试验时应当是连续染毒。染毒频率可根据毒物代谢动力学资料而调整。

### 3.5 对照组

必须设立对照组。对照组动物除了不接触受试物外其他条件均与染毒组相同。

在某些特殊的情况下,例如吸入染毒以及或经口染毒受试物的制备应用了生物活性不明的乳化剂等赋形剂,应增设赋形剂对照组。

### 3.6 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人体有代表性的接触方式。

#### 3.6.1 经口染毒

已有证据表明受试物能经胃肠道吸收,首选经口染毒。经口染毒可以有多种方式,混于饲料或溶于饮水中,或采取灌胃饲养的方式。如果受试物混于饲料或溶于饮水中染毒,动物接触受试物是连续性的。喂养染毒时混于饲料中受试物的浓度不能高于 5%(受试物如为营养素除外)。灌胃染毒时,理想的染毒次数是每周灌胃 7 次。虽然每周染毒 5 次,在未染毒的期间内可能存在恢复过程和毒性减退消失,可对试验结果造成影响和评价上的困难。然而,从实际上的考虑每周染毒 5 次也可以接受。

#### 3.6.2 经皮染毒

采用皮肤染毒,可能用于模拟人类经皮接触受试物是主要途径,或用于诱发皮肤损伤的动物模型。染毒时,理想的染毒次数是每周 7 次。每周染毒 5 次,虽然可对试验结果造成影响和评价上的困难,然而,从实际上的考虑每周染毒 5 次也可以接受。本方法中不包括诱发皮肤肿瘤的特殊性试验的内容。

#### 3.6.3 吸入染毒

在比起其他两种染毒方法,吸入染毒在技术上更加复杂,本标准提供了详细吸入染毒试验操作技术。在某些特定的情况下,推荐使用气管注入的方式染毒。

这种长期毒性试验,按工业职业性接触方式是每天吸入 6 h,每周 5 d(称间歇染毒方式);按生活环境接触方式为每天染毒 22 h~24 h(留下约 1 h 给动物喂食和清理染毒装置),每周吸入 7 d(称连续染毒方式)。染毒时间实验动物吸入接触恒定的受试物浓度。动物在这两种染毒方式中的主要差别是间歇染毒的动物每天在接触后有 17 h~18 h 的恢复时间。如果是在每周染毒 5 d,在周末恢复时间更长。

采用哪种染毒方式要根据试验目的和需要模拟的人类的接触方式。但必须考虑到某些技术上会存在很大困难。如连续染毒方式虽然能够模仿环境接触情况,但染毒期间除了需提供饮水和饲料外,需要更为复杂的气溶胶(可靠度)、蒸汽的发生装置和浓度监测技术等。

##### 3.6.3.1 染毒装置

推荐使用动式口一鼻吸入染毒装置,其对空气条件的要求与柜式基本形同。使用染毒柜时,其设计

必须保证换气次数能达到 12 次/h ~15 次/h;柜内氧体积分数在 19%左右;柜内受试样品浓度均匀;对照组与吸入染毒组动物用柜的结构和设计要保证动物接触条件除了吸入或不吸入受试物外,其他应完全相同;应保证笼内动物不太拥挤,使动物能最大限度接触受试物;通用的规则是柜体内空气环境的稳定,要求动物所占体积不超过染毒柜容积的 5%;染毒柜应保持一定的负压,以防受试物扩散到周围环境中。

### 3.6.3.2 染毒环境条件的测定

下面的这些测定应特别小心,避免柜内气体体积分数的大幅波动或者染毒条件的改变:

3.6.3.2.1 气流流速测定:通过染毒装置的气流流速应采用连续监控。

3.6.3.2.2 染毒柜内气体受试物浓度测定:在染毒过程中,受试物的实际浓度应尽可能的保持不变。

3.6.3.2.3 温度和湿度测定:对啮齿类动物,其染毒环境温度应控制在  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度,除了水性气溶胶外,应最好保持在 30%~70%。最好两个指标被同时连续监控。

3.6.3.2.4 粒度测定:对受试物在柜内空气中呈液体或固体气溶胶形式的粒度分布进行测定;气溶胶的颗粒大小应该是所使用动物的可呼吸性的空气动力学直径大小。应采集染毒柜中处于动物的呼吸带的气体样品,所采集的样品的粒径的分布是能代表性动物实际接触的。所有悬浮的气溶胶,即便是大部分粒子是非可呼吸性的样品粒度应采用不同粒径的数量或质量所占比例来表示。为保证染毒期间气溶胶的稳定,应在气溶胶发生器的研发阶段尽量多采集样品进行粒度大小分析、标定;在动物暴露期常需要证明动物所接触的粒子分布恒定一致时才进行分析测定。

## 3.7 染毒周期

致癌试验的期限应是所选择动物的正常寿命的大部分。曾有建议试验期限是试验用所有动物的整个生命期间。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,则试验可能不必要的被拖长,切实操作和对试验结果的评价复杂化。不如选择所用动物寿命大部分的时间染毒,因为绝大多数化学品,如果有致癌性,在这段时间出现诱发肿瘤的概率是很高的。建议:

3.7.1 通常试验染毒期限,小鼠和仓鼠应为 18 个月、大鼠为 24 个月;然而对于某些寿命较长或自发肿瘤较低的动物种系,小鼠和仓鼠可达 24 个月,大鼠可达 30 个月。

3.7.2 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。如所引起的效应两性别有明显差异,应将每种性别动物试验分别视为单个试验,其结束的时间也可不同。个别情况下因受试物毒性作用造成高剂量组动物过早死亡,此时不应结束试验。

3.7.3 所设的高剂量的观察毒性的附加组(雌雄各 20 只和对照组雌雄各 10 只)应当至少染毒 12 个月以上。这些动物可按设计不同时间处死检查,其资料用于评价与受试样品有关的毒性作用,以区别老年性改变所导致的病理改变。

对试验结果评价为阴性结论,除了满足诱发肿瘤的条件外,必须满足下列全部条件:

- a) 由于组织自溶、自食或管理不当所造成任何一组动物损失不超过 10%。
- b) 小鼠和仓鼠染毒 18 个月,大鼠染毒 24 个月后,各组动物的存活率不低于 50%。

## 3.8 观察

### 3.8.1 临床观察

试验期内每天至少详细观察一次。在出现毒性作用时还应增加必要的每天观察次数以便死亡动物及时解剖、冷藏。对质弱或濒死动物及时或隔离、或处死、冷藏,并解剖检查,尽量减少因疾病、自溶或被同类所食造成的动物损失。除此之外仔细记录毒性作用的开始时间及其转归。应记录每一只动物的临床症状包括神经系统、眼部变化以及动物的死亡率等。应记录任何毒性作用包括疑似癌变的发生和发展情况。

### 3.8.2 体重

记录各组每只动物的体重,前 13 周每周记录体重一次,此后每 4 周记录一次。

### 3.8.3 动物摄食量

动物的摄食量在前13周每周记录一次,此后可3个月记录一次。但是在动物健康状况或体重异常需要时应适当增加测定次数。

### 3.9 血液检查

应在染毒后3个月、6个月,以后每隔6个月及试验结束时对非啮齿类动物的全部动物,或啮齿类动物20只/性别/组进行血液学检查,内容包括:血红蛋白含量,红细胞比积,红细胞总数,白细胞总数,血小板计数及其他凝血试验等。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,需要时才对中剂量组动物进行检查。

在试验过程中临床观察提示动物健康状况不好的情况下,需对该动物作白细胞分类计数。

首先只对最高剂量组和对照组进行血细胞的分类计数检查,只有在最高剂量组与对照组主要的项目上出现差别时才对较低剂量组进行检查。

### 3.10 尿液检查

收集各组动物尿液进行分析,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。或是以每只动物的尿样或是每组每性别动物的混合尿样进行分析。指标应包括:外观,体积与密度(需要每只动物的资料);蛋白质,葡萄糖、酮体,潜血(半定量法);沉淀物镜检(半定量法)。

### 3.11 临床化学检查

在每6个月及试验结束时进行检查。大鼠每组每性别可检查10只,每次检查的动物最好相同。从采集到的血液分离血浆,检查指标包括:总蛋白质质量浓度;白蛋白质量浓度;肝功能检查(如碱性磷酸酶、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸转移酶(AST)活性, $\gamma$ -谷氨酰转肽酶及鸟氨酸脱羧酶;碳水化合物代谢,如空腹血糖浓度;肾功能检查,如血液尿素氮;

### 3.12 病理学检查

病理学检查(包括大体解剖与组织病理学检查两部分)是慢性毒性/致癌结合试验的重要部分,必须给予充分的重视。应全面检查、详细描述和报告,包括结果的诊断。

#### 3.12.1 大体解剖检查

好的大体解剖能为组织病理学检查提供很多有价值的信息,并且在某些情况下可对组织病理检查提出良好的建议。即使组织病理学检查很完善,也不能替代不充分的大体解剖检查。进行大体解剖时应有经过培训实验动物的病理学家在场指导。

所有动物(包括试验期间死亡的、因濒死处死的)皆应进行详细完整的大体解剖。动物处死前应收集血液以进行血细胞分类计数(differential blood counts)。所有肉眼可见病损、肿瘤或怀疑是肿瘤性改变的组织或脏器皆应保存。应试图找到大体解剖与病理组织之间的联系。

所有的器官组织都应保存并进行组织病理学检查,一般包括:脑\*(延髓、桥脑、小脑皮层、大脑皮层)、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、肾脏\*、肾上腺\*、食道、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、雌性乳腺、皮肤、肌肉、外周神经、脊髓(颈、胸、腰)、胸骨(带骨髓)、股骨(带关节)与眼。在吸入染毒试验,全部呼吸道包括咽、喉与鼻腔都应保存。

如果进行了其他临床检查,在进行组织病理学检查之前,应对从这些检查所得到的信息进行认真分析,可能会给病理学家提示许多有意义的指导。

#### 3.12.2 组织病理学检查

所有肉眼可见的肿瘤和其他病损都应进行组织病理学检查。

---

\* ) 带\*的器官是需要称重的器官:啮齿类动物从每组每性别10只、非啮齿类的所有动物,同时加上甲状腺和甲状旁腺。



此外,建议进行下列检查:

- 3.12.2.1 对在固定保存的器官和组织中组织病理学检查见到的所有损伤、异常的详细描述,包括:
  - 3.12.2.1.1 在试验期间所有死亡或处死的动物;
  - 3.12.2.1.2 高剂量组与对照组的;
- 3.12.2.2 由接触受试物引起的、或可能是受试物引起的、在较低的剂量组也检查出来的组织和器官异常;
- 3.12.2.3 试验结果提供动物正常寿命有明显改变的证据,或出现可能改变毒性效应的诱导作用,下一个剂量组也应进行相应的上述检查;
- 3.12.2.4 在所使用的实验动物种系正常的损伤发生率(在相同试验条件下,如历史对照数据)对正确的评价暴露组所观察到的异常改变是不可缺少的。

#### 4 试验报告

试验报告应提出以下识别性信息:

- 4.1 进行试验的实验室名称与地址;
- 4.2 试验开始和结束日期;
- 4.3 每个人在进行试验、出具实验报告中所承担的任务和责任。

试验报告应包括所有必要的资料,以提供一个完整、准确的试验步骤和对结果评价。需要包括数据的汇总、数据分析和由分析得出的结论。摘要应着重在试验数据、观察结果和与对照组的差别大小,而这些差别可能是毒性作用的指标,包括组织增生、肿瘤前期与肿瘤病损的数据。

---

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
化学品 慢性毒性与致癌性  
联合试验方法

GB/T 21788—2008

\*

中国标准出版社出版发行  
北京复兴门外三里河北街16号  
邮政编码:100045

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

电话:68523946 68517548

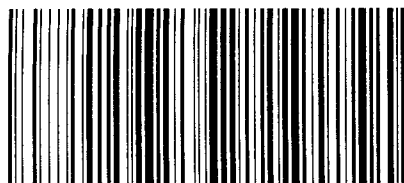
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字  
2008年7月第一版 2008年7月第一次印刷

\*

书号: 155066 · 1-32189



GB/T 21788—2008

如有印装差错 由本社发行中心调换  
版权专有 侵权必究  
举报电话:(010)68533533