

## 中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 240.28—2011

---

### 化学品毒理学评价程序和试验方法 第 28 部分：慢性毒性/致癌性联合试验

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—  
Part 28: Combined chronic toxicity/carcinogenicity test

2011-08-19 发布

2012-03-01 实施

---



中华人民共和国卫生部 发布

## 前 言

根据《中华人民共和国职业病防治法》制定本部分。

GBZ/T 240《化学品毒理学评价程序和试验方法》现分为以下四十四部分：

- 第 1 部分：总则；
- 第 2 部分：急性经口毒性试验；
- 第 3 部分：急性经皮毒性试验；
- 第 4 部分：急性吸入毒性试验；
- 第 5 部分：急性眼刺激性/腐蚀性试验；
- 第 6 部分：急性皮肤刺激性/腐蚀性试验；
- 第 7 部分：皮肤致敏试验；
- 第 8 部分：鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验；
- 第 9 部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验；
- 第 10 部分：体外哺乳动物细胞基因突变试验；
- 第 11 部分：体内哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验；
- 第 12 部分：体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验；
- 第 13 部分：哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验；
- 第 14 部分：啮齿类动物显性致死试验；
- 第 15 部分：亚急性经口毒性试验；
- 第 16 部分：亚急性经皮毒性试验；
- 第 17 部分：亚急性吸入毒性试验；
- 第 18 部分：亚慢性经口毒性试验；
- 第 19 部分：亚慢性经皮毒性试验；
- 第 20 部分：亚慢性吸入毒性试验；
- 第 21 部分：致畸试验；
- 第 22 部分：两代繁殖毒性试验；
- 第 23 部分：迟发性神经毒性试验；
- 第 24 部分：慢性经口毒性试验；
- 第 25 部分：慢性经皮毒性试验；
- 第 26 部分：慢性吸入毒性试验；
- 第 27 部分：致癌试验；
- 第 28 部分：慢性毒性/致癌性联合试验；
- 第 29 部分：毒物代谢动力学试验；
- 第 30 部分：皮肤变态反应试验-局部淋巴结法；
- 第 31 部分：大肠杆菌回复突变试验；
- 第 32 部分：酵母菌基因突变试验；
- 第 33 部分：果蝇伴性隐性致死试验；
- 第 34 部分：枯草杆菌基因重组试验；
- 第 35 部分：体外哺乳动物细胞程序外 DNA 合成(UDS)试验；
- 第 36 部分：体内哺乳动物外周血细胞微核试验；

- 第 37 部分:体外哺乳动物细胞姊妹染色单体交换试验;
- 第 38 部分:体内哺乳动物骨髓细胞姊妹染色体交换试验;
- 第 39 部分:精子畸形试验;
- 第 40 部分:繁殖/生长发育毒性筛选试验;
- 第 41 部分:亚急性毒性合并繁殖/发育毒性筛选试验;
- 第 42 部分:一代繁殖试验;
- 第 43 部分:神经毒性筛选组合试验;
- 第 44 部分:免疫毒性试验。

.....

本部分为 GBZ/T 240 的第 28 部分。

本部分由卫生部职业卫生标准专业委员会提出。

本部分由中华人民共和国卫生部批准。

本部分起草单位:广东省职业病防治院、中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本部分主要起草人:黄建勋、李斌、郑玉新、孙金秀、林铮。

# 化学品毒理学评价程序和试验方法

## 第 28 部分：慢性毒性/致癌性联合试验

### 1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了动物慢性毒性和致癌性合并试验的目的、试验概述、试验方法、数据处理与结果评价、评价报告和结果解释。

本部分适用于同时检测化学品的慢性毒性和致癌性。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GBZ/T 224 职业卫生名词术语

GBZ/T 240.1 化学品毒理学评价程序和试验方法 第 1 部分:总则

### 3 术语和定义

GBZ/T 240.1、GBZ/T 224 界定的术语和定义适用于本文件。

### 4 试验目的

通过一定途径(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)的受试化学品,观察实验动物主要的慢性毒性效应,确定无可见有害作用水平(浓度),同时观察化学品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品的职业接触限值提供参考依据。

### 5 试验概述

在实验动物的大部分生命期间将受试化学物质以一定方式染毒,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

##### 6.1.1 资料收集

在开始本试验之前,应尽量收集受试样品现有的各种资料。

a) 受试样品的商品名和其他名称(包括 CAS 号);

- b) 受试样品的结构式、分子式和相对分子质量；
- c) 受试样品的物理、化学性质(可包括:外观、沸点、熔点、密度、折射率、光谱资料、溶解度、挥发性、化学活性、ppm 和  $\text{mg}/\text{m}^3$  换算系数、光化学性质、电离度、粒度等)。重要的参数还包括稳定性(包括在介质或饲料中的稳定性)；
- d) 受试样品的成分、主要杂质；
- e) 受试样品的生产方法、合成路线；
- f) 储存方法:要有长期储存受试样品(包括在介质或饲料中)的合适方法。否则需定期制备新鲜样品；
- g) 人类可能接触的途径和水平。

#### 6.1.2 登记接受样品的日期

开始试验前应有适当数量的受试样品。样品来源和批号应相同,尽可能使用同一批生产的受试样品,否则,分别测定每一批受试样品的纯度和杂质。

### 6.2 实验动物和饲养环境

#### 6.2.1 动物种系的选择

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,但也不排除选用其他动物种系的可能性,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低的动物。

#### 6.2.2 动物性别和年龄

应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。如作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

6.2.4.1 实验动物和动物试验的环境设施应符合国家相应规定,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影响。

6.2.4.2 至少应使用清洁级动物进行试验,购入动物需经检疫方能用于试验。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,还应避免受试样品对对照组动物的影响。

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

位更应注意,因为这类物质对试验结果可能产生影响。

6.2.4.4 饲料应满足动物营养需要,应定期分析饲料成分(包括营养成分和杂质等),不含对试验有影响的杂质或含有的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,而有些物质如农药残留、氯烃、多环芳烃、雌激素、重金属等等对试验有影响。饲料成分分析结果应在评价报告中列出。

6.2.4.5 如果受试样品掺在饲料或饮水中染毒,应测定受试样品在饲料或饮水中的稳定性和均匀性。

6.2.4.6 如果受试样品的毒性较低,则加入饲料的受试样品比例较大,应注意混入饲料中的受试样品浓度不应超过5%,否则会对动物正常营养产生影响。

6.2.4.7 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 试验分组

至少要设三个剂量组及一个对照组。高剂量组可以出现较轻的毒性反应,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。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。

高剂量组和对照组应设附加组,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。

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

### 6.4 染毒途径

#### 6.4.1 经口

如果受试样品可通过胃肠道吸收,最好选用经口途径。可将受试样品混入饲料或饮水中喂饲,每周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,会影响结果及最后的评价。

#### 6.4.2 经皮

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

#### 6.4.3 经呼吸道吸入

##### 6.4.3.1 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23h,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17h~18h恢复,而且在周末恢复时间更长。

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)。

#### 6.4.3.2 染毒柜

染毒柜的设计应保证换气次数能达到12次/h~15次/h;柜内氧含量19%左右;柜内受试样品浓度均匀;对照组与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。

#### 6.4.3.3 物理参数监测

物理参数的监测项目及如下:

- 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 $22\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,湿度30%~70%(以水为载体的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。

#### 6.5 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,因为绝大多数化学品如果有致癌性的话,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。

动物损失在任何一组都不能高于10%。

#### 6.6 临床观察

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

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

6.6.3 逐个记录体重变化,前13周每周记录一次,此后每4周记录一次。摄食量在前13周每周记录一次,此后如动物健康状况或体重无异常改变则至少一个月记录一次。经饮水染毒时应记录饮水量,以便计算受试样品摄入量。

6.6.4 建议在动物染毒前和染毒后,最好对所有实验动物,至少应对高剂量组和对照组动物,使用眼科镜或其他有关设备进行眼科检查。若发现动物有眼科变化则应对所有动物进行检查。

## 6.7 临床检查

### 6.7.1 血常规检查和其他血液指标检查

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

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

### 6.7.2 尿液检查

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

尿液的常规检查包括外观、pH值、尿蛋白、尿糖和血细胞。如尿样分析可作为预期或观察得到的毒性指标,则可增加有关的尿液检查项目。

### 6.7.3 临床生化检查

在染毒开始后第3个月和第6个月各检查一次,此后每隔约6个月检查一次,试验结束时检查一次。大鼠每组每性别可检查10只,非啮齿类动物应全部检查。每次检查的动物最好相同。

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

### 6.7.4 眼科检查

建议在动物染毒前和染毒后,对所有实验动物,至少应对高剂量组和对照组动物,使用眼科镜或其他有关设备进行眼科检查。若发现动物有眼科变化则应对所有动物进行检查。

### 6.7.5 大体解剖

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

所有的器官组织都应保存。一般包括下列器官和组织:脑、垂体、甲状腺(包括甲状旁腺)、胸腺、肺(包括气管)、心脏、主动脉、唾液腺、肝、脾、肾、肾上腺、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、子宫、膀胱、淋巴结、胰腺、性腺、生殖附属器官、雌性乳腺、皮肤、肌肉、外周神经、脊髓(颈,胸,腰段)、胸骨或股骨(包括关节)和眼睛。肺和膀胱用固定剂填充能保存更好。在吸入试验,整个呼吸系统的组织器官包括鼻、咽喉等均应检查。脑、肝、脾、肾、肾上腺、性腺需称重,大鼠每组每性别可称10只,非啮齿类动物还应包括甲状腺及甲状旁腺。

### 6.7.6 病理组织学检查

6.7.6.1 应详细描述病变情况,特别是增生、癌前病变和癌变情况。

- 6.7.6.2 对所有肉眼可见的肿瘤和异常的组织器官应进行病理组织学检查。
- 6.7.6.3 对在试验中途死亡或处死的动物、所有高剂量组和对照组动物的组织器官进行病理组织学检查并详细描述。
- 6.7.6.4 试验结果证明某一剂量组的动物正常寿命发生明显改变或诱发了影响毒性反应的效应,则下一个剂量组也应做病理组织学检查。
- 6.7.6.5 如果怀疑某种病变是由受试样品引起的,则应对所有剂量组动物的相应器官和组织进行病理组织学检查。
- 6.7.6.6 某一剂量组病理组织学检查有问题时,下一剂量组需作病理组织学检查。
- 6.7.6.7 如高剂量组与对照组病理组织学检查存在明显差别,则其他剂量组的相应器官和组织也应进行病理组织学检查。
- 6.7.6.8 需参考受试动物自发病变的资料(如相同试验条件下的历史资料)。

## 7 数据处理与结果评价

### 7.1 数据处理

可通过表格形式总结试验结果。对所有数据应采用适当的统计学方法进行评价,统计学方法应在试验设计时确定。

试验组与对照组动物的平均寿命要基本相同,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,统计分析试验结果时,应列出各组动物的平均寿命。

### 7.2 结果评价

#### 7.2.1 慢性毒性的评价

应结合前期试验结果,并考虑到毒性效应指标和解剖及病理组织学检查结果进行综合评价。毒性评价应包括受试样品染毒剂量与是否出现毒性反应、毒性反应的发生率及其程度之间的关系。这些反应包括行为或临床异常、肉眼可见的损伤、靶器官、体重变化情况、死亡效应以及其他一般或特殊的毒性作用。成功的慢性试验应能够提出在安全性评价中有意义的 NOAEL。

#### 7.2.2 致癌性评价

##### 7.2.2.1 肿瘤发生率:

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

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

##### 7.2.2.2 在分析受试样品致癌性时应注意:

- a) 不常见的肿瘤类型;
- b) 在多个部位发生肿瘤;
- c) 不同染毒途径均诱发肿瘤;
- d) 在不同种系动物或两性别动物均诱发肿瘤;
- e) 从癌前病变到癌变的进展情况;
- f) 癌前病变的潜伏期缩短;
- g) 转移;
- h) 肿瘤异常增大或增多;

- i) 恶性肿瘤的比例；
- j) 剂量-效应关系显著。

### 7.2.2.3 致癌试验阳性的判断标准：

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

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

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。

在试验中，两个性别，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致癌阴性。

## 8 评价报告

除 GBZ/T 240.1 规定的一般项目外，评价报告还应包括以下内容：

- a) 肿瘤发生的时间及其发展情况；
- b) 眼科检查结果；
- c) 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；
- d) 病理组织学检查所见的详细描述；
- e) 慢性毒性表现、靶器官、NOAEL；
- f) 数据处理和结果评价，包括肿瘤发生率、致癌性试验阳性的判断标准，对结果进行处理的统计学方法。

## 9 结果解释

慢性毒性/致癌性联合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，为人类接触化学品的安全评价限值提供依据。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，可认为该化学品对人具不具致癌性。