

14 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妆品原料的亚慢性经口毒性。

2 试验目的

在估计和评价化妆品原料的毒性时，获得受试物急性毒性资料后，还需进行亚慢性经口毒性试验。通过该试验不仅可获得一定时期内反复接触受试物后引起的健康效应、受试物作用靶器官和受试物体内蓄积能力资料，并可估计接触的无有害作用水平，后者可用于选择和确定慢性试验的接触水平和初步计算人群接触的安全性水平。

3 定义

3.1 亚慢性经口毒性 subchronic oral toxicity

是指在实验动物部分生存期内，每日反复经口接触受试物后所引起的不良反应。

3.2 未观察到有害作用的剂量水平 no observed adverse effect level(NOAEI)

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物有关的毒性作用的最大剂量。

3.3 观察到有害作用的最低剂量水平 Lowest observed adverse effect level(LOAEI)

在规定的试验条件下，受试物引起实验动物组织形态、功能、生长发育等有害效应的最低剂量。

3.4 靶器官 Target organ

实验动物出现由受试物引起的明显毒性作用的器官。

4 试验的基本原则

以不同剂量受试物每日经口给予各组实验动物，连续染毒 90d，每组采用一个染毒剂量。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，并进行尸检以及适当的病理组织学检查。

5 试验方法

5.1 实验动物和饲养环境

5.1.1 动物种系的选择

常规选择啮齿类动物，首选大鼠。一般选用 6 周—8 周龄的大鼠。动物体重的变动范围不应超出平均动物体重的 20%。若该试验为慢性试验的预备试验，则在两个试验中所用的动物种系应当相同。

5.1.2 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），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，则应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物毒性作用的数量。此外,可另设一追踪观察组,选用 20 只动物(雌雄各半),给予最高剂量受试物,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。

5.1.3 饲养环境

实验动物及实验动物房应符合国家相应规定。选用标准配合饲料,饮水不限制。

5.2 剂量分组

试验时至少要设三个染毒组和一个对照组。除不接触受试物外,对照组的其他条件均与试验组相同。最高染毒剂量的设计应在引起中毒效应的前提下又不造成动物过多死亡,否则将会影响结果的评价。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。中间剂量组应引起较轻的可观察到的毒性作用。若设多个中间剂量组,则各组的染毒剂量应引起不同程度毒性作用。在中、低剂量组和对照组中,动物死亡率应很低,以保证得到有意义的评价结论。

对那些毒性较低的物质来说,当通过饲料染毒时应特别注意确保大量的受试物混入不会对动物正常营养产生影响。对其他的染毒方式要加以特殊说明。若采用灌胃方式染毒,则每日染毒时点应相同,并定期(每周)按体重调整染毒剂量,维持单位体重染毒水平不变。

本项试验中,如果接触水平超过 1000mg/kg 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物毒性时,可以考虑不必进行三个剂量水平的全面试验观察。

5.3 试验步骤

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。实验动物随机分组。受试物可通过混入饲料或饮水、直接喂饲以及灌胃进行染毒。动物每周 7d 染毒。试验期间所有动物染毒的方式应完全相同。若为染毒目的加入其他溶剂或添加剂,这些溶剂或添加剂不应影响受试物的吸收或引起毒性作用。

5.4 临床观察

观察时间应至少为 90d。追踪观察组还要增加 28d,但不作任何处理,以了解毒性作用的可逆性、持续性及迟发毒作用。

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:皮肤和被毛的改变、眼和粘膜变化、呼吸、循环、植物神经和中枢神经系统、肢体运动和行为活动等改变。应计算每周饲料消耗量(或当通过饮水染毒时的饮水消耗量),记录每周体重变化。

5.5 临床检查

5.5.1 眼科检查

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。

5.5.2 血液检查

在染毒前、染毒中期、染毒结束及追踪观察结束时测定血球容积、血红蛋白浓度、红细胞数、白细胞总数和分类,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数等指标。

5.5.3 临床血液生化检查

在染毒前、染毒中期、染毒结束及追踪观察结束时进行,检查指标包括电解质平衡、碳水化合物代谢、肝、肾功能。可根据受试物作用形式选择其他特殊检查。推荐的指标包括:钙、磷、氯、钠、钾、禁食血糖(不同动物品系采用不同的禁食期)、血清谷丙转氨酶、血清谷草转氨酶、鸟氨酸脱羧酶、 γ 谷氨酰转肽酶、尿素氮、白蛋白、血液肌酐、总胆红素及

总血清蛋白。必要时可进行脂肪、激素、酸碱平衡、正铁血红蛋白、胆碱酯酶活性的分析测定。此外，还可根据所观察到的毒性作用进行其他更大范围的临床生化检查，以便进行全面的毒性评价。

5.5.4 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方需进行尿液检查。

5.6 病理检查

5.6.1 大体尸检

所有动物均应进行全面的大体尸检，内容包括动物的外观、所有孔道，胸腔、腹腔及其内容物。肝、肾、肾上腺、睾丸、附睾、子宫、卵巢、胸腺、脾、脑和心脏应在分离后尽快称重以防水分丢失。应将下列组织和器官保存在固定液中，以备日后进行病理组织学检查：所有大体解剖呈现异常的器官、脑（包括延髓/脑桥、小脑和大脑皮层、脑垂体）、甲状腺/甲状旁腺、胸腺、肺/气管、心脏、主动脉、唾液腺*、肝、脾、肾、肾上腺、胰、性腺、子宫、生殖附属器官*、皮肤*、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、膀胱、前列腺、有代表性的淋巴结、雌性乳腺*、大腿肌肉*、周围神经、胸骨（包括骨髓）、眼*、股骨（包括关节面）*、脊髓（包括颈部、胸部、腰部）*和泪腺*。

* 只有当毒性作用提示或作为被研究的靶器官时才需要检查这些器官。

5.6.2 病理组织学检查

应对下述器官和组织进行检查：

- (1) 所有最高剂量组和对照组动物的重要的和可能受到损伤的器官或组织，如高剂量组动物的器官或组织有病理组织学的病变，则应扩展至其他剂量组的相应的器官和组织。
- (2) 各剂量组大体解剖见有异常的器官或组织。
- (3) 其他剂量组动物的靶器官。
- (4) 在追踪观察组，应对那些在染毒组呈现毒性作用的组织和器官进行检查。

6 试验结果的评价

6.1 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、出现损伤的动物数、损伤的类型和每种损伤的动物百分比。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。

6.2 结果评价

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尸检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物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。在综合分析的基础上得出 90 天经口毒性的 LOAEL 和（或）NOAEL，为慢性毒性试验的剂量、观察指标的选择提供依据。

7 试验结果的解释

亚慢性经口毒性试验能够提供受试物在经口反复接触时的毒性作用资料。其试验结果可在很有限的程度上外推到人，但它可为确定人群的允许接触水平提供有用的信息。