

17 慢性毒性/致癌性结合试验

Combined Chronic Toxicity / Carcinogenicity Test

1 范围

本规范规定了动物慢性毒性/致癌性结合试验的基本原则、要求和方法。
本规范适用于化妆品原料的慢性毒性和致癌性的检测。

2 定义

2.1 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物所引起的不良反应。

2.2 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。

2.3 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。

2.4 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。

2.5 化学致癌物 chemical carcinogen

能引起肿瘤,或使肿瘤发生率增加的化学物。

3 原理

化学物质在体内的蓄积作用,是发生慢性中毒的基础。慢性毒性试验是使动物长期地以一定方式接触受试物引起的毒性反应的试验。

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的可能性提供资料。

4 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,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。

将受试化学物质以一定方式处理动物,在该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。

5 实验动物和饲养环境

5.1 动物种类和品系的选择

为选择合适的动物(种类和品系),应该进行有关的急性、亚急性和毒物动力学试验。在评价致癌性时常用小鼠和大鼠,而进行慢性毒性试验常用大鼠和狗。

对慢性毒性/致癌性结合试验,一般均采用大鼠,但这并不排斥使用其他种类。所选用的品系

应是对该类受试物的致癌和毒性作用敏感的。

5.2 性别和实验开始时的年龄

两种性别都应该使用，最常使用刚断奶或已断奶的年幼动物来进行慢性毒性和致癌性的长期生物学试验。

在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。

5.3 实验组的动物数

应保证试验结果的可靠性并能进行统计学处理，实验组和对照组动物，应采用随机分配的方法。

每组都应有足够的动物数用来进行详细的生物学和统计学分析。

每一个剂量组和相应的对照组至少应该有 50 只雄性和 50 只雌性的动物，不包括提前剖杀的动物数。如需观察肿瘤以外的病理变化可设附加剂量组，两种性别各 20 只动物，其相应的对照组两种性别各 10 只动物。

5.4 动物的管理、饲料和饮水

必须严格的控制环境条件和合理的动物管理措施。

实验动物及实验动物房应符合国家相应规定。

6 剂量组和给受试物的频率

为了评价致癌性试验，至少要设三个剂量组的实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，但不能明显缩短动物寿命。这些毒性反应可能表现在血清酶水平的改变，或体重增加受到轻度抑制（低于 10%）。

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。一般不应低于高剂量的 10%。

中剂量应界于高剂量和低剂量之间，可根据化学物的毒代动力学性质来确定。

结合慢性毒性试验，应附加一个实验组和相应的对照组。最高剂量应能产生明显的毒性。

一般每天给予受试物。如果所给的化学物质是混在饮水中或饲料中，应保证连续给予。给受试物的频率也可以按其毒代动力学变化进行调整。

应设相应的对照组，除不接触受试物外，其他条件应和实验组相同。

7 给受试物的途径

经口，经皮，吸入是三种主要给受试物途径。选择何种途径要根据受试物的理化特性和对人有代表性的接触方式。

给受试物的频率按所选择的给予途径和方式可以有所不同，如有可能，应按照受试物的毒代动力学变化进行调整。

7.1 经口染毒

如果受试物是通过胃肠道吸收的则最好选用经口途径。按试验期限（9）中指明的试验期限，把受试物混入饲料中、溶于饮水中，或用管饲法连续给予动物。每周 7 天均给予受试物，中断染毒可使动物得到恢复或毒性缓解，从而影响结果及以后的评价。

7.2 经皮染毒

选择皮肤接触方式是用于模仿人接触有关物质的一个主要途径，并作为诱发皮肤病变的试验模型。有关诱导皮肤肿瘤的特殊试验在本方法中不作介绍。

7.3 吸入染毒

吸入方式不是化妆品主要接触途径，因此吸入染毒本方法不作介绍。

8 试验期限

在附加组中 20 只实验动物/每性别和 10 只相应对照组动物/每性别至少应该维持到 12 个月。

这些动物的剖杀，应是用于评价和受试物有关的，但并非老年性改变所导致的病理变化。致癌性试验的期限必须包括受试物正常生命期的大部分时间。

确定试验期限的几条准则：

(1) 一般情况下，试验结束时间对小鼠和仓鼠应在 18 个月，大鼠在 24 个月；然而对某些生命期较长的或自发肿瘤率低的动物品系，小鼠和仓鼠可在 24 个月，大鼠可在 30 个月。

(2) 当最低剂量和对照组存活动物只有 25% 时，也可以结束试验。对于有明显性别差异的试验，则其结束的时间对不同的性别应有所不同。在某种情况下因明显的毒性作用只造成高剂量组动物过早死亡，此时不应结束试验。

9 临床观察和检查

9.1 观察

至少每天进行一次动物情况的检查。每天还应有数次有目的的观察，如剖检死亡动物或存入冰箱，将有病或垂死的动物分开或处死。及时发现所有的毒性作用的开始及其变化，并能减少因疾病、自溶或被同类所食造成的动物损失。

详细记录动物的症状包括神经系统和眼睛的改变，可疑肿瘤在内的所有毒性作用出现和变化的时间，以及死亡情况。

在试验的前 13 周内，每周称量体重一次，以后每 4 周称量一次。在试验的前 13 周内，每周检查一次动物的食物摄取情况，以后如动物健康状况或体重无异常改变，则每 3 个月检查一次。

9.2 血液学检查

血液学检查（血红蛋白含量，血球压积，红血球计数，白血球计数，血小板，或其他血凝试验）应在 3 个月，6 个月，以后每隔 6 个月及实验结束时进行，各组每个性别要检查 20 只大鼠。每次采集的血标本应来自相同的大鼠。最高剂量组和对照组大鼠应在同样的时间间隔内进行白血球分类计数，中等剂量组大鼠只是在必要时才做。

在试验期间，如果大体观察表明动物健康恶化，应对有关动物进行血球分类计数检查。高剂量和对照组动物要进行血球分类计数。如两组间有很大差异时，应对较低剂量组的动物进行血球分类计数。

9.3 尿分析

收集各组每性别 10 只大鼠尿样进行分析，最好是在做血液检查的同时并取自同一大鼠。应测下列指标，可单个进行，也可每组相同性别的尿标本混在一起测定。

分析指标：外观；每个动物的尿量和比重；蛋白，糖，酮体，潜血（半定量）；沉淀物镜检（半定量）。

9.4 临床化学

每 6 个月及实验结束时，收集各组每性别的 10 只大鼠的血液标本进行临床化学检查，尽可能在各个时间间隔内采取相同的大鼠血标本。分离血浆，进行下列指标测定：

总蛋白浓度；白蛋白浓度；肝功能试验（如碱性磷酸酶，谷丙转氨酶，谷草转氨酶， γ 谷氨酰转肽酶，鸟氨酸脱羧酶）；糖代谢，如糖耐量；肾功能，如血尿素氮。

9.5 病理检查

肉眼和病理检查常常是慢性/致癌性结合试验的基础。

9.5.1 肉眼剖检

所有的动物包括那些在实验过程中死亡或因处于垂死状态而被处死的，应进行肉眼检查。在所有动物被处死前，应收集血样品进行血球分类计数。保存所有肉眼可见的肿瘤或可疑为肿瘤的。所有的器官或组织都应保留以进行镜下检查。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*，生殖附属器官，乳腺，皮肤，肌肉，外周神经，脊髓（颈，胸，腰），胸骨或股骨（包括关节）和眼。肺和膀胱用固定剂填充能更好地保存组织。

9.5.2 组织病理检查

所有肉眼可见的肿瘤和其他病变都应进行病理检查。此外还要注意下列方面：

（1）对所有保存的器官和组织进行镜下检查，详细描述发现的所有病变。

①包括实验过程中死亡或处死的动物。

②所有最高剂量组和对照组动物。

（2）在较低剂量组，由受试物引起或可能由受试物引起异常的器官或组织也应进行检查。

*啮齿动物每组每性别 10 只，非啮齿动物全部标有*号的器官包括甲状腺及甲状旁腺都应称重。

10 数据处理和结果评价

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、合理的统计学方法进行评价，统计学方法应在试验设计时确定。

慢性毒性与致癌合并试验应结合前期试验结果，并考虑到毒性效应指标和解剖及组织病理学检查结果进行综合评价。结果评价应包括受试物慢性毒性的表现、剂量-反应关系、靶器官、可逆性，得出慢性毒性相应的 NOAEL 和（或）LOAEL。

10.1 肿瘤发生率

肿瘤的发生率是整个实验终了时患瘤动物总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。必要时根据试验中动物死亡率来调整计算致癌率，计算方法可参考有关文献。

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

10.2 致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）肿瘤只发生在染毒组动物中，对照组无该类型肿瘤；
- （2）染毒组与对照组动物均发生肿瘤，但剂量组发生率明显增高；
- （3）染毒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）染毒组与对照组动物肿瘤的发生率无显著性差异，但染毒组中肿瘤发现的时间较早。

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该受试物的致癌试验为阳性结果。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，不能轻易否定受试物的致癌性。

10.3 致癌试验阴性结果的确立

假如动物实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，实验组肿瘤发生率与对照组无差异，才算阴性结果。