

附件 9

28 天重复剂量吸入毒性试验方法

28-Day Inhalation Toxicity Study

1 范围

本规范规定了啮齿类动物 28 天重复剂量吸入毒性试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于单一物质化妆品原料的 28 天重复剂量吸入毒性的评价。

2 试验目的

对于有短期反复吸入暴露可能的化妆品原料，需进行 28 天重复剂量吸入毒性试验。通过该试验不仅可获得一定时期内反复吸入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，并可估计吸入的无有害作用水平，后者可用于人群吸入的定量风险评估。

3 定义

3.1 28 天重复剂量吸入毒性 28-day inhalation toxicity

是指在有限时间（28 d）内，每日或反复多次通过吸入途径接触受试物后所引起的不良反应。

3.2 气溶胶 aerosol

悬浮在空气中具有可以忽略下降速度/沉降速度的固态、液态或固液态混合颗粒状物质。

3.3 空气动力学直径 aerodynamic equivalent diameter(AD)

用以描述气溶胶颗粒的大小。当气溶胶颗粒与不同直径标准单位密度（ 1.0 g/cm^3 ）球形颗粒中某一颗粒的终端沉降速度相同时，该标准球形颗粒的直径即为空气动力学直径。其计量单位为 μm 。

3.4 空气动力学质量中位数直径 mass median aerodynamic diameter(MMAD)

气溶胶中小于和等于某一空气动力学直径的颗粒总质量，占全部颗粒物质量 50%时，该直径即为空气动力学质量中位数直径。

3.5 几何标准差 geometric standard deviation(GSD)

用以描述气溶胶颗粒大小的分布状态。以撞击器各级累积百分比为 Y 轴、粒径为 X 轴拟合对数概率曲线，以累积百分比 84.1%对应的粒径除以累积百分比 50%的粒径，即为几何标准差。

3.6 理论浓度 nominal concentration

制备气溶胶消耗受试物的量除以通过暴露系统的空气总体积。

3.7 实际浓度 analytical concentration

暴露系统中动物呼吸区经采样分析获得的气溶胶浓度。

3.8 口鼻暴露 nose-only

即仅头部、鼻部、鼻口部暴露的暴露模式，试验过程中将动物置于相应固定器内进行吸入暴露。

3.9 全身暴露 whole-body

将动物置于封闭的染毒柜或腔体内进行吸入暴露的暴露模式。

3.10 未观察到有害作用的浓度水平 no observed adverse effects concentration (NOAEC)

在规定的吸入试验条件下，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浓度。

3.11 观察到有害作用的最低浓度水平 lowest observed adverse effects concentration (LOAEC)

在规定的吸入试验条件下，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浓度。

4 试验的基本原则

在 28 d 的染毒期内，以受试物不同暴露浓度吸入给予各组实验动物，每周染毒 5 d 或 7 d，每组采用一个吸入浓度染毒。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称重和尸检。染毒结束后，处死存活动物，进行尸检、临床检查、支气管肺泡灌洗检查以及适当的病理组织学检查，以评估受试物产生的吸入毒性作用。

5 试验方法

5.1 受试物

受试物可分为气态受试物、沸点较低易挥发的液态受试物、高沸点不易挥发液态受试物、粉状或固体受试物。试验时将受试物制备成何种物态（气体、蒸气、气溶胶）取决于受试物的理化性质、设定的浓度和/或按照实际加工使用期间的物理状态等。吸湿性的及会发生化

学反应的受试物，在试验中需保证所用空气干燥，某些受试物经超声雾化时会产热，应注意选择适合的发生装置。

5.2 实验动物和饲养环境

5.2.1 动物种系的选择

常规选择啮齿类动物，首选大鼠。一般选用 7 周~9 周龄的成年大鼠。试验开始时动物体重的差异应不超过平均体重的±20%。实验动物应符合国家相应规定。

5.2.2 动物的性别和数量

每一浓度组及阴性（溶媒）对照组实验动物至少应有 20 只（雌雄各半）。其中主试验组 10 只，追踪观察组 10 只。

考虑到重复剂量吸入毒性试验的重要性，应适当增加每组动物数。若计划在试验过程中处死动物观察毒性反应，应增加计划处死的动物数。若考虑在试验期间增加影响动物健康的试验操作（如毒代动力学研究等），则应另设卫星组，增加相应动物数仅用于满足这部分的研究需要，并不进行毒理学评价。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。追踪观察组动物在全程染毒结束后继续观察一段时间（一般不少于 14 d），以了解毒性作用的持续性、可逆性或迟发毒作用。

5.2.3 试验前动物准备

染毒开始前至少要有 5 d 时间使实验动物适应实验室饲养环境。如动物拟采用口鼻暴露方式染毒，动物还需提前适应口鼻暴露时所用的固定器。

5.2.4 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。

当动物吸入染毒时间超过 6 h，则需在染毒期间以适合方式给动物喂食，并提供饮水。当动物采用全身暴露方式染毒时，每只动物在暴露期间应处在独立的空间，以防止动物聚集趴卧，其被毛吸附受试物气溶胶，影响动物吸入受试物的量。

5.3 分组

试验通常包括三个暴露水平的受试物和一个阴性/溶媒对照。阴性/溶媒对照组动物暴露于洁净空气或溶媒，溶媒应尽可能采用水，采用其他溶媒进行试验时，应根据文献报道或预试验确认所采用溶媒无吸入毒性，否则应同时设立阴性对照组和溶媒对照组，对照组的其他条件均与受试物组相同。最大吸入暴露水平的设计应在引起中毒效应的前提下又不致造成动物过多死亡，低暴露水平组应不低于人群的实际吸入暴露水平，且不出现任何毒性作用，中间暴露水平组应引起较轻的可观察到的毒性作用。

吸入试验中动物暴露水平通常以吸入暴露量表述，当受试物发生后为气溶胶时，动物吸入的气溶胶的量可根据试验周期中测得气溶胶浓度、每分钟通气量、暴露时间计算求得。计算公式如下：

$$DD = C \times RMV \times D / BW$$

$$RMV = 0.608 \times BW^{0.852}$$

式中：DD为吸入暴露量（mg/Kg）；C为吸入气溶胶浓度（mg/L）；RMV为动物每分钟通气量（L/min），D为暴露时间（min），BW为平均体重（kg）。

每分钟通气量可采用实际检测动物的每分钟通气量计算。也可以动物平均体重代入经验公式得出动物理论每分钟通气量。

5.4 吸入暴露条件

5.4.1 吸入暴露方式

首选的暴露方式为口鼻暴露，为满足特定的研究目的（如便于染毒中观察动物反应），也可采用全身暴露方式染毒，但应在试验报告中予以阐释说明。

采用口鼻暴露方式染毒时，所选用的固定器应不对动物产生额外的应激，应注意与动物体重大小匹配，并确保动物在暴露过程中无法避开吸入染毒气流。吸入装置应配备动态气流，其通风量至少应超过装置里动物总换气量的两倍，氧含量应不低于 19%，二氧化碳含量低于 1%，并保证每只动物暴露条件稳定均一。如果进入暴露系统的空气体积小于流出体积时，应防止空气经其他途径进入暴露系统使受试物气溶胶稀释。染毒过程中应使装置内保持轻度负压，防止受试物泄露到外部环境中。

采用全身暴露方式染毒时，吸入装置需配备动态气流，每小时换气约 12 次~15 次，应保证染毒柜内氧含量不低于 19%，二氧化碳含量低于 1%，染毒柜内应密闭，以防止受试物泄露到外部环境中。为保证受试物气溶胶均匀分散，实验动物所占的总体积应不超过染毒柜体积的 5%。

5.4.2 吸入暴露浓度

受试物通常设定三个吸入暴露浓度进行试验。若没有足够的信息指导受试物暴露浓度设定，应采用预试验得到尽可能多的受试物毒性信息，为正式试验的受试物吸入浓度设定提供依据。在缺乏限值数据支持的情况下，可参考全球化学品统一分类和标签制度（GHS）第 4 类的上限值，将气溶胶最大浓度设为 5 mg/L，蒸气的最大浓度设为 20 mg/L，气体最大浓度设为 20000 ppm。

5.4.3 吸入染毒频率

染毒期间，动物每日吸入染毒 1 次，每周吸入染毒 5 d 或 7 d。

5.4.4 吸入染毒时间

原则上，各组动物吸入染毒时间应一致，当采用调整吸入染毒时间来区分各组暴露水平时，各组吸入染毒时间相差不应太长，否则需要考察染毒时间不一致对动物的影响。采用口鼻暴露方式时，大鼠的吸入染毒时间应不超过 6 h，小鼠的吸入染毒时间应不超过 4 h。采用全身暴露方式时，动物的染毒时间应不少于 6 h，最长不超过 22 h。如确需超过上述时间限制，应在试验报告中予以阐释说明。

5.5 暴露条件的监测

5.5.1 浓度监测

试验期间为保证实际浓度的稳定性，可以使用实时监测设备（如气溶胶光度计），或定期通过特异性的方法（如采用撞击器吸附或化学反应的原理直接采样，然后进行化学分析），或非特异性的方法如滤膜采样法来测定呼吸区或染毒柜内气溶胶浓度，以证明暴露条件的稳定性。浓度波动范围规定：气体或挥发性受试物不得超过平均浓度 $\pm 10\%$ ；液体或固体气溶胶不得超过平均值的 $\pm 20\%$ 。

5.5.2 粒径监测

气溶胶颗粒的空气动力学粒径决定了在重力作用下颗粒在呼吸道中的沉降情况；气溶胶颗粒空气动力学直径的几何标准差（GSD）代表气溶胶粒度分布范围，其值越大代表粒子分布较广。为了使动物整个呼吸道充分暴露于受试物中，推荐的气溶胶颗粒空气动力学中值直径（MMAD）数值应不大于 $2\ \mu\text{m}$ ，GSD 通常应介于 1~3 之间。可采用基于质量检测的碰撞法，基于激光飞行法的光学方法或其它替代方法定期对呼吸区或染毒柜中的气溶胶粒径进行测定，并计算 GSD 值。如在整个试验周期中采用替代方法进行粒径分析时，需验证替代方法所得结果与碰撞法一致。

5.5.3 暴露装置内气流

通过染毒柜或口鼻暴露系统的气流速率需严格控制，应在每次暴露期间尽可能连续监测并每小时记录 1 次。

5.5.4 暴露系统内环境监测

暴露系统内温度维持在 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，口鼻暴露和全身暴露系统都需监测记录动物呼吸区的相对湿度，应在每次暴露期间尽可能连续监测并每小时记录 1 次。理想的相对湿度一般在 30%~70%，但在某些情况下，可能无法达到（例如在测试水溶液型受试物时），应在试验报告中予以阐释说明。氧气的浓度不低于 19%，二氧化碳的浓度不超过 1%。

5.6 临床观察

染毒期间应每天观察，染毒结束后，追踪观察组还应继续观察至追踪观察期结束。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、肢体运动和行为模式等改变。可通过测量直肠温度为反射性呼吸迟缓、C-纤维刺激反射、受试物暴露或密闭引起的动物体温变化（低温/高热）提供依据。应在首次染毒前（第 0 天）记录动物体重，此后每周 2 次测定动物体重，如前 2 周发现染毒对动物体重没有影响，则可在剩余的研究中每周 1 次测定动物体重。应测定每周饲料消耗量。还可根据研究需要，增加其他观察指标，如生物监测（尿液/粪便收集）、肺功能评估和行为学分析等。

5.7 临床检查

5.7.1 眼科检查

在染毒前，应对所有动物的眼底、屈光介质、虹膜和结膜进行眼科检查。并在末次染毒后及追踪观察期结束时对所有高浓度组和对照组进行检查，如果发现眼睛有变化，则应扩展至其他浓度组及卫星组的所有动物。

5.7.2 血液检查

在染毒结束及追踪观察期结束时测定各浓度组和对照组动物的红细胞计数、血红蛋白、红细胞容积、平均红细胞容积、平均红细胞血红蛋白、平均红细胞血红蛋白浓度、网织红细胞计数、白细胞计数及其分类、血小板计数，凝血潜力（如凝血酶原时间、凝血时间、活化部分凝血活酶时间，至少测定一项）等指标。

5.7.3 临床血液生化检查

在染毒结束及追踪观察期结束时对各浓度组和对照组动物进行，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。检测指标包括：氯、钠、钾、钙、磷、禁食血糖（不同动物品系采用不同的禁食期）、天门冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、尿素氮、白蛋白、肌酐、总胆红素、总蛋白、球蛋白、总胆固醇及甘油三酯。必要时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，检测指标可包括胆碱酯酶、脂质、激素、酸碱平衡、甲基苯丙胺或亨氏体、肌酸激酶、骨髓细胞学、肌钙蛋白、乳酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶或 γ 谷氨酰转肽等。

5.7.4 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方需进行尿液检查。常规指标包括：外观（颜色和浊度）、尿量、比重或渗透压、酸碱度、尿糖、尿蛋白、潜血。

5.7.5 支气管肺泡灌洗（bronchoalveolar lavage, BAL）检查

在染毒结束及追踪观察期结束时进行，解剖各浓度组和对照组动物取肺脏，整肺称重后结扎左肺用于组织病理学检查，右肺进行 BAL 检查，BAL 液推荐检查指标包括：乳酸脱氢酶、总蛋白或白蛋白及肺泡巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的计数和分类。必要时分析碱性磷酸酶、炎症相关细胞因子/趋化因子等参数。对于难溶性固体气溶胶受试物，追踪观察期结束雄性动物右肺如需用于肺负荷的测定，可仅对雌性动物右肺进行 BAL 检查。BAL 液分析通常作为组织病理学检查的结果的补充，但不能替代组织病理学检查。

5.7.6 其他检查指标

如果认为有助于了解受试物的吸入毒性（包括恢复），可根据研究需要，增加额外的检测指标，如肺负荷，血氧分析等。

肺负荷：对于难溶性固体受试物，通常采用卫星组的形式，在吸入染毒结束 24 h 内及染毒结束后数周的另外 2 个时间点，取右肺测定肺组织中的受试物含量，通常选用雄性动物。

血氧分析：一般在吸入染毒结束后即刻采样，检测指标有高铁血红蛋白、一氧化碳结合血红蛋白等。

5.8 病理检查

5.8.1 大体尸检

主试验组和追踪观察组动物及试验期间非计划死亡或濒死动物均应尽可能取血后,进行全面的大体尸检,记录每只动物外观、所有孔道,胸腔、腹腔及其内容物的大体病理变化,特别注意呼吸道的任何变化。肺、肝、肾、肾上腺、睾丸、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)、嗅球、眼(视网膜、视神经)及眼睑、脊髓(包括颈椎、胸椎、腰椎)、鼻咽组织(至少4层,1层包括鼻咽管和鼻腔相关淋巴组织)、喉(包括会厌基底层在内的3层)、气管(至少2层,包括1个通过肺外支气管分叉处隆凸的纵切面和1个横切面)、甲状腺、胸腺、左肺(包括主支气管和胸膜)^a、心脏、肝、脾、肾、肾上腺、睾丸、精囊、卵巢、子宫、食管、胃、膀胱、骨髓(和/或新鲜抽取物)、肺门淋巴结^b(特别是对于难溶性固体受试物)和淋巴结(给药部位远端)。

^a也可使用右肺。

^b如需进行更深入的检查和/或以免疫学为重点的研究,可考虑使用其他淋巴结,如来自后纵隔、颈内淋巴结、窦旁淋巴结、后颈淋巴结、耳淋巴结和/或颈/下颌淋巴结。

5.8.2 病理组织学检查

应对下述器官和组织进行检查:

- (1) 所有最高浓度组和对照组动物的重要的和可能受到损伤的器官或组织,如高浓度组动物的器官或组织有病理组织学的病变,则应扩展至其他浓度组的相应的器官和组织。
- (2) 试验过程中非计划死亡动物的重要的和可能受到损伤的器官或组织。
- (3) 各浓度组大体解剖见有异常的器官或组织。
- (4) 其他浓度组动物的靶器官。
- (5) 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 数据处理

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

28天重复剂量吸入毒性试验结果应结合其他试验结果(如急性吸入毒性等),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吸入暴露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重复剂量吸入毒性的 LOAEC 和（或）NOAEC，为人群吸入的定量风险评估提供依据。

7 试验结果的解释

28 天重复剂量吸入毒性试验能够提供受试物短期经呼吸系统反复吸入接触引起的毒性作用资料，也可作为 90 天重复剂量吸入毒性试验中受试物的剂量选择提供依据。其试验结果可在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。