



中华人民共和国国家标准

GB 15193.17—2015

食品安全国家标准 慢性毒性和致癌合并试验

2015-08-07 发布

2015-10-07 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准代替 GB 15193.17—2003《慢性毒性和致癌试验》。

本标准与 GB 15193.17—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 慢性毒性和致癌合并试验”;
- 修改和调整了总体体例结构;
- 修改了标准适用范围;
- 增加了“最小观察到有害作用剂量”、“最大耐受剂量”和“卫星组”的术语和定义,修改了“最大未观察到有害作用剂量”、“慢性毒性”、“致癌性”和“靶器官”的术语和定义;
- 修改了对试验目的和原理的表述;
- 增加了“仪器和试剂”内容;
- 修改了对“实验动物”的要求,增加“动物准备”和“动物饲养”内容;
- 修改了“剂量及分组”的要求;
- 增加了受试物经灌胃、掺入饲料或饮水给予的具体要求;
- 修改了“试验期限”内容;
- 修改了对试验观察指标(一般观察、血液学检查、血生化检查、病理学检查)的要求,增加体重、摄食量及饮水量、眼部检查、尿液检查和其他指标内容;
- 删除了“资料搜集”内容;
- 修改了“数据处理”内容,增加了“结果评价”内容;
- 修改和增加了对试验报告的要求;
- 增加了“试验的解释”内容。

食品安全国家标准

慢性毒性和致癌合并试验

1 范围

本标准规定了慢性毒性和致癌合并试验的基本试验方法和技术要求。

本标准适用于评价受试物的慢性毒性和致癌性作用。

2 术语和定义

2.1 慢性毒性

实验动物经长期重复给予受试物所引起的毒性作用。

2.2 致癌性

实验动物经长期重复给予受试物所引起的肿瘤(良性和恶性)病变发生。

2.3 未观察到有害作用剂量

通过动物试验,以现有的技术手段和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。

2.4 最小观察到有害作用剂量

在规定的条件下,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小作用剂量。

2.5 靶器官

实验动物出现由受试物引起明显毒性作用的器官。

2.6 最大耐受剂量

由 90 天经口毒性试验确定的剂量,此剂量应使动物体重减轻不超过对照组的 10%,并且不产生由非肿瘤因素引起的死亡及导致缩短寿命的中毒体征或病理损伤。

2.7 卫星组

毒性研究设计和实施中外加的动物组,其处理和饲养条件与主要研究的动物相似,用于试验中期或试验结束恢复期观察和检测,也可用于不包括在主要研究内的其他指标及参数的观察和检测。

3 试验目的和原理

确定在实验动物的大部分生命期间,经口重复给予受试物引起的慢性毒性和致癌效应,了解受试物慢性毒性剂量-反应关系、肿瘤发生率、靶器官、肿瘤性质、肿瘤发生时间和每只动物肿瘤发生数,确定慢性毒性的未观察到有害作用剂量(NOAE)和最小观察到有害作用剂量(LOAE),为预测人群接触该受试物的慢性毒性和致癌作用以及最终评定该受试物能否应用于食品提供依据。

4 仪器和试剂

4.1 仪器与器械

实验室常用解剖器械、动物天平、电子天平、生物显微镜、生化分析仪、血细胞分析仪、血液凝固分析仪、尿液分析仪、离心机、切片机等。

4.2 试剂

甲醛、二甲苯、乙醇、苏木素、伊红、石蜡、血球稀释液、生化试剂、血凝分析试剂、尿分析试剂等。

5 试验方法

5.1 受试物

受试物应使用原始样品,若不能使用原始样品,应按照受试物处理原则对受试物进行适当处理。将受试物掺入饲料、饮用水或灌胃给予。

5.2 实验动物

5.2.1 动物选择

实验动物的选择应符合国家标准和有关规定(GB 14923、GB 14922.1、GB 14922.2)。应选择肿瘤自发病率低的动物种属和品系,首选大鼠,一般周龄 6 周~8 周。试验开始时每个性别动物体重差异不应超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。每组动物数至少 120 只(包括慢性毒性试验 20 只,致癌试验 100 只),雌雄各半,雌鼠应为非经产鼠、非孕鼠。若计划试验中期剖检或慢性毒性试验结束做恢复期的观察(卫星组),应增加动物数(中期剖检每组至少 20 只,雌雄各半,慢性毒性试验期限通常为 12 个月,其数据可作为致癌试验的中期剖检数据;卫星组通常仅增加对照组和高剂量组,每组至少 20 只,雌雄各半)。对照组动物性别和数量应与受试物组相同。

5.2.2 动物准备

试验前动物在实验动物房应至少进行 3 d~5 d 环境适应和检疫观察。

5.2.3 动物饲养

实验动物饲养条件、饮用水、饲料应符合国家标准和有关规定(GB 14925、GB 5749、GB 14924.1、GB 14924.2、GB 14924.3)。试验期间动物自由饮水和摄食,可按组分性别分笼群饲,每笼动物数(一般不超过 3 只)应满足实验动物最低需要的空间,以不影响动物自由活动和观察动物的体征为宜。试验期间每组动物非试验因素死亡率应小于 10%,濒死动物应尽可能进行血液生化指标检测、大体解剖以及病理组织学检查,每组生物标本损失率应小于 10%。

5.3 剂量及分组

5.3.1 试验至少设 3 个受试物组、1 个阴性(溶媒)对照组,对照组除不给予受试物外,其余处理均同受试物组。必要时增设未处理对照组。

5.3.2 高剂量应选择最大耐受剂量,原则上应使动物出现比较明显的毒性反应,但不引起过高死亡率;低剂量不引起任何毒性效应;中剂量应介于高剂量与低剂量之间,可引起轻度的毒性效应。一般剂量的组间距以 2 倍~4 倍为宜,不超过 10 倍。

5.4 试验期限

5.4.1 慢性毒性试验试验期限至少 12 个月,卫星组监测由受试物引起的任何毒性改变的可逆性、持续性或延迟性作用,停止给受试物后观察期限不少于 28 d,不多于试验期限的 1/3。致癌试验试验期限为 24 个月,个别生命期较长和自发性肿瘤率较低的动物可适当延长。

5.4.2 试验期间,当最低剂量组或对照组存活的动物数仅为开始时的 25%时(雌、雄性动物分别计算),可及时终止试验。高剂量组动物因明显的受试物毒性作用出现早期死亡,不应终止试验。

5.5 试验步骤和观察指标

5.5.1 受试物给予

5.5.1.1 根据受试物的特性和试验目的,选择受试物掺入饲料、饮水或灌胃方式给予。若受试物影响动物适口性,应灌胃给予。

5.5.1.2 受试物灌胃给予,要将受试物溶解或悬浮于合适的溶媒中,首选溶媒为水,不溶于水的受试物可使用植物油(如橄榄油、玉米油等),不溶于水或油的受试物可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液或糊状物等。受试物应现用现配,有资料表明其溶液或混悬液储存稳定者除外。同时应考虑使用的溶媒可能对受试物被机体吸收、分布、代谢和蓄积的影响;对受试物理化性质的影响及由此而引起的毒性特征的影响;对动物摄食量或饮水量或营养状况的影响。为保证受试物在动物体内浓度的稳定性,每日同一时段灌胃 1 次(每周灌胃 6 d),试验期间,前 4 周每周称体重 2 次,第 5 周~第 13 周每周称体重 1 次,之后每 4 周称体重 1 次,按体重调整灌胃体积。灌胃体积一般不超过 10 mL/kg 体重;如为油性液体,灌胃体积应不超过 4 mL/kg 体重。各组灌胃体积一致。

5.5.1.3 受试物掺入饲料或饮水给予,要将受试物与饲料(或饮水)充分混匀并保证该受试物配制的稳定性和均一性,以不影响动物摄食、营养平衡和饮水量为原则。饲料中加入受试物的量很少时,宜先将受试物加入少量饲料中充分混匀后,再加入一定量饲料混匀,如此反复 3 次~4 次。受试物掺入饲料比例一般小于质量分数的 5%,若超过 5%时(最大不应超过 10%),可调整对照组饲料营养素水平(若受试物无热量或营养成分,且添加比例大于 5%时,对照组饲料应填充甲基纤维素等,掺入量等同高剂量),使其与受试物各剂量组饲料营养素水平保持一致,同时增设未处理对照组;也可视受试物热量或营养成分的状况调整剂量组饲料营养素水平,使其与对照组饲料营养素水平保持一致。受试物剂量单位是每千克体重所摄入受试物的毫克(或克)数,即 mg/kg 体重(或 g/kg 体重),受试物掺入饲料的剂量单位也可表示为 mg/kg(或 g/kg)饲料,掺入饮水则表示为 mg/mL 水。受试物掺入饲料时,需将受试物剂量(mg/kg 体重)按动物每 100 g 体重的摄食量折算为受试物饲料浓度(mg/kg 饲料)。

5.5.2 一般观察

5.5.2.1 试验期间至少每天观察 1 次动物的一般临床表现,并记录动物出现中毒的体征、程度和持续时间及死亡情况。观察内容包括被毛、皮肤、眼、黏膜、分泌物、排泄物、呼吸系统、神经系统、自主活动(如:流泪、竖毛反应、瞳孔大小、异常呼吸)及行为表现(如步态、姿势、对处理的反应、有无强直性或阵挛性活动、刻板反应、反常行为等)。

5.5.2.2 应特别注意肿瘤的发生,记录肿瘤发生时间、发生部位、大小、形状和发展等情况。

5.5.2.3 对濒死和死亡动物应及时解剖并尽量准确记录死亡时间。

5.5.3 体重、摄食量及饮水量

试验期间前 13 周每周记录动物体重、摄食量或饮水量(当受试物经饮水给予时),之后每 4 周 1 次。试验结束时,计算动物体重增长量、总摄食量、食物利用率(前 3 个月)、受试物总摄入量。

5.5.4 眼部检查

试验前,对动物进行眼部检查(角膜、球结膜、虹膜),试验结束时,对高剂量组和对照组动物进行眼部检查,若发现高剂量组动物有眼部变化,则应对其他组动物进行检查。

5.5.5 血液学检查

5.5.5.1 试验第3个月、第6个月和第12个月进行血液学检查,必要时,试验第18个月和试验结束时也可进行,每组至少检查雌雄各10只动物,每次检查应尽可能使用同一动物。如果90天经口毒性试验的剂量水平相当且未见任何血液学指标改变,则试验第3个月可不检查。

5.5.5.2 检查指标包括白细胞计数及分类(至少三分类)、红细胞计数、血小板计数、血红蛋白浓度、红细胞压积、红细胞平均容积(MCV)、红细胞平均血红蛋白量(MCH)、红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)等。如果对造血系统有影响,应加测网织红细胞计数和骨髓涂片细胞学检查。

5.5.6 血生化检查

5.5.6.1 按5.5.5.1规定的时间和动物数进行。如果90天经口毒性试验的剂量水平相当且未见任何血生化指标改变,则试验第3个月可不检查。采血前宜将动物禁食过夜。

5.5.6.2 检查指标包括电解质平衡,糖、脂和蛋白质代谢,肝(细胞、胆管)肾功能等方面。至少包含丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转肽酶(GGT)、尿素(Urea)、肌酐(Cr)、血糖(Glu)、总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、钙、氯、钾、钠、总胆红素等,必要时可检测磷、尿酸(UA)、总胆汁酸(TBA)、球蛋白、胆碱酯酶、山梨醇脱氢酶、高铁血红蛋白、特定激素等指标。

5.5.7 尿液检查

5.5.7.1 试验第3个月、第6个月和第12个月进行尿液检查,必要时,试验第18个月及试验结束时也可进行,每组至少检查雌雄各10只动物。如果90天经口毒性试验的剂量水平相当且未见任何尿液检查结果异常,则试验第3个月可不检查。

5.5.7.2 检查项目包括外观、尿蛋白、相对密度、pH、葡萄糖和潜血等,若预期有毒反应指征,应增加尿液检查的有关项目,如尿沉渣镜检、细胞分析等。

5.5.8 病理检查

5.5.8.1 大体解剖

所有试验动物,包括试验过程中死亡或濒死而处死的动物及试验期满处死的动物都应进行解剖和全面系统的肉眼观察,包括体表、颅、胸、腹腔及其脏器,并称量脑、心脏、肝脏、肾脏、脾脏、子宫、卵巢、睾丸、附睾、胸腺、肾上腺的绝对重量,计算相对重量[脏/体比值和(或)脏/脑比值],必要时还应选择其他脏器,如甲状腺(包括甲状旁腺)、前列腺等。

5.5.8.2 组织病理学检查

5.5.8.2.1 组织病理学检查的原则(重点检查肿瘤和癌前病变):

- 先对高剂量组和对照组动物所有固定保存的器官和组织进行组织病理学检查;
- 发现高剂量组病变后再对较低剂量组相应器官和组织进行组织病理学检查;
- 对大体解剖检查肉眼可见的病变器官和组织进行组织病理学检查;

- d) 试验过程中死亡或濒死而处死的动物,应对全部保存的组织 and 器官进行组织病理学检查;
- e) 成对的器官,如肾、肾上腺等,两侧器官均应进行组织病理学检查。

5.5.8.2.2 应固定保存以供组织病理学检查的器官和组织包括唾液腺、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、肝脏、胰腺、脑(包括大脑、小脑和脑干)、垂体、坐骨神经、脊髓(颈、胸和腰段)、肾上腺、甲状旁腺、甲状腺、胸腺、气管、肺、主动脉、心脏、骨髓、淋巴结、脾脏、肾脏、膀胱、前列腺、睾丸、附睾、子宫、卵巢、乳腺等。必要时可加测精囊腺和凝固腺、副泪腺、任氏腺、鼻甲、子宫颈、输卵管、阴道、骨、肌肉、皮肤和眼等组织器官。应有组织病理学检查报告,病变组织给出病理组织学照片。

5.5.9 其他指标

必要时,根据受试物的性质及所观察的毒性反应,增加其他指标(如神经毒性、免疫毒性、内分泌毒性指标)。

6 数据处理和结果评价

6.1 数据处理

6.1.1 应将所有的数据和结果以表格形式进行总结,列出各组试验开始前的动物数、试验期间动物死亡数及死亡时间、出现肿瘤及其他毒性反应的动物数,描述肿瘤发生部位、数量、性质、癌前病变及肿瘤潜伏期,描述所见的其他毒性反应,包括出现毒效应的时间、持续时间及程度。

6.1.2 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发现肿瘤时存活动物总数。

肿瘤发生率的计算见式(1):

$$\text{肿瘤发生率} = \frac{\text{试验结束时患肿瘤动物数}}{\text{有效动物总数}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

6.1.3 肿瘤潜伏期即从摄入受试物起到发现肿瘤的时间。因为内脏肿瘤不易觉察,通常将肿瘤引起该动物死亡的时间定为发生肿瘤的时间。

6.1.4 对动物体重、摄食量、饮水量(受试物经饮水给予)、食物利用率、血液学指标、血生化指标、尿液检查指标、脏器重量、脏/体比值和(或)脏/脑比值、大体和组织病理学检查、患肿瘤的动物数、每只动物肿瘤发生数、各种肿瘤(良性和恶性)的数量、肿瘤发生率及肿瘤潜伏期等结果进行统计学分析。一般情况,计量资料采用方差分析,进行受试物各剂量组与对照组之间均数比较,分类资料采用 Fisher 精确分布检验、卡方检验、秩和检验,等级资料采用 Ridit 分析、秩和检验等。

6.2 结果评价

6.2.1 慢性毒性试验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。

6.2.2 致癌试验阴性结果确立的前提是大鼠在试验期为 18 个月时,各组动物存活率不小于 50%;大鼠在试验期为 24 个月时,各组动物存活率不小于 25%。

6.2.3 致癌试验阳性结果的判断采用世界卫生组织(WHO)提出的标准[WHO(1969),Principles for the testing and evaluation of drug for carcinogenicity.WHO Technical Report Series 426],符合以下任何一条,可判定受试物为对大鼠的致癌物:

- a) 肿瘤只发生在试验组动物,对照组中无肿瘤发生;
- b) 试验组与对照组动物均发生肿瘤,但试验组发生率高;
- c) 试验组动物中多发性肿瘤明显,对照组中无多发性肿瘤,或只是少数动物有多发性肿瘤;
- d) 试验组与对照组动物肿瘤发生率虽无明显差异,但试验组中发生时间较早。

7 报告

- 7.1 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号。
- 7.2 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期。
- 7.3 试验开始和结束日期、试验项目负责人、试验单位技术负责人、签发日期。
- 7.4 试验摘要。
- 7.5 受试物：名称、批号、剂型、状态（包括感官、性状、包装完整性、标识）、数量、前处理方法、溶媒。
- 7.6 实验动物：物种、品系、级别、数量、体重、周龄、性别、来源（供应商名称、实验动物生产许可证号），动物检疫、适应情况，饲养环境（温度、相对湿度、实验动物设施使用许可证号），饲料来源（供应商名称、实验动物饲料生产许可证号）。
- 7.7 试验方法：试验分组、每组动物数、剂量选择依据、受试物给予途径及期限、观察指标、统计学方法。
- 7.8 试验结果：动物生长活动情况、毒性反应特征（包括出现的时间和转归）、体重增长、摄食量、饮水量（受试物经饮水给予）、食物利用率、临床观察（毒性反应体征、程度、持续时间，存活情况）、眼部检查、血液学检查、血生化检查、尿液检查、大体解剖、脏器重量、脏/体比值和（或）脏/脑比值、病理组织学检查、肿瘤发生部位、肿瘤数量、肿瘤性质、癌前病变、肿瘤发生率、肿瘤潜伏期、神经毒性或免疫毒性检查结果。如受试物经掺入饲料或掺入饮水给予，报告各剂量组实际摄入剂量。
- 7.9 试验结论：受试物长期经口毒效应和致癌效应，剂量-反应关系、靶器官和可逆性，确定慢性毒性 NOAEL 和（或）LOAEL 结论，得出致癌结论等。

8 试验的解释

由于动物和人存在种属差异，试验结果外推到人或用于风险评估具有一定的局限性。慢性毒性 NOAEL 和 LOAEL 能为确定人群的健康指导值提供有价值的信息。
