

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 240.11—2011

化学品毒理学评价程序和试验方法 第 11 部分：体内哺乳动物骨髓嗜多染红 细胞微核试验

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—
Part 11: *In vivo* mammalian erythrocyte micronucleus 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 11 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:湖南省劳动卫生职业病防治所、广西职业病防治研究所、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:陆丹、陈晓琴、孙金秀、常兵、林铮。



化学品毒理学评价程序和试验方法

第 11 部分:体内哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验

1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验的目的、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。

本部分适用于检测化学品的致突变作用。

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 界定的术语和定义适用于本文件。

3.1

微核 micronucleus

在细胞的有丝分裂后期染色体有规律地进入子细胞形成细胞核时,仍然滞留在细胞质中的染色单体或染色体的无着丝点断片,或因纺锤体受损而丢失的整条染色体。它在末期以后,单独形成一个或几个规则的次核,被包含在子细胞的胞质内而形成,因比主核小,故称为微核。

3.2

着丝粒 centromere/kinetochore

细胞分裂中期染色体上纺锤丝附着的区域,借此子代染色体得以有规律地向子代细胞两极移动。

3.3

正染红细胞 normochromatic erythrocyte, NCE

核糖体已消失的成熟红细胞。

3.4

嗜多染红细胞 polychromatic erythrocyte, PCE

细胞质内仍含有核糖体的未成熟红细胞。

4 试验目的

检测受试样品是否能引起哺乳动物骨髓嗜多染红细胞染色体或有丝分裂器损伤而诱导含微核细胞发生率增高,以评价受试样品致突变的可能性。

5 试验概述

通过适当的途径使动物接触受试样品,一定时间后处死动物,取出骨髓,制备涂片,经固定、染色、在显微镜下计数含微核的嗜多染红细胞。

6 试验方法

6.1 试剂

6.1.1 小牛血清(灭活)

小牛血清滤菌后置于 56℃ 恒温水浴保温 30 min 进行灭活。灭活的小牛血清通常贮存于 4℃ 冰箱里。亦可用大鼠、小鼠血清代替。

6.1.2 姬姆萨(Giemsa)染液

Giernsa 染料	3.8 g
甲醇	375 mL
甘油	125 mL

配制:将 Giernsa 染料和少量甲醇于乳钵里仔细研磨,再加入甲醇至 375 mL,待完全溶解后,再加入 125 mL 甘油,混合均匀。置 37℃ 恒温箱中保温 48 h。保温期间振摇数次,促使染料的充分溶解。取出过滤,两周后使用。

6.1.3 磷酸盐缓冲液(pH6.8)

1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液:磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)9.47 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水中。

1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液:磷酸二氢钾(KH_2PO_4)49.07 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水中。

取 1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液 50 mL 与 1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液 50 mL 混合。

6.1.4 Giernsa 应用液

取 1 份 Giernsa 染液与 9 份 1/15 mol/L 磷酸盐缓冲液混合而成。临用时配制。

6.1.5 甲醇(分析纯)

全部试剂除注明外,均为分析纯,试验用水为蒸馏水。

6.2 受试样品处理

通常用蒸馏水、等渗盐水、植物油、食用淀粉、羧甲基纤维素钠等。如使用特殊溶剂或载体,应有参考资料说明其成分。

6.3 实验动物

常规选用成年的健康小鼠或大鼠。

6.4 剂量设计

至少设置三个剂量组,高剂量组应达到不产生动物死亡的最大毒作用剂量。一般取受试样品 1/2 LD_{50} 或低于 1/2 LD_{50} 的剂量,以求获得微核的剂量-反应关系曲线。当受试样品的 LD_{50} 大于 5 g/kg 体

重时,可取 5 g/kg 体重为高剂量,每个剂量组 10 只动物,雌性、雄性各半,同时应设阳性对照和阴性对照。阳性对照物应能引起骨髓嗜多染红细胞微核率明显高于背景资料,染毒途径可以不同于受试样品。所选用的阳性对照物最好与受试样品类别有关,常使用的阳性对照物有:

- 环磷酰胺(cyclophosphamide,CAS 号 50-18-0);
- 甲磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate,CAS 号 62-50-0);
- 乙基亚硝基脲(ethyl nitrosourea,CAS 号 759-73-9);
- 丝裂霉素 C(mitomycin C,CAS 号 50-07-7);
- 三亚乙基胍(triethylenemelamine,CAS 号 51-18-3)等。

如使用特殊溶剂的应设溶剂对照。

6.5 试验步骤

6.5.1 染毒

骨髓 PCE 微核试验要求给受试样品后短期内能在骨髓达到有效浓度。常用的方式是腹腔给药及经口给药。由于受试样品的理化性状各不相同,经各种途径给药后吸收速度及分布也有差异,故可按实际需要,选用合适的给药途径。染毒途径视试验目的而定,宜采用经口灌胃方式。采用一次给药,于 24 h~48 h 之间取材;还可采用 30 h 两次给药法,即两次给药间隔 24 h,第二次给受试样品后 6 h 取材。

6.5.2 取材

颈椎脱臼处死动物后,打开胸腔,沿着胸骨柄与肋骨交界处剪断,剥掉附着其上的肌肉,擦净血污,横向剪开胸骨,暴露骨髓腔,然后用止血钳挤出骨髓液。

6.5.3 标本片制备

6.5.3.1 骨髓涂片

将骨髓液滴在载玻片一端的小牛血清液滴里,仔细混匀。一般来讲,两节胸骨髓液涂一张玻片为宜。然后,按血常规涂片法涂片,长度约 2 cm~3 cm。在空气中晾干。

6.5.3.2 固定

将干燥的涂片放入甲醇液中固定 5 min~10 min。即使当日不染色,也应固定后保存。

6.5.3.3 染色

将固定过的涂片放入 Giemsa 应用液中染色 10 min~15 min。立即用蒸馏水冲洗,晾干。

6.5.3.4 封片

待染片完全干燥后或用滤纸及时擦干染片背面的水滴,再用双层滤纸轻轻按压染片,以吸附染片上残留的水分,再在空气中晃动数次,以促其尽快晾干,然后放入二甲苯中透明 5 min,取出滴上适量光学树胶,盖上盖玻片,写好标志。

6.5.4 镜检

6.5.4.1 本法观察含微核的嗜多染红细胞。嗜多染红细胞呈灰蓝色,成熟红细胞呈淡桔红色。微核大多数呈单个圆形,边缘光滑整齐,嗜色性与核质相一致,呈紫红色或蓝紫色。选择细胞分布均匀,细胞无损,着色适当的区域,再在油镜下计数。虽然不计数含微核的有核细胞,但需用有核细胞形态染色是否

正常作为判断制片优劣的标准。

6.5.4.2 应对每个动物的骨髓至少观察 200 个红细胞,计数嗜多染红细胞在红细胞总数(嗜多染红细胞+嗜正染红细胞)中比例时,嗜多染红细胞在红细胞总数中比例不应低于对照值的 20%。如果 $PCE/NCE < 0.1$,说明红细胞生成过程受到抑制,试验结果不可靠,应重新设计剂量,进行试验。

6.5.4.3 每只动物至少计数 1 000 个嗜多染红细胞。微核率指含有微核的嗜多染红细胞数,以千分率(%)表示。若一个嗜多染红细胞中出现两个以上微核,仍按一个有微核细胞计数。并应计算正常红细胞和嗜多染红细胞的比列。

7 数据处理与结果评价

计算各组微核细胞率的均数和标准差,用适当的统计学方法,对受试样品各剂量组与溶剂对照组的微核率进行比较。如果受试样品剂量组与对照组相比,统计学上有显著性差异,并有剂量-反应关系则可认为微核试验阳性。

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) 受试样品:配制方法、所用溶剂及其对受试样品的溶解性和稳定性;
- b) 动物:种属、品系、体重、数量、性别、来源(注明合格证号和动物级别)、喂养条件、饲料等;
- c) 实验动物饲养环境:饲料来源、室温、相对湿度、实验动物室合格证号;
- d) 试验方法:选定剂量依据、剂量换算、染毒途径和方式、试验处理与制片过程;
- e) 毒性评价:分析每只动物细胞数、试验干扰因素及评价方法等;
- f) 以列表方式报告受试样品对动物骨髓细胞微核发生率;
- g) 结论。

9 结果解释

阳性结果表明受试样品在本试验条件下可引起哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核率增加。阴性结果表明在本试验条件下受试样品不引起哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核率增加。
