



中华人民共和国国家标准

GB/T 28647—2012

化学品 啮齿类动物子宫增重试验 雌激素作用的短期筛选试验

Chemicals—Test method of uterotrophic bioassay in rodents—
A short-term screening test for oestrogenic properties

2012-07-31 发布

2012-12-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准技术性内容与经济合作与发展组织(OECD)化学品测试导则 No. 440(2007)《啮齿类动物子宫增重试验 雌激素作用的短期筛选试验》(英文版)一致。

本标准做了下列结构和编辑性修改：

——将 OECD 440 原文中的“前言”和“最初考虑和局限性”部分内容作为本标准的“引言”；

——增加了范围一章；

——将 OECD 440 原文中的“附录 1 定义”部分内容作为本标准的“术语和定义”；

——将 OECD 440 原文中的“附录 2 OECD 内分泌干扰物测定与评价的概念框架”部分内容作为本标准的“附录 A”。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所、辽宁省职业病防治院、中国化工经济技术发展中心、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：侯粉霞、曲波、王晓兵、李雪飞、白羽、李晞。

引 言

1998年,OECD启动了一项具有高度优先权的行动,即,修订现有指南、建立用于筛查和检测潜在内分泌干扰物的新指南^[1]。行动的内容之一就是建立啮齿类动物子宫增重试验的试验指南。之后,对啮齿类动物子宫增重试验开展了广泛的验证程序,包括详细的背景文件的编辑^[2-3]以及通过应用强活性参比雌激素、弱活性雌激素受体激动剂、强活性雌激素受体拮抗剂、阴性参比化学物等作为受试物,开展广泛的实验室内和实验室间的比对来说明该试验的相关性和可重复性^[4-9]。该试验指南440是在汲取了验证试验中的经验和参照了雌激素激动剂类受试物试验结果后形成的。

子宫增重试验是一个始于20世纪30年代的短期筛选试验^[27-28],在1962年被一个专家委员会首次定为筛选试验^[32,35]。它是基于子宫质量的增加或者子宫增重反应(参见5.3),用于评价一个化学物引起与天然雌激素(例如 17β -雌二醇, 17β -estradiol)的激动剂或拮抗剂作用相一致的生物学作用的能力。然而,该方法用于检测雌激素拮抗剂比用于检测雌激素激动剂要少得多。子宫对雌激素的反应方式有两种。最初的反应是吸收水分而引起子宫质量增加。此后,子宫组织增长进一步引起其质量增加^[30]。大鼠和小鼠的子宫反应具有可比性。

该试验是一项体内筛选试验,它的应用可参见“OECD内分泌干扰物测定与评价的概念框架”(附录A)。在这个概念框架中,子宫增重试验作为一项体内试验位于框架的第3级,阐明单一一种内分泌作用机制,即雌激素样作用。

子宫增重试验希望被纳入用于检测潜在内分泌干扰作用的系列体内和体外试验中,最终用于对人类健康和环境影响进行危险评价。OECD在开展该方法验证试验时,使用强活性和弱活性的雌激素激动剂来评估该试验检测雌激素样作用物质的效能^[4-8]。因此,除了实验室内和实验室间良好的可重复性外,该试验用于检测雌激素样作用物质的敏感性也得到了很好的证实。

在该方法的验证试验中,仅使用了一种阴性参比物,有报道该种物质的子宫增重试验以及体外受体结合试验和受体检测试验为阴性。此外,也对验证试验之外的资料进行了评价,这些资料进一步证明了子宫增重试验用于筛选雌激素样作用物质的特异性。

雌激素激动剂和拮抗剂作为雌激素 α 受体和 β 受体的配体,可分别活化或抑制受体的转录。这可能引起潜在的健康危害,包括对生殖和发育产生影响。因此,需要快速地评价化学物是否有可能是雌激素激动剂或拮抗剂。虽然受试物与雌激素受体的亲和力、雌激素受体基因转录活化体外试验等方面的资料可提供信息,但这些信息仅是决定是否有可能产生有害作用的因素之一。其他的决定因素包括化学物进入体内后的代谢活化和失活、在各组织的分布情况、从体内清除的情况等;这些情况至少部分地依赖于染毒途径和被检测的受试物。这就需要了解受试物在体内环境中的活性,除非已有资料可说明该化学物的吸收—分布—代谢—排泄的特征。子宫组织在受到雌激素刺激后发生快速增长,特别是啮齿类实验动物(其发情周期持续约4d)。啮齿类动物,特别是大鼠,被广泛应用于危害评估的毒理学试验中。因此,啮齿类动物的子宫对于体内筛选雌激素激动剂和拮抗剂是一个适宜的靶器官。

本标准是基于那些在OECD验证试验中使用的试验方法,这些验证试验的结果已经表明该方法在实验室内和实验室间是可靠的和可重复的^[5,7]。现在可以利用两种方法,即切除卵巢的成年雌性动物方法(ovx-adult method)和未发育成熟的不切除卵巢的方法(immatute method)。OECD验证试验结果显示这两种方法有可比较的敏感性和可重复性。然而,对于未发育成熟的动物,因为其具备完整的下丘脑—垂体—性腺(HPG)轴,用于试验时其反应的特异性要差一些,但却比切除卵巢的动物检测的范围更大一些,因为它除了可用于检测作用于雌激素受体的物质,也可用于检测作用于HPG轴的物质。在大约为15日龄时,大鼠的HPG轴具有了功能。在这之前,用促性腺激素释放激素等处理不能促进

青春期发育。在即将到达青春期、阴道开口之前,雌性动物将经历几个类似休眠的性周期,在这期间未引起阴道开口和排卵,但是激素水平会有波动。如果化学物直接或间接地刺激 HPG 轴,则可引起青春期提前、早排卵和加快阴道开口。除了可作用于 HPG 轴的物质外,若饲料中虽然不含有雌激素物质但含有较高水平的可代谢能量,也可刺激动物发育、加快阴道口开放。上述这些物质不会引起切除卵巢的成年动物的子宫增重反应,因为它们的 HPG 轴没有功能。

考虑到动物福利,该方法应优先使用未发育成熟的大鼠,这样可以避免对动物做手术,也可避免由于动物进入发情周期而将动物废弃的可能性(见 5.4.1)。

子宫增重不是完全由雌激素引起的,也就是说除了雌激素激动剂和拮抗剂之外的其他物质也可引起子宫增重。例如相对高剂量的黄体酮(progesterone)、睾酮或者各种人工合成的孕激素(progestin)都可刺激子宫增重^[30]。子宫增重的任何改变可以通过组织学检查阴道角化而予以确定^[30]。不管诱发因素是什么,如果子宫增重试验结果为阳性,则一般应进一步对其起因予以阐明。其他资料,如雌激素受体结合试验和雌激素受体转录活化试验等体外试验的资料以及雌性动物青春期分析等体内试验的资料,也可用于证明雌激素样作用。

由于子宫增重试验是作为一种体内筛选试验,因此,所开展的方法验证试验既要考虑动物福利的要求,又要考虑分阶段开展试验的策略。验证试验主要是为了充分证明其检测雌激素样作用(是许多化学物需要关注的方面)的可重复性和敏感性,而对其检测抗雌激素样作用仅做了少量的验证工作。仅采用了一个强活性抗雌激素物质进行了验证,这是因为有明确的抗雌激素样作用(未受某些雌激素活性作用的干扰)资料的物质是很有限的。因此,本标准是针对雌激素样作用,而描述检测抗雌激素样作用的试验方法则包含在一个指南文件中。本方法用于检测单纯的抗雌激素物质的可重复性和敏感性在今后(当检测抗雌激素样作用的方法被常规使用了一段时间和使用本方法检测出了更多的抗雌激素样作用物质后)会有更清楚的描述。

众所周知,所有与动物有关的试验程序都应符合当地动物管理的标准;下面所述有关动物管理和处理的要求是最低标准,可被当地的动物管理要求所替代。OECD 给出了仁慈对待动物的指南文件^[25]。

与所有使用活体动物进行的试验一样,应在试验前确定是否需要开展该试验。例如在下列两种情况可开展该试验:(1)潜在的暴露量大(见附录 A、概念框架中的第 1 级)、或者其雌激素样作用结果提示需通过开展体内试验来证明这种作用。(2)概念框架中第 4 级或第 5 级的体内试验结果提示需证实所产生的效应是与雌激素机制有关的,而体外试验不能对此予以证明。

化学品 啮齿类动物子宫增重试验

雌激素作用的短期筛选试验

1 范围

本标准规定了化学品啮齿类动物子宫增重试验雌激素作用的短期筛选试验方法的术语和定义、试验原理、试验方法描述、试验步骤、试验数据和报告、结果的解释和认可。

本标准适用于雌激素作用短期筛选啮齿类动物子宫增重试验。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

抗雌激素样作用 antioestrogenicity

化学品抑制哺乳动物体内 17β -雌二醇(estradiol 17β)作用的能力。

2.2

出生日期 date of birth

出生后第 0 天。

2.3

给药 dosage

表示染毒剂量、染毒次数和染毒期限的一个总称。

2.4

剂量 dose

染毒受试物的量。对于子宫增重试验,剂量表示为实验动物每天每单位体重的受试物质量[如 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]。

2.5

最大耐受剂量 maximum tolerable dose, MTD

进入体内未引起实验动物死亡的受试物的最大量(用 DL_0 表示)。

2.6

雌激素样作用 oestrogenicity

化学品可在哺乳动物体内引起类似 17β -雌二醇(estradiol 17β)作用的能力。

2.7

出生后 x 天 postnatal day x

出生日之后生活的第 x 天。

2.8

敏感性 sensitivity

将阳性/有活性物质检测出阳性结果的比例。是对试验方法精确性(能正确检测出不同活性的物质)的量度标准,而且是评价试验方法相关性时需认真考虑的方面。