



中华人民共和国国家标准

GB/T 27817—2011

化学品 免疫毒性试验方法

Chemicals—Test method of immunotoxicity

2011-12-30 发布

2012-08-01 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。

本标准与美国环境保护局(USEPA)预防、农药及有毒物质预防办公室发布的生物化学品试验指南 OPPTS 880.3550(1996)免疫毒性(EPA Biochemicals Test Guidelines OPPTS 880.3550;1996, Immunotoxicity)(英文版)技术性内容一致。

本标准作了下列结构和编辑性修改：

- 将原文中的下列内容作为本标准的“引言”内容：“前言”；(a) 标题下(1)“适用性”和(2)“背景”；(b) 标题下的(1)“产品登记对免疫毒性试验的要求”、(2)“目的”和(5)“受试物”；(f) 标题下的内容：“免疫毒性试验的阶段性”；
- 增加了范围一章(见第 1 章)和规范性引用文件一章(见第 2 章)；
- 计量单位改成我国法定计量单位。

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、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、李朝林、林铮、王晓兵、陈会明。

引 言

本标准参考了 USEPA OPPTS 880.3550:1996 免疫毒性试验(英文版),技术内容与试验指南 OPPTS 880.3550(1996)免疫毒性相一致。

该试验指南是美国环境保护局(USEPA)预防、农药及有毒物质预防办公室(The Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS)发布的系列试验指南之一,受检对象为农药和有毒物质,所获得的毒理学资料提交后供 EPA 根据有关法规进行审查。

OPPTS 发布的该试验指南是通过合并和权衡多个试验指南(包括污染预防和有毒物质办公室(the Office of Pollution Prevention and Toxics, OPPT)发布的指南、美国规范大全中标题 40 下的第 I 章第 R 亚章中所述指南(Title 40, Chapter I, Subchapter R of the Code of Federal Regulations, CFR)、农药规划办公室(the Office of Pesticide Programs, OPP)、经济合作与发展组织(the Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)后最终形成的一个协调一致的指南。

融合多个试验指南来形成单一一套 OPPTS 试验指南的目的是为了达到美国环境保护局对试验数据的要求,使试验方法的差异减小到最小。

适用性:为了满足美国联邦关于农药、杀真菌剂和杀鼠剂条例的要求。

背景:起草参考的原始文件是 OPP 指南 152-18。

产品登记对免疫毒性试验的要求:产品登记对免疫毒性资料的要求根据情况而定。当要求开展亚慢性(90 d)经口毒性试验(OPPTS 870.3100)、亚慢性(90 d)经皮毒性试验(OPPTS 870.3250)或亚慢性(90 d)吸入的毒性试验(OPPTS 870.3465)时,则要求开展免疫毒性试验;免疫毒性试验中动物的染毒途径应与亚慢性毒性试验的染毒途径相一致。

目的:通过免疫毒性试验可以了解亚慢性染毒受试物(一般是经口染毒)对机体产生的健康损害作用。这些免疫毒性试验可以定性或定量评价受试物对抗体介导的体液免疫以及特异性和非特异性细胞免疫的影响。

受试物:应测定受试物中每一种有效成分的技术等级。

免疫毒性试验的阶段性的:如果第一阶段的任何一项免疫毒性试验证明受试物具有免疫毒性,则应开展第二阶段的免疫毒性试验(OPPTS 880.3800)。如果第一阶段免疫毒性试验的结果不能被明确解释或有资料证明受试物或其结构类似物具有免疫毒性时,也许也应进行第二阶段免疫毒性试验。如果第一阶段试验明确证明受试物没有免疫毒性,或没有相关资料可以证明受试物或其结构类似物具有免疫毒性时,不需要进行第二阶段试验。

化学品 免疫毒性试验方法

1 范围

本标准规定了化学品免疫毒性试验方法的术语和定义、试验原则、试验方法和试验报告。
本标准适用于检测化学品的免疫毒性。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本标准。

美国环境保护局(USEPA)生物化学品试验指南 OPPTS 880. 3800(1996)免疫反应(EPA Biochemicals Test Guidelines OPPTS 880. 3800;1996,Immune Response)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

免疫毒性 immunotoxicity

受试物诱导免疫系统发生功能紊乱或不合适的抑制性或刺激性反应的能力。

4 试验原则

本标准中的免疫毒性试验,可以评价受试物是否改变或损伤免疫系统的机能状态。评价指标包括:免疫组织、免疫器官的重量及细胞结构;临床血液生化分析;血液学检查;体液免疫功能;细胞免疫功能。不同组的动物染毒不同剂量的受试物至少 30 d,每天对动物进行观察,记录所出现的任何临床毒性表现。染毒结束后,处死动物,对上述的评价指标进行检测或分析;其中有些试验中需要用抗原将动物致敏。

5 试验方法

5.1 实验动物

5.1.1 种属和品系

首选小鼠或大鼠,并使用常用的动物品系。如果使用其他种属的动物则应说明理由。所有动物应无寄生虫和病原菌。雌性动物应未产、未孕。

5.1.2 年龄

应使用健康的动物。在试验开始时,单只动物的体重不应超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。于 6 周龄~8 周龄时开始染毒。

5.1.3 性别

使用单一性别的动物。如果已知受试物对其中一种性别的动物更敏感,则应使用这种性别的动物。

5.1.4 数量

对照组及各剂量组的每个观察指标测定时至少应包含 10 只动物。

5.2 对照组

应设立溶剂对照组,而且溶剂对照组中还应另外包含一些动物,用于评价免疫毒性的可恢复性、持续性以及迟发性时作为对照[见 OPPTS 880.3800(d)(1)]。

溶剂毒性未知时,应设立一个不作任何染毒的对照组。

为了说明方法的敏感性,应使用已知的免疫抑制剂(如,环磷酰胺)设立阳性对照组,每个观察指标至少需要 5 只动物。

5.3 附加组

高剂量组应设立附加组,至少包含 20 只动物,以高剂量组的剂量染毒 30 d,染毒结束后继续观察一段时间(30 d),以评价免疫毒性作用是否可以恢复、是否持续存在、是否具有迟发性等情况[见 OPPTS 880.3800(d)(1)]。

5.4 剂量水平

对于亚慢性毒性试验,常常期望得到受试物剂量-反应关系和无免疫毒性作用的剂量水平,因此,至少应设 3 个剂量组和 1 个阴性对照组。

高剂量应不使动物产生明显的应激、营养不良或死亡;但最好可使动物产生一些可测量的一般中毒表现。

低剂量最好不使动物产生任何免疫毒性作用。

5.5 染毒

受试物或溶剂经口和/或经皮和/或经吸入染毒至少 30 d(一般经口染毒),具体的染毒途径应与 90 d 亚慢性毒性试验的染毒途径相一致。

5.6 观察期限

观察期限至少为 30 d。

附加组动物在停止染毒受试物后至少再观察 30 d,以观察免疫毒性作用是否恢复、是否持续存在、是否具有迟发性。

5.7 动物的观察

每天对动物至少进行一次细致的临床观察,记录中毒症状的出现时间、严重程度及其持续时间。观察应包括如下方面但并不仅限于此:

- 皮、毛;
- 眼、黏膜;
- 呼吸系统;
- 自主性和中枢神经系统;
- 循环系统;
- 肢体运动功能;
- 行为特征;
- 抗感染能力等。

每周测量一次动物的摄食量和饮水量。

动物染毒前称体重,之后每周 1 次,处死前再次称体重。

任何濒死动物一被发现就应与其他动物分开并被安乐死。对试验过程中的任何濒死的或死亡的动物都应进行大体解剖。

5.8 临床检验

试验结束后,各剂量组和对照组各取 10 只动物进行临床检验。动物处死前应隔夜禁食。

5.8.1 血液学检测

可包括下列指标：

- 红细胞压积；
- 血红蛋白浓度；
- 红细胞计数；
- 白细胞总数及分类计数；
- 血小板计数。

5.8.2 血液生化分析

可包括下列指标：

- 血糖；
- 谷丙转氨酶；
- 尿素氮；
- 白蛋白；
- 总蛋白；
- 需要时可进行其他的临床生化分析。

5.9 大体解剖

所有动物都应进行大体解剖，包括：

- 测量体重；
- 测量胸腺和脾脏的湿重，取出后应尽快称量以免脏器干燥。

5.10 组织制备

各剂量组和对照组各取 10 只动物，取下列组织器官以及病变器官，用适当的固定液进行固定保存，用于组织病理学检查。这些组织器官包括：

- 胸腺；
- 脾脏；
- 肝脏；
- 肺脏；
- 肾脏；
- 骨髓(股骨、胸骨或肋软骨部位的骨髓)；
- 有代表性的淋巴结(黏膜附近的淋巴结或周围淋巴结)；
- 肾上腺；
- 垂体；
- 卵巢或睾丸；
- 所有肉眼可见的损伤。

5.11 检测脾脏、胸腺和骨髓的细胞结构及细胞活力。

5.12 对任何肉眼可见的损伤进行传统的组织病理学检查。

5.13 如果特异性和非特异性细胞免疫反应受到了影响，则应对上述组织或器官进行组织病理学观察。

5.14 免疫毒性试验

5.14.1 体液免疫试验

首先用抗原免疫动物，然后采用抗体形成细胞检测(Antibody Plaque Forming Cell, 简称 PFC 试验, 也称溶血空斑试验)方法或酶联免疫吸附(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)检测抗体滴度的方法评价受试物对体液免疫的影响。

5.14.1.1 PFC 试验

杰尼(Jerne)和诺尔丁(Nordin)的 PFC 方法经卡尼海姆(Cunningham)和森博格(Szenberg)修改

后^[1-2],被用于检测亚慢性染毒受试物(30 d)对脾脏内产生抗体的细胞的毒性作用。试验时,应对如下因素进行考虑:

- 于染毒的第 26 天经静脉注射 T 细胞依赖性抗原绵羊红细胞(sheep red blood cells,SRBCs);应对各种种属和品系的动物在注射抗原后测定 PFC 的最佳时间作出评价。
- 测定每批补体的活性。
- 对上述所引用的 PFC 方法存在一些修改(如参考文献[22]中特目普(Temple)的方法)^[22],这些修改可能是有用的。但是,引用某种方法时应对方方法进行整体引用,对方法所做的任何修改都应予以说明并能证明其合法性和合理性;应说明主要试剂的来源,最好也能说明这些试剂的活性或纯度。
- 为了验证试验方法的敏感性,应设立经免疫抑制剂(如,环磷酰胺)染毒的阳性对照组。
- 使用双盲法进行 PFC 计数。
- 测定脾细胞的活性。

5.14.1.2 定量测定免疫球蛋白

通过该试验评价受试物是否影响抗体对抗原的反应性。在染毒结束前 4 d~5 d,用适当的胸腺依赖性抗原免疫动物后,经过适当的时间再次用抗原免疫动物,然后测定每只动物血清中 IgG 和 IgM 的滴度。测定抗体滴度的时间点应足够多,以便对染毒组和对照组动物的初级抗体反应和次级抗体反应进行比较。测定抗体时受试物的染毒时间至少为 30 d。试验时,应对如下因素进行考虑:

测定血清中 IgG 和 IgM 滴度的方法应足够敏感以便测得每只动物的 IgG 和 IgM 滴度。ELISA 方被认为是一种灵敏、可靠、重复性好的方法。

5.14.2 特异性细胞免疫反应

为了评价亚慢性染毒受试物(30 d)对特异性细胞免疫反应的影响,应采用下列三种方法中的一种进行试验。

5.14.2.1 单向混合淋巴细胞培养法(One-way Mixed Lymphocyte Culture,MLC)

该方法可以证明亚慢性染毒受试物(30 d)对同种异品系淋巴细胞刺激引起的淋巴细胞增值能力的影响。通过测量放射性标记物(一般为 3H-胸腺嘧啶)掺入 DNA 的量来说明淋巴细胞的增殖。试验时,应对如下因素进行考虑:

- 应答细胞来自对照组和染毒组动物的脾细胞,在无菌条件下制备脾细胞。应答细胞的 DNA 合成没有采取阻断处理;
- 刺激细胞来自未经染毒的同种异品系动物的脾细胞,在无菌条件下制备脾细胞。刺激细胞的 DNA 合成用丝裂霉素或 X 线处理进行阻断;
- 测定应答细胞和刺激细胞的活力;
- 应设 3 份或 4 份对照,用于证明收获细胞的效益、保证刺激细胞的非反应性、测定 DNA 合成的基础水平;
- 对空白对照和溶剂对照同时进行测定;
- 用每个培养皿中掺入应答细胞的放射性标记物的量来表示脾细胞的增殖程度,表示为每分钟居里数(curie per minute,CPM)。要计算净 CPM(n CPM),即,应答细胞被刺激细胞刺激后掺入的 CPM 均值减去未经刺激的脾细胞掺入 CPM 的均值。染毒组与对照组差异的百分比表示为: $[1-(\text{染毒组 nCPM}/\text{对照组 nCPM})]$;
- 不同的单向混合淋巴细胞培养法中存在许多不同,应说明所引用的试验方法及详细的试验步骤,说明主要试剂的来源,最好也说明这些试剂的纯度;
- 为了证明方法的灵敏性,应设立阳性对照组,用已知的免疫抑制剂进行染毒。

5.14.2.2 迟发型过敏(Delayed-type Hypersensitivity,DTH)反应

该方法是一种检测受试物对实验动物诱导性 DTH 影响的体内方法。一般来说,动物被胸腺依赖

性抗原致敏,之后用相同的抗原进行激发,激发后 24 h~48 h,比较染毒组和对照组 DTH 反应的差异。开展该试验时,应对如下因素进行考虑:

- DTH 检测方法有数种,应选用灵敏度高、可重复性好、并适用于所选用实验动物品系的方法;
- 不同的方法中下列参数也可能不同,如,致敏及激发动物所用抗原的性质,免疫性注射的次数及途径,免疫激发的时间,同位素的使用等。试验时选用的这些参数及其他相关的参数应可以使所选用的实验动物产生足够的 DTH 反应;
- 测定 DTH 反应前,应对动物染毒至少 30 d。

5.14.2.3 细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic T-lymphocyte,CTL)检测

该方法用于证明亚慢性染毒受试物(30 d)对 CTL 生成的影响。该试验中使用同种异品系肿瘤抗原对 CTL 进行诱导(体内或体外诱导),然后,来自染毒组和对照组动物的脾细胞与⁵¹Cr 标记的同种异品系肿瘤细胞共孵育,4 h 后,肿瘤细胞所释放的放射性标记物的量可以说明 T 淋巴细胞溶解肿瘤细胞的能力。试验时,应对如下因素进行考虑:

- 应设立对照组来测定效应细胞不存在时靶细胞释放的放射性标记物的本底量和放射性标记物的总的释放量;
- 应可以证明试验中所选用的动物可产生 CTLs,所选用的试验方法应适合于诱导动物 CTL 的生成;
- CTL 检测有数种不同的方法,引用某一种方法时应做到完全引用,对方法进行修改时应予以说明,合适的情况下应说明主要试剂的来源、活性和/或纯度。

5.14.3 非特异性细胞免疫反应

通过测定 NK 细胞的功能、巨噬细胞数及其吞噬作用可以评价亚慢性染毒(30 d)受试物对非特异性细胞免疫的影响。

5.14.3.1 NK 细胞的活性(natural killer cell activity)

建议采用瑞纳尔兹(Reynolds)和贺伯门(Herberman)的微量培养法^[17]来检测亚慢性染毒(30 d)受试物对 NK 细胞活性的影响。染毒组和未染毒组动物的脾细胞与⁵¹Cr 标记的 YAC-1 淋巴瘤细胞共培养。靶细胞与效应细胞共培养 4 h 后,靶细胞中释放的放射性标记物的量可用于表示 NK 细胞杀伤肿瘤细胞的能力。开展该试验时,应对如下因素进行考虑:

- 应设立几个对照以说明在无效应细胞存在时,靶细胞释放放射性标记物的本底量以及放射性标记物总的释放量;
- 试验使用除 YAC-1 淋巴瘤细胞之外的靶细胞也许是合适的。任何情况下都应测定靶细胞的存活力;
- 也许需要对方法的某些步骤进行修改,但是,引用某种方法时应对方方法进行整体引用,对方法所做的任何修改都应予以说明并能证明其合法性和合理性;应说明主要试剂的来源,最好也能说明这些试剂的活性或纯度。

5.14.3.2 巨噬细胞检测

该试验可以评价亚慢性染毒(30 d)受试物对巨噬细胞数及其吞噬功能的影响。应对如下方面进行检测:

- 试验中应计数腹腔细胞的总数及分类计数;
- 评价在有或没有促进因子(如, γ -干扰素或细菌脂多糖)存在的情况下腹腔细胞对颗粒(如,荧光乳液珠)的吞噬作用。
- 有数种不同的巨噬细胞检测方法,因此,应对所选用的方法进行描述并说明方法引证的来源;如果对所选用的方法作了一些修改,则应说明修改的合理和合法性。

6 试验报告

除总则规定的一般项目外,鉴定报告还应包括以下内容:

- 统计方法;
- 动物级别及饲养条件的详细信息;
- 实验室免疫毒性试验历史资料的测定值;
- 减少免疫毒性测定值波动的方法。

参 考 文 献

- [1] Cunningham, A. J. A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature*, 1965, 207: 1106-1107
- [2] Cunningham, A. J. , and A. Szenberg. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology*, 1968, 14: 599-601
- [3] Daugherty, M. L. Immunotoxicology; in *Scientific Rationale for the Selection of Toxicity Testing Methods. II. Teratology, Immunotoxicology, and Inhalation Toxicology*. M. G. Ryon and D. S. Sawhney, eds. EPA-560/6-84-004, 1985
- [4] Dean, J. H. et al. Amos (eds). *Immunotoxicology and Immunopharmacology*. Raven Press, NY, 1985
- [5] Dean, J. H. et al. Toxic responses of the immune system. Pp. 245-285; in *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Third edition. J. Doull, C. D. Klaassen, and M. O. Amdur (eds). MacMillan, NY, 1987
- [6] Exon, J. H. et al. Effect of lead, polychlorinated biphenyls and cyclophosphamide on rat natural killer cells, interleukin 2 and antibody synthesis. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1985, 5: 158-164
- [7] Jerne, N. K. , and A. A. Nordin. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*, 1963, 140: 405-406
- [8] Klein, J. *Immunology. The Science of Self-Nonself Recognition*. John Wiley and Sons, NY, 1982
- [9] Luster, M. I. et al. Evaluation of immune functions in toxicology. Pp. 561-586 in *Principles and Methods in Toxicology*. A. W. Hayes (ed). Raven Press, NY, 1982
- [10] Luster, M. I. et al. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1988, 10: 2-19
- [11] Mishell, R. and R. Dutton. Immunization of dissociated mouse spleen cell cultures from normal mice. *Journal of Experimental Medicine*, 1967, 126: 423-442
- [12] Norbury, K. C. Immunotoxicological evaluation: an overview. *Journal of the American College of Toxicology*, 1985, 4: 279-290
- [13] Proceedings. (1978) Inadvertant Modification of the Immune Response. The Effects of Foods, Drugs, and Environmental Contaminants. I. M. Asher, ed. Fourth FDA Science Symposium. Office of Health Affairs, FDA
- [14] Proceedings. (1982) Target Organ Toxicity: Immune System. *Environmental and Health Perspectives* 43. Symposium held at Arlington, VA, October 20-21, 1980. Sponsored by Society of Toxicology and NIEHS
- [15] Proceedings. (1983) NIH Immunotoxicology Workshop. Symposium held at Research Triangle Park, NC, October 17-18, 1983. Sponsored by NIH and NIEHS
- [16] Proceedings. (1985) International Seminar on the Immunological System as a Target for Toxic Damage. Symposium held at Luxembourg, Belgium, November 6-9, 1984. Sponsored by UNEP, ILO, WHO and COEC
- [17] Reynolds , C. W. , and R. B. Herberman. In vitro augmentation of rat natural killer (NK)

cell activity. *Journal of Immunology*, 1984, 126: 1581-1585

[18] Riccardi, C. et al. Rapid *in vivo* assay of mouse natural killer cell activity. *Journal of the National Cancer Institute*, 1979, 63: 1041-1045

[19] Riccardi, C. et al. Role of natural killer cells in rapid *in vivo* clearance of radiolabelled tumor cells. In *Natural Cell Mediated Immunity Against Tumors*, R. B. Herberman (ed.) Academic Press, NY, 1980: 1121-1139

[20] Rose, N. R., and H. Friedman (eds.), *Manual of Clinical Immunology*. ASM, Washington DC, 1980

[21] Stites, D. P. et al. *Basic and Clinical Immunology*. Lange Medical Publications, Los Altos, CA, 1984

[22] Temple, L. et al. Comparison of ELISA and plaque-forming cell assays for measuring the humoral immune response to SRBC in rats and mice treated with benzo[a]pyrene or cyclophosphamide. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1993, 21: 412-41

[23] Tripathy, S. P., and G. B. Mackaness. The effect of cytotoxic agents on the primary immune response to *Listeria monocytogenes*. *Journal of Experimental Medicine*, 1969, 130: 1-16

[24] Van Furth, R. et al. *In vitro* determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In: *T3 Handbook of Experimental Immunology* D. M. Weir (ed.) Blackwell, Oxford, 1978: 32. 1-32. 19

[25] Vos, J. G. et al. Ovalbumin immunity in the rat: Simultaneous testing of IgM, IgG, and IgE response measured by delayed-type hypersensitivity. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1980, 12: 289-295

[26] Vos, J. G. et al. Use of the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in immunotoxicity testing. *Environmental and Health Perspectives*, 1982, 43: 115-121
