



中华人民共和国国家标准

GB 15193.14—2015

食品安全国家标准 致畸试验

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 15193.14—2003《致畸试验》。

本标准与 GB 15193.14—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 致畸试验”;
- 修改了范围;
- 增加了术语和定义、试验目的、试验报告和解释的内容;
- 增加了动物起始体重的差异应不超过平均体重的 20%的要求;
- 增加了动物饲养要求;
- 修改了试验终止时孕鼠数的要求;
- 增加了一种建立阳性对照组的方式“用环磷酰胺(15 mg/kg 体重)于孕第 12 天腹腔注射 1 次”;
- 增加了母体动物死亡率不得大于 10%的内容;
- 增加了受试物的给予;
- 修改了传统致畸试验中给予大鼠受试物的时间;
- 增加了观察给予受试物期间母体的表现,必要时记录饮水量;
- 增加了对所有妊娠母体进行肉眼检查;
- 修改了表 2;
- 删除了表格“致畸试验记录内容”,增加了需要整理的数据内容;统计项目中增加了净增重和性别比,删除了卵巢重量统计;
- 增加了试验报告应列出的内容和信息。

食品安全国家标准

致畸试验

1 范围

本标准规定了动物致畸试验的试验方法和技术要求。

本标准适用于评价受试物的致畸作用。

2 术语和定义

2.1 发育毒性

个体在出生前暴露于受试物、发育成为成体之前(包括胚期、胎期以及出生后)出现的有害作用,表现为发育生物体的结构异常、生长改变、功能缺陷和死亡。

2.2 致畸性

受试物在器官发生期间引起子代永久性结构异常的性质。

2.3 母体毒性

受试物引起亲代雌性妊娠动物直接或间接的健康损害效应,表现为增重减少、功能异常、中毒体征,甚至死亡。

3 试验目的和原理

母体在孕期受到可通过胎盘屏障的某种有害物质作用,影响胚胎的器官分化与发育,导致结构异常,出现胎仔畸形。因此,在受孕动物的胚胎的器官形成期给予受试物,可检出该物质对胎仔的致畸作用。

检测妊娠动物接触受试物后引起的致畸可能性,预测其对人体可能的致畸性。

4 仪器和试剂

4.1 仪器与器材

实验室常用设备、生物显微镜、体视显微镜、游标卡尺、分析天平。

4.2 试剂

4.2.1 主要试剂

甲醛、冰乙酸、2,4,6-三硝基酚、氢氧化钾、甘油、水合氯醛、茜素红。

4.2.2 主要试剂配制方法

4.2.2.1 茜素红贮备液

以 50% 乙酸为溶剂的茜素红饱和液 5.0 mL、甘油 10.0 mL、1% 水合氯醛 60.0 mL 混合,存于棕色瓶中。

4.2.2.2 茜素红应用液

取贮备液 3 mL~5 mL,用 10 g/L~20 g/L 氢氧化钾液稀释至 1 000 mL,存于棕色瓶中。

4.2.2.3 茜素红溶液

茜素红 0.1 g,氢氧化钾 10 g,蒸馏水 1 000 mL,临用时配制(剥皮法骨骼染色液)。

4.2.2.4 透明液 A

甘油 200 mL、氢氧化钾 10 g,蒸馏水 790 mL 混合。

4.2.2.5 透明液 B

甘油与蒸馏水等体积混合。

4.2.2.6 固定液(Bouins 液)

2,4,6-三硝基酚(苦味酸饱和液)75 份、40% 甲醛 20 份、冰乙酸 5 份。

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。

5.2 实验动物

5.2.1 种、系选择

实验动物的选择应符合 GB 14922.2 和有关规定。啮齿类首选大鼠,非啮齿类首选家兔。若选用其他物种应给出理由。选用健康、性成熟的雄性动物和未经交配的雌性动物,试验开始时动物体重的差异不应超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。所用动物应注明种类、品系、性别、体重和周龄。

5.2.2 动物性别和数量

性成熟雄性和雌性动物通常按 1:1 或 1:2 比例合笼交配,如果 5 d 内未交配,应更换雄鼠。为了获得足够的胎仔来评价其致畸作用,大鼠每个剂量水平的怀孕动物数不少于 16 只,家兔每个剂量水平怀孕动物数不少于 12 只。

5.2.3 动物准备

试验前动物在实验动物房至少应进行 3 d~5 d 环境适应和检疫观察。

5.2.4 动物饲养

实验动物饲养条件、饮用水、饲料应分别符合 GB 14925、GB 5749、GB 14924.3 和有关规定。试验

期间动物自由饮水和摄食,妊娠动物应单笼饲养。

5.3 剂量

试验至少设 3 个剂量组,同时设溶媒对照组,溶媒对照组除不给受试物外,其余处理均同剂量组。必要时设阳性对照组,常用经口给予的阳性对照物及参考剂量为敌枯双(0.5 mg/kg 体重~1.0 mg/kg 体重)、五氯酚钠(30 mg/kg 体重)、阿斯匹林(250 mg/kg 体重~300 mg/kg 体重)及维生素 A (7 500 μ g/kg 体重~13 000 μ g/kg 体重视黄醇当量)等,或者用环磷酰胺(15 mg/kg 体重)于孕第 12 天腹腔注射 1 次。曾用阳性物开展过致畸试验、并在所用实验动物种系有阳性结果发现,试验可略去设置阳性对照组。

高剂量组原则上应使部分动物出现某些发育毒性和(或)母体毒性,如体重轻度减轻等,但不至引起死亡或严重疾病,如果母体动物有死亡发生,应不超过母体动物数量的 10%。低剂量组不应出现任何观察到的母体毒性或发育毒性作用。建议递减剂量系列的组间距 2 倍~4 倍比较合适。当组间差距较大时(如超过 10 倍)加设一个试验组。

试验剂量的设计参考急性毒性试验剂量、28 天经口毒性试验、90 天经口毒性试验剂量和人体实际摄入量进行。对于能求出 LD_{50} 的受试物,根据 LD_{50} 值和剂量-反应关系曲线斜率设计高剂量组的剂量。对于求不出 LD_{50} 的受试物,如果 28 天或 90 天经口毒性试验未观察到有害作用,以最大未观察到有害作用剂量作为高剂量;如果 28 d 或 90 d 经口试验观察到有害作用,以最小观察到有害作用剂量(LOAEL)为高剂量组,以下设 2 个剂量组。设置剂量水平时还应参考受试物的其他毒理学资料。

5.4 试验步骤和观察指标

5.4.1 “受孕动物”的检查

对于大鼠,雌、雄性动物同笼后,每日早晨对雌鼠检查阴栓或进行阴道涂片检查是否有精子,查出阴栓或精子,认为该动物已交配,当日作为“受孕”零天。对于家兔,雌兔和雄兔合笼后阴道涂片检查到精子当日作为“受孕”零天。将检出的“受孕动物”随机分到各组,并称重和编号。

5.4.2 受试物的给予

受试物通常经口灌胃给予,若选用其他途径应说明理由。通常,在器官形成期给予受试物,(大鼠孕期的第 6 天~第 15 天,兔孕期的第 6 天~第 18 天)。受试物灌胃给予时,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亦可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液或糊状物等。受试物应新鲜配制,有资料表明其溶液或混悬液储存稳定者除外。应每日在同一时间灌胃 1 次,根据母体体重调整灌胃体积。灌胃体积一般不超过 10 mL/kg 体重,如为水溶液时,最大灌胃体积可达 20 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。

5.4.3 母体观察

每日对动物进行临床观察,包括皮肤、被毛、眼睛、黏膜、呼吸、神经行为、四肢活动等情况,及时记录各种中毒体征,包括发生时间、表现程度和持续时间,发现虚弱或濒死的动物应进行隔离或处死,母体有流产或早产征兆时应及时剖检。

在受孕第 0 天、给予受试物第 1 天、给予受试物期间每 3 天及处死当日称母体体重。若通过饮水途径给予受试物,还应记录饮水量。

5.4.4 受孕母体处死和检查

5.4.4.1 一般检查

于分娩前 1 天(一般大鼠为孕第 20 天、家兔为孕第 28 天)处死母体,剖腹检查亲代受孕情况和胎体发育。迅速取出子宫,称子宫连胎重,以得出妊娠动物的净增重。记录黄体数、早死胎数、晚死胎数、活胎数及着床数。

处死时对所有妊娠动物进行尸体解剖和肉眼检查,保存肉眼发现有改变的脏器,以便于进行组织学检查,同时保存足够对照组的相应脏器以供比较。

5.4.4.2 胎仔外观检查

逐一记录胎仔性别、体重、体长,检查胎仔外观有无异常。外观检查至少包括表 1 的项目。

表 1 致畸试验胎仔外观检查项目

| 部位 | 检查项目 | 部位 | 检查项目 | 部位 | 检查项目 |
|----|------|-----|------|-----|-------|
| 头部 | 无脑 | 头部 | 小顎症 | 躯干部 | 短尾、卷尾 |
| | 脑膨出 | | 下顎裂 | | 无尾 |
| | 顶骨裂 | | 口唇裂 | 四肢 | 多肢 |
| | 脑积水 | 躯干部 | 胸骨裂 | | 无肢 |
| | 小头症 | | 胸部裂 | | 短肢 |
| | 颜面裂 | | 脊椎裂 | | 半肢 |
| | 小眼症 | | 腹裂 | | 多趾 |
| | 眼球突出 | | 脊椎侧弯 | | 无趾 |
| | 无耳症 | | 脊椎后弯 | | 并趾 |
| | 小耳症 | | 脐疝 | | 短趾 |
| | 耳低位 | | 尿道下裂 | | 缺趾 |
| | 无顎症 | | 无肛门 | | |

5.4.4.3 胎仔骨骼标本制作和检查

骨骼标本制作方法一:将每窝 1/2 的活胎放入 95%乙醇中固定 2 周~3 周,取出胎仔流水冲洗数分钟后放入 10 g/L~20 g/L 的氢氧化钾溶液内(至少 5 倍于胎仔体积)8 h~72 h,透明后放入茜素红应用中染色 6 h~48 h,并轻摇 1 次/d~2 次/d,至头骨染红为宜。再放入透明液 A 中 1 d~2 d,放入透明液 B 中 2 d~3 d,待骨骼染红而软组织基本褪色。

骨骼标本制作方法二(剥皮法):将胎鼠去皮、去内脏及脂肪后,放入茜素红溶液染色,当天摇动玻璃瓶 2 次~3 次,待骨骼染成红色时为止。将胎仔换入透明液 A 中 1 d~2 d,换入透明液 B 中 2 d~3 d。待胎鼠骨骼已染红,而软组织的紫红色基本褪去,可换置甘油中。

胎仔骨骼检查:将骨骼标本放入小平皿中,用透射光源,在体视显微镜下作整体观察,然后逐步检查骨骼。测量头顶间骨及后头骨缺损情况,然后检查胸骨的数目、缺失或融合(胸骨骨化中心为 5 个,剑突 1 块;骨化不全时首先缺第 5 胸骨、次为缺第 2 胸骨),肋骨通常 12 对~13 对,常见畸形有融合肋、分叉肋、波状肋、短肋、多肋(常见 14 肋)、缺肋、肋骨中断。脊柱发育和椎体数目(颈椎 7 个,胸椎 12 个~13 个,腰椎 5 个~6 个,底椎 4 个,尾椎 3 个~5 个),有无融合、纵裂等。最后检查四肢骨。

胎仔的骨骼检查项目见表 2。

表 2 致畸试验胎仔骨骼检查项目

| 部位 | 检查项目 |
|-----|---------------------------------|
| 枕骨 | 骨化中心缺失 |
| 脊柱骨 | 数目、形状异常、融合、纵裂、部分裂开、骨化中心缺失、缩窄、脱离 |
| 骨盆 | 骨化中心缺失、形状异常、融合、裂开、缩窄、脱离 |
| 四肢骨 | 数目、形状异常 |
| 腕骨 | 骨化中心缺失 |
| 掌骨 | 形状异常 |
| 趾骨 | 形状异常 |
| 肋骨 | 数目、形状异常、融合、分叉、缺损 |
| 胸骨 | 数目、融合、骨化中心缺失 |

5.4.4.4 胎仔内脏检查

对于大鼠，每窝的 1/2 活胎鼠放入 Bouins 液中固定 2 周，作内脏检查。先用自来水冲去固定液，将鼠仰放在石蜡板上，剪去四肢和尾，用刀片在头部横切或纵切共 5 刀，再剖开胸腔和腹腔。按不同部位的断面观察器官的大小、形状和相对位置。正常切面见图 1～图 5：

- a) 经口从舌与两口角向枕部横切(切面①)，可观察大脑、间脑、小脑、舌及顎裂；
- b) 在眼前面作垂直纵切(切面②)，可观察鼻部；
- c) 从头部垂直通过眼球中央作纵切(切面③)，可观察眼部；
- d) 沿头部最大横位处穿过脑作切面(切面④)，可观察脑室部，切面①～④目的是可以分别观察舌裂、双叉舌、顎裂，眼球、鼻畸形、脑和脑室异常；
- e) 沿下顎水平通过颈部中部作横切(切面⑤)，可观察气管、食管和延脑或脊髓。

以后自腹中线剪开胸、腹腔，依次检查心、肺、横膈膜、肝、胃、肠等脏器的大小、位置，查毕将其摘除，再检查肾脏、输尿管、膀胱、子宫或睪丸位置及发育情况。然后将肾脏切开，观察有无肾盂积水与扩大。必要时还需对心脏内部结构进行检查。致畸试验胎仔内脏检查至少包括表 3 中的项目。

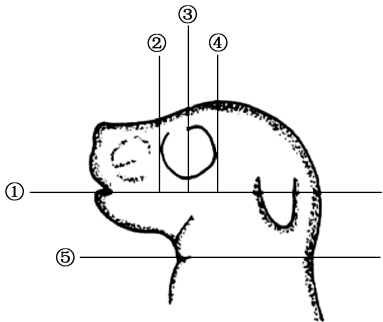


图 1 胎鼠头部示意图

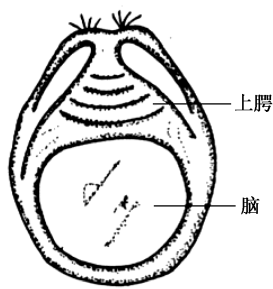


图 2 头部第①切面图示——上腭

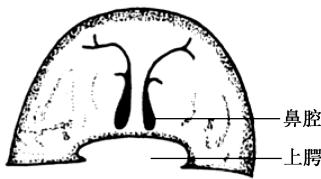


图 3 头部第②切面图示——鼻道



图 4 头部第③切面图示——眼球

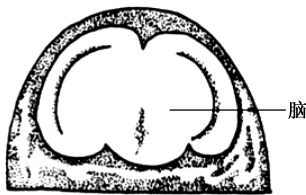


图 5 头部第④切面图示——脑室

表 3 致畸试验胎仔内脏检查项目

| 部位 | 检查项目 | 部位 | 检查项目 | 部位 | 检查项目 |
|------------|--------|----|-------|----|--------|
| 头部 (脊髓) | 嗅球发育不全 | 胸部 | 主动脉弓 | 腹部 | 多囊肾 |
| | 侧脑室扩张 | | 食道闭锁 | | 马蹄肾 |
| | 第三脑室扩张 | | 气管狭窄 | | 肾积水 |
| | 无脑症 | | 无肺症 | | 肾缺失 |
| | 无眼球症 | | 多肺症 | | 膀胱缺失 |
| | 小眼球症 | | 肺叶融合 | | 睾丸缺失 |
| | 角膜缺损 | | 膈疝 | | 卵巢缺失 |
| | 单眼球 | | 气管食管瘘 | | 卵巢异位 |
| 胸部 | 右位心 | 腹部 | 内脏异位 | | 子宫缺失 |
| | 房中隔缺损 | | 肝分叶异常 | | 子宫发育不全 |
| | 室间隔缺损 | | 肾上腺缺失 | | 输卵管积水 |

对非啮齿类动物，如家兔，应对所有的胎仔均进行骨骼和内脏的检查，其检查程序参照大鼠进行。

6 数据处理和结果评价

整理每只动物的资料并将试验结果列表，包括试验开始时体重、各试验组动物数，子代动物数、试验过程中死亡或人为处死的动物数、受孕动物数、临床中毒表现和出现中毒体征的动物数。胎仔的观察结果，包括畸形类型及其他相关信息。

用合理的统计方法对下述指标进行统计分析：母体体重、体重增重（处死时母体体重－孕 6 d 体重）、子宫连胎重、体重净增重（处死时母体体重－子宫连胎重－孕 6 d 体重）、着床数、黄体数、吸收胎数、活胎数、死胎数及百分率、胎仔的体重及体长、有畸形的胎仔数（包括外观、骨骼和内脏畸形），有畸形

胎仔的窝数及百分率,计算动物总畸胎率和某单项畸胎率。对胎仔的相关指标统计应以窝为单位。

7 试验报告

试验报告中应包括以下具体信息:

- a) 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号;
- b) 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期;
- c) 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;
- d) 试验摘要;
- e) 受试物名称、剂型、生产日期(批号)、外观性状、配制所用溶媒和方法;
- f) 实验动物种属、品系、级别、数量、体重、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);
- g) 剂量和组别,包括选择剂量的原则或依据、剂量和组别、动物分组方式和每组动物数;
- h) 试验条件和方法,包括受试物给予方式和期限、试验周期、观察指标等;
- i) 试验结果:以文字描述和表格逐项进行汇总,包括母体体重、妊娠情况、黄体数、着床数、吸收胎数、活胎数、死胎数及百分率。胎仔的情况(体重、体长)、畸胎的类型(外观、骨骼和内脏)、数目及百分率,给出结果的统计处理方法;
- j) 试验结论:根据观察到的效应和产生效应的剂量水平评价是否具有致畸性,及畸形的类型。给出致畸作用、其他发育毒性终点及母体毒性的 LOAEL 和未观察到有害作用剂量(NOAEI)。

8 试验的解释

致畸试验检验动物孕期经口重复暴露于受试物产生的子代致畸性和发育毒性。试验结果应该结合亚慢性、繁殖毒性、毒物动力学及其他试验结果综合解释。由于动物和人存在物种差异,故试验结果外推到人存在一定的局限性。
