

食品安全国家标准

生殖毒性试验

1 范围

本标准规定了生殖毒性试验的试验方法和技术要求。

本标准适用于评价受试物的生殖毒性作用。

2 术语和定义

2.1 生殖毒性

对雄性和雌性生殖功能或能力的损害和对后代的有害影响。生殖毒性既可发生于妊娠期,也可发生于妊前期和哺乳期。表现为外源化学物对生殖过程的影响,例如生殖器官及内分泌系统的变化,对性周期和性行为的影响,以及对生育力和妊娠结局的影响等。

2.2 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。

2.3 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

凡受试物能引起生殖机能障碍,干扰配子的形成或使生殖细胞受损,其结果除可影响受精卵及其着床而导致不孕外,尚可影响胚胎的发生及发育,如胚胎死亡导致自然流产、胎仔发育迟缓以及胎仔畸形。如果对母体造成不良影响会出现妊娠、分娩和乳汁分泌的异常,也可出现胎仔出生后发育异常。

4 试验方法

4.1 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。

4.2 实验动物

实验动物的选择应符合国家标准和有关规定。首选大鼠,选用7周龄~9周龄,试验开始时动物体重的差异应不超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。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。每组应有足够的雌鼠和雄鼠配对,产生约 20 只受孕雌鼠。为此,一般在试验开始时两种性别每组各需要亲代(F_0 代)大鼠 30 只;在继续的试验中用来交配的各代大鼠[子一代(F_1 代)、子二代(F_2 代)以及子三代(F_3 代)]每种性别每组需要 25 只(至少每窝雌雄各取 1 只,最多每窝雌雄各取 2 只)。选用的 F_0 代雌鼠应为非经产鼠、非孕鼠。

4.3 剂量及分组

动物按体重随机分组,试验为至少设三个受试物组和一个对照组。应考虑受试物特性(如生物代谢和生物蓄积特性)的影响作用。如果受试物使用溶媒,对照组应给予溶媒的最大使用量。如果受试物引起动物食物摄入量和利用率的下降时,那么对照组动物需要与试验组动物配对喂饲。某些受试物的高剂量受试物组设计应考虑其对营养素平衡的影响,对于非营养成分受试物剂量不应超过饲料的 5%。

在受试物物理化和生物特性允许的条件下,最高剂量应使 F_0 代动物出现明显的毒性反应,但不引起动物死亡;中间剂量可引起轻微的毒性反应;低剂量应不引起亲代及其子代动物的任何毒性反应(可按最大未观察到有害作用剂量的 1/30,或人体推荐摄入量的 10 倍)。

4.4 实验动物处理

4.4.1 受试物的给予

4.4.1.1 试验期间,所有动物应采用相同的方式给予受试物;每日在同一时间段给予受试物,每周 7 d。受试物应在交配前连续给予两种性别的各代大鼠至少 10 周,并继续给予受试物至试验结束,其中子代的雌鼠和雄鼠在断乳后每日给予。各代大鼠给予的受试物剂量(按动物体重给予,mg/kg 体重或 g/kg 体重)、饲料和饮水相同。

4.4.1.2 根据受试物的特性或试验目的,选择合适的给予方式。首选掺入饲料,若受试物加入饲料或饮水中影响动物的适口性,则应选择灌胃给予受试物。

4.4.1.3 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,每周称体重 2 次,根据体重调整灌胃体积。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。

4.4.1.4 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,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),当受试物掺入饲料其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)。

4.4.2 交配

每次交配时,每只雌鼠应与从同一受试物组随机选择的单个雄鼠同笼(1:1 交配),直到检测到阴栓,或者经过 3 个发情期或 2 周。查到阴栓后应将雌、雄鼠分开,如果经过 3 个发情期或 2 周还未进行

交配也应将雌雄鼠分开,不再继续同笼。配对同笼的雌雄鼠应作标记。所有雌鼠在交配期应每天检查精子或阴栓,直到证明已交配为止。查到阴栓的当天为受孕 0 d。预计已受孕的雌鼠应分开放入繁殖笼中,孕鼠临产时应提供筑巢的垫料。

4.4.3 每窝仔鼠数量的标准化

将每窝仔鼠于出生后第 4 天调整至相同数量(每窝 8 只~10 只),尽量做到每窝内雌、雄数量相等,也可以窝内雌、雄数量不等,但各窝之间两性的鼠数应分别相同。原窝中多余的鼠应随机取出,而不应按体重选择。

4.4.4 观察代数

观察代数随受检目的而异,可作一代、二代、三代或多代观察。如果在两代生殖试验中观察到受试物对子代有明显的生殖、形态或毒性作用,则需要进行第三代生殖毒性试验,进一步观察受试物的生殖毒性作用。

4.5 一代、二代和三代生殖毒性试验法

4.5.1 一代生殖毒性试验法

一代生殖毒性试验示意图见图 1。

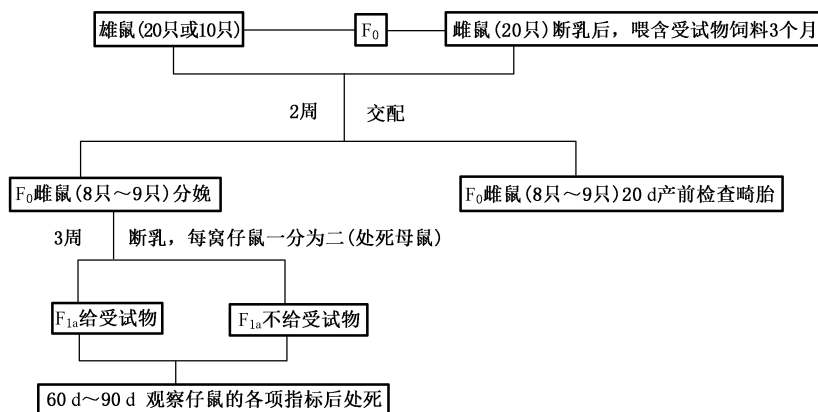


图 1 一代生殖毒性试验示意图

4.5.2 两代生殖毒性试验法

4.5.2.1 两代生殖毒性试验示意图见图 2。

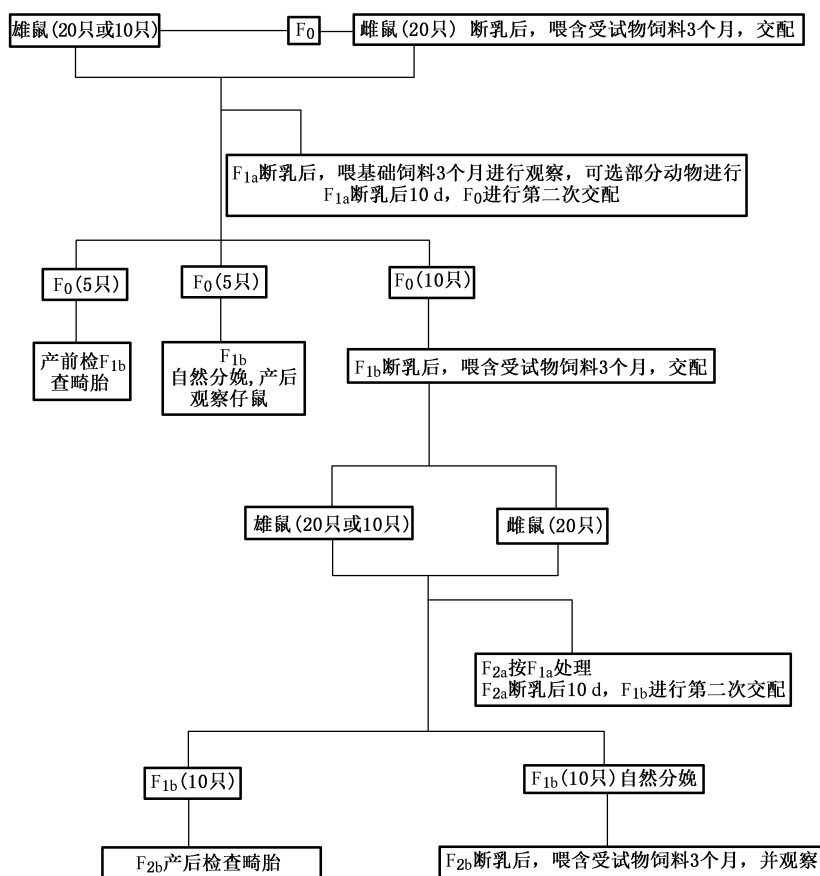


图 2 两代生殖毒性试验示意图

4.5.2.2 F_0 代断乳后, 给予受试物 3 个月, 雌—雄即可交配, 所产仔鼠为 F_{1a} 。 F_{1a} 断乳后不再给予受试物, 观察 3 个月。

4.5.2.3 F_{1a} 断乳后 10 d 将 F_0 再次交配, 所产仔鼠为 F_{1b} , 将 20 只孕鼠(F_0) 中 5 只产前 2 d~3 d 剖腹检查胎鼠有无畸形; 另 5 只自然分娩观察产后仔鼠情况; 作 10 只孕鼠自然分娩, 所产 F_{1b} 继续繁殖。

4.5.2.4 F_{1b} 断乳后, 给予含受试物饲料 3 个月, 进行交配, 所产 F_{2a} 在断乳后喂不含受试物的饲料, 观察 3 个月。

4.5.2.5 F_{2a} 断乳后 10 d 将 F_{1b} 再次交配, 产 F_{2b} 前将 F_{1b} 孕鼠分两群, 每群 10 只, 同 4.5.2.3。

4.5.3 三代生殖毒性试验法

三代生殖毒性试验法示意图见图 3。

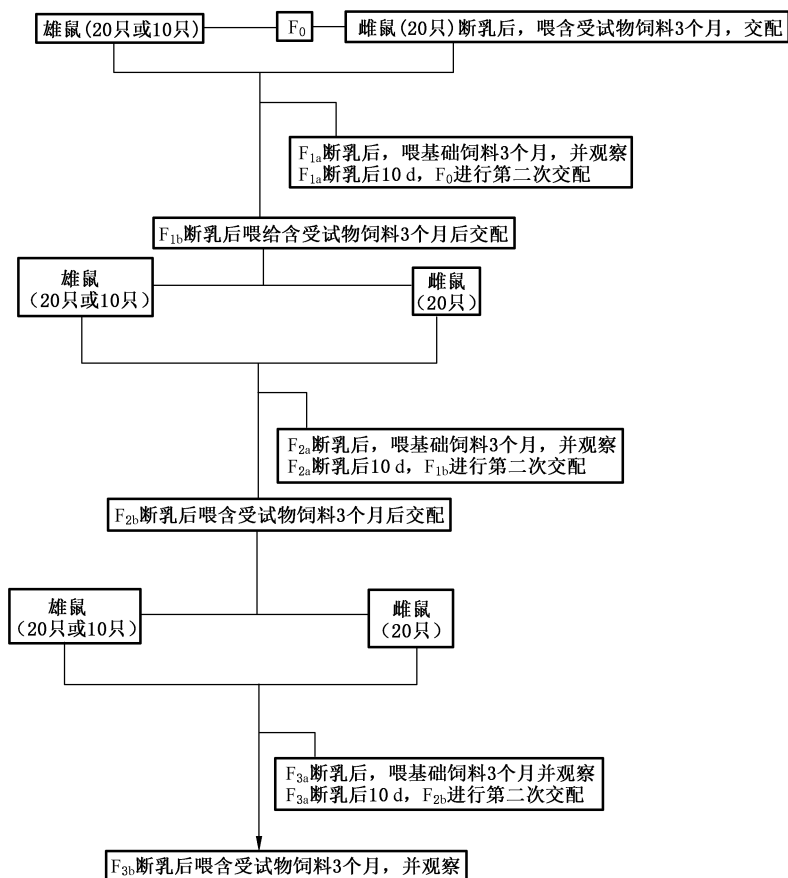


图3 三代生殖毒性试验示意图

4.5.4 亲代、一代、二代、三代繁殖试验

4.5.4.1 亲代、一代、二代、三代繁殖试验可参考 4.5.2.2、4.5.2.3 进行。

4.5.4.2 根据情况可繁殖两窝以上。

5 观察指标

5.1 对实验动物做全面的临床检查,记录一般健康状况、受试物的所有的毒性和功效作用所产生的症状、相关的行为改变、分娩困难或延迟的迹象、所有的毒性体征及死亡率,通过每日检查(F_0 、 F_1 代雌鼠)阴道和子宫颈,以及雌鼠的发情周期有无异常。

5.2 F_0 、 F_1 代和 F_2 代动物在给予受试物的第1天称重,以后每周称重2次,母鼠应在受孕的第0天、第7天、第14天和第21天称重,在哺乳期应同时称仔鼠的窝重。

5.3 在交配前及受孕期,记录每周摄食量,如经饮水给予受试物,还应记录每周饮水量。

5.4 试验结束时,根据试验设计,各代雄鼠均应对附睾的精子进行检查,对精子的形状、数量以及活动能力进行评价。精子的活动能力和精子形态,可只检查对照组和高剂量受试物组的各代雄鼠,每只动物至少检查200个精子。

5.5 在分娩后(哺乳0 d)应尽快检查记录每窝仔鼠的数量、性别、死产数、活产数及肉眼可见的异常,在出生当天死亡的,应尽可能检查其缺陷和死亡原因。记录活产数量、性别,并在出生当天对单个活产仔

鼠称重,此后在哺乳期的第4天、第7天、第14天和第21天,以及阴道开放或龟头包皮分开和试验结束时对仔鼠进行称重。用来进行交配的F₁代断乳鼠,观察并记录阴道开放或龟头包皮分开的日龄,观察性成熟情况。

5.6 试验结束时所有F₀、F₁代动物脏器称重:子宫(包括输卵管和子宫颈)、卵巢;睾丸、附睾;脑、肝、肾、脾和已知的靶器官。

5.7 试验结束时和试验期间死亡的所有F₀代动物均应作大体解剖和组织病理学检查,观察各种形态结构异常及病理改变,特别注意生殖器官。如果每窝仔鼠的数量足够,F₁代、F₂代(和F₃代)每窝每种性别至少取3只仔鼠进行同样检查。检查的器官及组织应包括子宫、卵巢、睾丸、附睾以及靶器官脏器。

6 数据处理和结果评价

6.1 繁殖指数

受孕率的计算见式(1):

$$\text{受孕率} = \frac{\text{怀孕动物数}}{\text{交配雌性动物数}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

妊娠率的计算见式(2):

$$\text{妊娠率} = \frac{\text{分娩有活体幼仔的动物数}}{\text{怀孕动物数}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

出生活仔率的计算见式(3):

$$\text{出生活仔率} = \frac{\text{出生时活的仔鼠数}}{\text{出生时仔鼠总数}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(3)$$

出生存活率的计算见式(4):

$$\text{出生存活率} = \frac{\text{产后4d仔鼠存活数}}{\text{出生时活的仔鼠数}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(4)$$

哺乳存活率的计算见式(5):

$$\text{哺乳存活率} = \frac{\text{21d断乳时存活的仔鼠数}}{\text{出生4d后存活的仔鼠数}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(5)$$

性别比的计算见式(6):

$$\text{性别比} = \frac{\text{仔鼠出生后雄鼠数}}{\text{仔鼠出生后雌鼠数}} \quad \dots\dots\dots(6)$$

6.2 数据处理

应将所有的数据和结果以表格形式进行总结,数据可以用表格进行统计,表中应显示每组的实验动物数、交配的雄性动物数、受孕的雌性动物数、各种毒性反应及其出现动物百分数。数据应进行统计分析,可采用适当的统计方法进行处理。

6.3 结果评价

逐一比较受试物组动物与对照组动物繁殖指数是否有显著性差异,以评定受试物有无生殖毒性,并确定其生殖毒性的未观察到有害作用剂量(NOEL)和最小观察到有害作用剂量(LOEL)。同时还可根据出现统计学差异的指标(如体重、观察指标、大体解剖和病理组织学检查结果等),进一步估计生殖毒性的作用特点。

7 试验报告

- 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、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：
 - a) 按性别和剂量组分别记录的毒性反应,包括繁殖、妊娠和发育能力的异常;
 - b) 试验期动物死亡的时间或试验动物是否生存到试验结束;
 - c) 每窝仔鼠的体重和仔鼠的平均体重,以及试验后期单只仔鼠的重量;
 - d) 任何有关繁殖,仔鼠及其生长发育的毒性和其他健康损害效应;
 - e) 观察到的各种异常症状的出现时间和持续过程;
 - f) 亲代(F₀)和选作交配的子代动物的体重数据;
 - g) 病理大体解剖的发现;
 - h) 病理组织学检查结果的详细描述;
 - i) 结果的统计处理。
- 7.9 试验结论:受试物生殖毒作用的特点,剂量反应关系,并得出生殖毒性的 NOAEL 和(或)LOAEL 结论等。

8 试验的解释

生殖毒性试验检验动物经口重复暴露于受试物产生的对雄性和雌性生殖功能的损害及对后代的有害影响,并从剂量-效应和剂量-反应关系的资料,得出 LOAEL 和 NOAEL。试验结果应该结合亚慢性试验、致畸试验、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,但也能初步确定人群的允许接触水平提供有价值的信息。