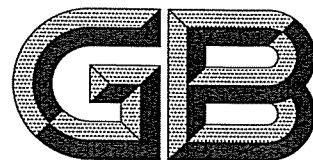


ICS 13.300;11.100
A 80



中华人民共和国国家标准

GB/T 21758—2008

化学品 两代繁殖毒性试验方法

Chemicals—Test method of two-generation reproduction toxicity study

2008-05-12 发布

2008-09-01 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

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试指南 No. 416(2001年)《两代繁殖毒性试验》(英文版)。

本标准作了下列编辑性修改:

- 增加了范围部分;
- 计量单位改成我国法定计量单位;
- 删除 OECD 的参考文献部分。

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。

本标准负责起草单位:中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本标准参加起草单位:宁波出入境检验检疫局、广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:孙金秀、陈小青、马中春、龙再浩、林振兴、许崇辉、程树军。

OECD 引言

1. 1995年6月,OECD生殖发育毒性工作组在哥本哈根召开了讨论会议,要求对现行的OECD生殖发育毒性试验指南进行更新,制定原指南中没有的新的发育毒性试验终点。工作组建议应根据美国和德国的提议对两代繁殖毒性试验进行修订。工作组对本指南的所有主要修订项目达成一致。

2. 提供关于受试样品对雌性和雄性动物生殖系统的整个生殖功能和行为作用的一般性资料:如性腺功能、动情周期、交配行为、受孕、妊娠、分娩、哺乳、断乳以及子代的生长发育情况等,也可提供新生仔疾病、死亡、出生前后发育毒性等方面取得初步资料,为下一步的毒性试验提供参考。除研究F1子代的生长发育外,本试验亦可对F2子代以及F2子代的雌性和雄性的生殖系统整个生殖和行为生长发育进行系统评价。为进一步全面获得发育毒性和功能缺陷方面的资料,有时可能需要附加进行一些发育毒性和/或发育神经毒性试验或用其他试验指南在其他试验中研究这些终点。

化学品 两代繁殖毒性试验方法

1 范围

本标准规定了化学品两代繁殖毒性试验的范围、试验基本原则、试验方法、试验数据和报告。
本标准适用于检测化学品的繁殖毒性。

2 试验基本原则

2.1 本试验将雌、雄动物分为有一定梯度的不同剂量组。P代雄鼠要在生长期染毒受试物且至少要覆盖一个完整的精子形成周期(小鼠约56 d,大鼠70 d)以诱发对生精过程的有害作用。可通过测定一些精子参数(例如精子形态和精子活力)和组织制品及详细的组织病理学检查来检测受试物对精子的影响。如果可从已完成的试验期足够长(例如90 d)的重复染毒试验中获得精子生成的相关数据,本试验则不再需要评价雄性亲代(P)。但为了以后进行的评价,建议保存雄性亲代(P)精子样品和记录数据。为评价受试物对发情期的有害作用,P代雌鼠应从生长期开始染毒并持续几个完整的动情期再交配。雌、雄鼠在交配期继续给予受试物。亲代雌鼠(P)在妊娠期也要继续染毒并持续到子代F1断乳。子代F1断乳后要继续给予受试物,并从子代F1的生长期、成熟期、交配后、子代F2出生,直至F2断乳。

2.2 应对所有动物进行临床观察毒性症状和病理学检查,特别注意雌、雄动物生殖系统整体机能状态和表现及对子代生长发育的影响。

3 试验方法

3.1 试验准备

3.1.1 动物品系的选择

首选大鼠。如用别的品系,则应给出适当的理由并作一些必要的改进。但不应使用低生育率或已知具有高发育缺陷率的品系。试验开始前,应尽可能降低试验动物间的体重变异使之不超过相同性别平均体重的20%。

3.1.2 饲养条件

试验动物房的温度应保持在 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 。虽然相对湿度至少在30%~70%之间,但最好控制在50%~60%。应采用人工照明,12 h明暗交替。实验室常规饲料喂养,不限饮水。经饲料染毒时,应确保受试物在饲料中混合均匀。

试验动物可单笼饲养,也可按性别少量群养。交配过程应从饲养笼取出,放入合适的笼具内进行便于确认交配情况。确定交配后,应将雌鼠放在分娩笼或产笼里单独饲养;也可按少量一组进行群养,在分娩前1 d或2 d移入分娩笼单养。在分娩临近时,应向孕鼠提供合适的垫窝料。

3.1.3 动物准备

选择处于年轻、健康的、没有接受过其他试验的动物。试验前适应实验室环境至少5 d。试验动物应标明种属、品系、来源、性别、体重和(或)周龄。试验之前应明确所用动物的亲属关系以避免发生同胞交配。应将动物随机分为对照组和处理组(推荐按体重进行随机分组)。笼具放置位置也应尽可能避免由于安放位置不同而对试验造成影响。每个动物都要有单独唯一的标记。亲代(P)动物应在开始染毒前完成。子代F1,则在动物断乳并选择用于交配前完成。所有被选的子代F1动物,要记录和保存其窝别来源的信息。当仔鼠需要称重或进行某检查时,出生后应尽可能早地标上唯一的记号。

亲代(P)动物应从断乳后5周~9周开始染毒。所有试验组动物应是尽可能相近的体重和周龄。

3.2 试验程序

3.2.1 动物性别和数量

染毒组和对照组应有足够数量的动物以保证分娩前约有 20 只孕鼠。对接触后导致不育、高剂量组毒性过大、死亡等的物质,有时不一定能获得 20 只孕鼠。只有足够数量孕鼠才能对生育力、受孕、母鼠的行为、哺乳,以及子代 F1 从胎儿至成熟期的生长发育、子代 F2 出生到断乳可能产生的潜在影响作出有价值的评价。因此,如果不能获得预期的怀孕动物数(比如 20 只),试验结果虽然不一定就无效,应当根据具体情况进行具体分析。

3.2.2 受试物制备

推荐使用经口途径对试验动物进行染毒(例如掺入饲料、饮水或灌胃),需要时也可通过其他途径染毒(如经皮或吸入)。

应将受试物溶解或悬浮到一定的溶剂里。建议首选水溶液或水悬浮液,其次再考虑用油溶液或乳化液(例如玉米油)和其他可能的溶剂。在用其他的溶剂时,要了解该溶剂的毒性,并测定受试物在该溶剂里的稳定性。

3.2.3 剂量设计

最少应设三个染毒组和一个同步对照组。除非受到理化特性和生物效应的限制,所选的最高剂量应该引起毒性但不导致亲代动物死亡和承受严重痛苦。试验中,如果出现死亡,亲代(P)动物的死亡率应控制在 10% 以下。另外两组应设计递减的剂量水平,能显示出任何与染毒处理有关的作用和无可见有害作用水平(NOEL),或者,以接近检测限的剂量进行试验,以便测定基准剂量(BMD)。递减组间距通常选择 2~4 倍,如果要设置第 4 个剂量组,该剂量组的组距则可以很大(例如超过 10 倍)。在喂饲试验中,剂量组的间距不能超过 3 倍。剂量的选择要考虑到已有的染毒资料,尤其是重复染毒试验资料。受试物或相关物质的代谢和动力学方面的所有信息也要作为参考,它还可以帮助确定给药设计是否合适。

对照组不给予任何处理。如果使用了溶剂,需设溶剂对照组。对照组除不给予受试物外,应与染毒组动物处理方式相同应给予溶剂对照组最大的溶剂量。如果受试物是通过喂饲给予并导致摄入量或利用率降低,就有必要考虑设立一个饲料配对对照组。但从设计评价食物摄入减少对生殖参数影响的对照试验所获得的数据可以替代饲料配对对照组。

应考虑溶剂和其他添加物对受试物吸收、分布、代谢或滞留的影响;对化学性质的影响,以免改变受试物的毒性特征;以及对动物食物或水摄入量或动物营养素状况的影响。

3.2.4 限量试验

如果通过本试验规定的操作受试物的经口毒性试验中至少有一个剂量水平高于 1 000 mg/(kg·d),或通过饲料和饮水染毒所接触剂量相当于该剂量时,没有可观察到的毒性效应或基于结构和(或)代谢的相关化合物的数据表明没有毒性,就没有必要进行几个剂量的完整试验。当人类暴露资料显示需要更高的经口染毒剂量时,则不可使用限量试验。对于其他的染毒途径,比如吸入或经皮染毒,则常常需要参考受试物的理化特性如溶解性,常常能提示可达到的最高浓度。

3.2.5 染毒操作

首选经口途径染毒(饲料、饮水或灌胃法)。每周染毒 7 d。如果使用了其他的染毒途径,就要提供理由并进行适当的调整。整个试验过程中所有的动物必须采用相同的给样方式。如果受试物是采用灌胃法给予,就要使用胃管。每次灌胃液量应不超过 1 mL/100 g(如果采用的是玉米油,则最大体积为 0.4 mL/100 g);如果是水溶液,则最大体积可提高到 2 mL/100 g。试验过程中,除了高浓度下会加剧作用的刺激性或腐蚀性物质浓度不能太高外,应通过调整浓度将测试体积的差异性降到最低以保证所有剂量水平的体积是恒定的。如果使用的是灌胃法,哺乳期仔鼠是通过奶液间接摄取受试物,直到它们断乳后才能直接给予受试物。当采用饲料或饮水给予受试物时,在泌乳期的后期,仔鼠开始自己采食,仔鼠就可以直接摄取受试物。

当采用饲料或饮水给予受试物时,最重要的一点是要确保受试物的添加比例不会干扰动物正常的营养和水平衡。当受试物通过饲料给予时,可用恒定浓度(mg/kg)或根据动物体重计算出恒定剂量水平来表示接触程度;不论选择哪种,都应附上详细说明。当采用灌胃法给予受试物时,应每天在同一时间染毒,并且,每周至少根据体重调整一次染毒量以使剂量维持在恒定水平。当根据体重调整灌胃剂量时,应考虑受试物在胎盘中的分布情况。

3.2.6 试验过程

亲代(P)雌、雄鼠应从5周龄~9周龄时开始染毒。子代F1雌、雄鼠则从断乳后开始每日染毒;需要注意的是,在通过饲料或饮水给予受试物时,子代F1直接染毒受试物可能于已在哺乳期开始。对于亲代P和子代F1的雌、雄鼠,在交配前都要持续染毒至少10周,2周交配期也应染毒。对不再需要评价生殖作用的雄鼠,应将其人道处死并进行解剖检查。亲代(P)雌鼠则应继续染毒,从怀孕期直到子代F1断乳。如果已有资料表明受试物具有毒性、代谢诱导或生物富集信息,就要调整相应的染毒计划。通常,应根据每只动物的当时体重来确定各自的剂量,但是,对妊娠后三分之一时间的剂量调整应特别小心谨慎。

亲代P和子代F1雌、雄鼠应一直染毒至试验结束。当不再需要亲代P和子代F1雌、雄鼠时,应将其全部人道处死。人道处死断乳后没用来交配的F1子代和所有F2子代仔鼠。

3.2.7 动物交配

3.2.7.1 亲代P交配

每次交配时,雌鼠应始终与同剂量组但不是同窝的一只雄鼠合笼(即1:1配对)直至受孕或最长2周。每天检查母鼠阴道是否有精子或阴栓,发现阴道有精子或阴栓的那天为妊娠0d。如果交配不成功,则可考虑用同一组的已经证明交配成功的其他雄鼠与雌鼠进行重新交配。配对的动物应有明确的标识和记录,要避免近亲交配。

3.2.7.2 子代F1交配

子代F1交配时,要在断乳时从同一窝里至少挑出雌、雄鼠各1只并和同剂量组但不同窝的其他动物进行交配以繁殖出子代F2。如果各窝间的动物在体重和外表上没有显著性差异,应按随机原则从每窝里选出动物进行交配。如果有显著性差异,就要从每窝里选出最具代表性的动物。从实用性上讲,最好是按体重来进行选择,但不排除以表观特征进行选择。F1只有性成熟后,才能开始进行交配。

未受孕的一对动物,应明确未受孕的原因。其中包括可分别与已证实有生育能力的动物再进行一次交配、对生殖器官的组织病理学检查、发情周期和生精机能的检查。

3.2.7.3 二次交配

有时,首次交配时窝的大小出现与处理相关的改变,可以的不确定的影响,建议让亲代P或子代F1动物进行二次交配以繁殖出第二窝后代。方法是将没有繁殖出后代的雌鼠或雄鼠与证实具有生育能力的异性鼠进行二次交配。如果要亲代P或子代F1都进行第二窝的繁殖,就要在最后一窝断乳后约一周再进行二次交配。

3.2.8 窝的大小

应允许动物正常产仔,和哺育子代至断乳期。对窝的标准化,但方法没有明确的规定;标准化时,需详细描述所使用的方法。

3.3 观察结果

3.3.1 临床观察

必须每日进行临床观察。灌胃法试验时,观察时间应在染毒后预期反应高峰期。应详细记录动物的行为改变、难产或滞期分娩的表现和所有中毒体征。另外,每周至少应进行一次详细的检查,若在称重时进行则更方便。另外,每日两次(周末每日一次)观察动物的发病和死亡情况。

3.3.2 亲代动物的体重和食物/水的消耗量

灌胃观察时,亲代动物(P和F1)应在开始染毒当天称重,此后至少每周一次。亲代雌鼠(P和F1)

应在妊娠期第 0 天、第 7 天、第 14 天和第 20 天或 21 天称重,哺乳期应在测量窝重的当天和处死动物当天进行称重。应逐一报告每只成年动物的这些观察结果。在交配前期和妊娠期,至少应每周测量食物的最小摄入量。如果受试物是通过饮水给予的话,也至少应每周测量一次水的消耗量。

3.3.3 发情周期

对 P 和 F1 雌鼠发情期的长短与状态可在交配前和交配期任何时间进行阴道涂片观察结果来评价,直到得到交配成功的证据为止。如果阴道涂片中发现有阴道/宫颈细胞,要鉴别出是黏膜紊乱还是或假性妊娠造成的。

3.3.4 精子参数

试验结束时,应记录所有 P 和 F1 雄鼠睾丸和附睾的重量,取一侧器官固定用于组织病理学检查。对于每组 P 和 F1 雄鼠中的不少于 10 只雄鼠,未固定的睾丸和附睾以用于测定生殖细胞抗均一化和附睾尾精子的计数。收集附睾尾或输精管内的精子评价精子活力和精子形态。如果观察到与处理有关的影响,或在其他的试验中发现了受试物对精子生成有影响,每个剂量组的所有雄鼠都应进行精子评价;否则,精子计数只限于对照组和高剂量组的 P 与 F1 的动物。

应计数睾丸抗均一化精细胞和附睾尾精子的总数。可通过用于进行定性评价的悬浮液中的精子浓度和体积计数,或从剁碎或匀浆的剩余附睾尾组织液中回收的精子数来计算附睾尾的精子储存量。所有剂量组中被选择的雄鼠在处死后立即进行计数,除非已经进行了影像记录或数字记录,或者标本已被冷冻用于以后的分析。应先对最高剂量组和对照组进行分析。如最高剂量组未见与处理相关的影响(例如对精子计数、精子活力和精子形态的研究),则不必分析其他剂量组。反之,若最高剂量组发现与处理相关的影响,则其他剂量组也应作进一步的分析评价。

在处死动物后应立即评价附睾(或输精管)的精子活力或进行录像。精子的回收要尽量减少损伤,并用大家可接受的方法进行稀释作精子活动性分析。要主观或客观地测定进行性活动精子的百分比。如果使用了计算机辅助运动分析,精子进行性活力的产生依赖于用户所定义的平均通道速率和直线或线性指数的阈值。如果对样品进行了录像或在解剖时进行了拍照,随后只需对对照组和高剂量组 P 和 F1 动物进行分析;如果观察到了与处理有关的影响,其他低剂量组也应进行评价。如果没有进行录像或拍照,解剖时应对所有剂量组的样品进行分析。

应对附睾(或输精管)的精子进行形态学分析。应用固定、湿式样品检查精子(每个样品至少 200 个),按正常或不正常分类。不正常的精子形态包括精子融合、游离头、畸形头和(或)畸形尾。在处死每个剂量中所选雄鼠后应立即进行精子形态学分析,或进行录像或拍照,备于以后分析。涂片固定后,也可在以后进行阅片。在这些情况下,应先对最高剂量组和对照组进行分析。如最高剂量组没有发现与处理有关的影响(例如对精子形态的影响),则不必分析其他剂量组。反之,若最高剂量组发现与处理有关的影响,则其他剂量组也应作分析评价。

如果在 90 d 或以上的系统性毒性试验中已经对精子进行了上述所有参数的检查,在两代繁殖试验中就没必要重复测定。不过,建议保存亲代 P 精子的样品或数字化记录以便以后必要时可进行评价。

3.3.5 子代

在分娩后(泌乳当天)应尽可能早地进行检查,包括幼仔的数量、性别、死产、活产以及异常等。如在分娩当天发现死仔,检查有无缺陷、导致其死亡的原因并加以保存。活仔鼠于出生当天(泌乳当天)或出生后第 1 天汇总活仔的数量并逐个称重,并在泌乳的第 4 天、第 7 天、第 14 天和第 21 天进行称重。同时,还要记录所观察到的母体和子代的身体或行为异常。

子代的身体发育主要通过体重增加来记录。其他的体格参数(例如开耳、开眼、出牙、毛发生长)可以提供补充信息,但这些信息最好与性成熟资料(例如阴道开口或包皮分离时的日龄和体重)一起评价。如果未单独设计相关功能(例如运动活力,感觉功能,反射功能的发育)试验,特别是与性成熟有关的功能检查,就要在 F1 子代断乳前和(或)断乳后进行这些功能的检查。应检查断乳后被选作交配的子代 F1 动物阴道开口和包皮分离的日龄。如果子代 F1 的性别比或性成熟时间出现改变,应在子代 F2 出生

当天测量肛门与生殖器间的距离。

如果动物出现了明显有害作用(例如体重增加明显缓慢等),这些组就可以不进行功能检查。如果进行功能检查,不应选择将进行交配的仔鼠。

3.3.6 大体解剖

试验结束时和试验期间死亡的所有亲代(P和F1)动物、所有外观畸形或出现临床症状的仔鼠,以及从F1和F2子代两代中随机抽取的至少每窝雌、雄各一只仔鼠一只/一个性别/一窝,都应肉眼观察有无结构异常和病理学改变,特别是生殖器官的形态异常或病理改变。死亡或因濒死被人道处死的仔鼠在被浸泡固定前也应检查有无缺陷和(或)死亡原因并保存标本。

检查所有初产母鼠的子宫,观察着床位置及着床数量。

3.3.7 器官称重

试验结束时,应对所有的P和F1动物进行称重并测量以下器官的重量(成对的器官应分别称重):子宫,卵巢;睾丸,附睾(附睾整体和附睾尾);前列腺;精囊(内含凝固腺)及其液体(作为一个单位);脑、肝、肾、脾、垂体、甲状腺、肾上腺和已知的靶器官。

试验结束时要对F1和F2中被选作大体解剖检查的仔鼠进行称重并对随机抽取的每窝每性别一只动物进行脑、脾和胸腺的称重。

如果可行,应结合其他重复染毒试验的观察结果来评价大体解剖和器官重量的意义。

3.3.8 组织病理学检查

3.3.8.1 亲代动物

应将亲代P和F1动物的以下器官和组织或其代表性样本固定并保存,以便于进行组织病理学检查。

——阴道,带有子宫颈的子宫和卵巢(用合适的固定剂保存);

——一侧睾丸[用布英防腐液(Bouin's)或类似的固定剂保存],一侧附睾,精囊,前列腺和凝固腺;

——从被选作交配的所有P和F1动物中已经确认的靶器官。

应对高剂量组 and 对照组被选作交配的所有P和F1动物进行以上所列器官和组织的全面组织病理学检查。亲代P动物的卵巢检查则作为备选。有时,为了更好阐明NOAEL,对于低剂量组和中剂量组的器官改变证明与处理有关时,该器官也应进行检查。另外,还应应对低剂量组和中剂量组动物的生殖器官怀疑存在生殖能力减退(例如不能进行交配、受孕,不能生产或分娩出正常子代,或动情周期、精子数量、活力或形态受到了影响)的动物进行组织病理学检查。应检查所有肉眼可见的损害如萎缩或肿瘤。

应对睾丸进行详细的组织病理学检查[例如用布英防腐液(Bouin's)固定,进行石蜡包埋并切取4 μm~5 μm厚的切片]以鉴别出与处理有关的影响,如滞留的精细胞、缺失生殖细胞层或类型不明以及多核巨细胞或生精细胞成堆进入生精管腔内。完整的附睾检查应包括头、体和尾,可通过附睾的纵切面检查。应根据白细胞浸润、细胞类型的改变程度、异常细胞类型以及精子被吞噬状态来评价附睾。可用对氨基水杨酸(PAS)和苏木精对雄性动物生殖器官进行染色和检查。

泌乳后的卵巢组织病理学检查应包括初始和生长卵泡以及泌乳期的黄体。组织病理学检查应对原始软泡数减少进行定性。应对F1代雌鼠进行原始卵泡的定量分析;动物数、卵巢切片的选择以及切片样本大小均应符合所用评价程序统计学要求。该项检查应包括原始卵泡的计数(而这种原始卵泡常和小的生长卵泡混合在一起),并将染毒组和对照组的进行比较。

3.3.8.2 断乳动物

应将所有具有外部缺陷或临床症状的仔鼠,或从未被选作交配的F1和F2代中随机挑出的每窝每性别一只仔鼠中,大体检查所见的异常组织和靶器官,进行固定并保存以用于组织病理学检查。在对保存的组织进行全面组织病理学检查时要着重检查生殖系统的器官。

- e) 被处死的亲代动物的体重以及绝对和相对器官重；
 - f) 临床症状、严重程度和持续时间(是否可逆)；
 - g) 试验过程中的死亡时间或动物是否存活到试验结束；
 - h) 按性别和剂量组分别记录的毒性反应,包括交配成功率、生育力、受孕率、活产率、出生率、生育率和泌乳率;报告中应有用于计算这些指数的动物数；
 - i) 对生殖、子代以及出生后生长等方面的毒性作用或其他作用；
 - j) 大体解剖所见；
 - k) 所有组织病理学检查所见的详细描述；
 - l) 周期正常的 P 和 F1 的雌性动物数以及周期长度；
 - m) 附睾尾的精子总数,进行性活动精子的百分比,形态学上正常的精子百分比以及每种异常精子的百分比；
 - n) 交配、交配成功的时间,包括交配前的天数；
 - o) 妊娠期的长度；
 - p) 着床数、黄体数和胎仔数；
 - q) 活产数和着床后又丢失的数量；
 - r) 如果统计了发育不全的幼仔数,就应报告其中具有大体可见异常的幼仔数；
 - s) 幼仔体格方面的数据和出生后的其他发育数据,应对评价的体格指标进行说明；
 - t) 如果可能,则要提供幼仔和成年动物的功能检查数据；
- 合适的结果统计学处理。

4.3.6 结果讨论。

4.3.7 结论,包括对母鼠和幼仔影响的 NOAEL 值。

4.4 试验结果的解释

本试验可反映动物在整个生殖周期里多次接触某一受试样品后对繁殖功能所产生的影响。特别是试验能提供关于生殖机能参数、子代生长发育和存活的数据。试验结果解释时,应结合亚慢性试验、致畸试验、毒代动力学试验和其他试验的结果进行综合分析。常常能用于评价该化学物是否需要进一步研究,但试验结果外推到人仍存在着一定的局限性。试验结果能提供无作用剂量水平和制定人体安全接触水平依据。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
化 学 品 两 代 繁 殖 毒 性 试 验 方 法
GB/T 21758—2008

*

中 国 标 准 出 版 社 出 版 发 行
北 京 复 兴 门 外 三 里 河 北 街 16 号
邮 政 编 码 : 100045

网 址 www.spc.net.cn

电 话 : 68523946 68517548

中 国 标 准 出 版 社 秦 皇 岛 印 刷 厂 印 刷
各 地 新 华 书 店 经 销

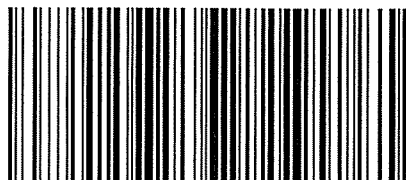
*

开 本 880×1230 1/16 印 张 0.75 字 数 16 千 字
2008 年 7 月 第 一 版 2008 年 7 月 第 一 次 印 刷

*

书 号 : 155066 · 1-32171

如 有 印 装 差 错 由 本 社 发 行 中 心 调 换
版 权 专 有 侵 权 必 究
举 报 电 话 : (010)68533533



GB/T 21758—2008