



中华人民共和国国家标准

GB 15193.25—2014

食品安全国家标准 生殖发育毒性试验

2014-12-01 发布

2015-05-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

食品安全国家标准 生殖发育毒性试验

1 范围

本标准规定了生殖发育毒性试验的基本试验方法和技术要求。

本标准适用于评价受试物的生殖发育毒性作用。

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雌性妊娠期,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,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。

2.4 未观察到有害作用剂量

通过动物试验,以现有的技术手段和检测指标未观察到任何与受试物有关的毒性作用的最大剂量。

2.5 最小观察到有害作用剂量

在规定的条件下,受试物引起实验动物组织形态、功能、生长发育等有害效应的最小作用剂量。

3 试验目的和原理

本试验包括三代(F0、F1 和 F2 代)。F0 和 F1 代给予受试物,观察生殖毒性,F2 代观察功能发育毒性。提供关于受试物对雌性和雄性动物生殖发育功能影响:如性腺功能、交配行为、受孕、分娩、哺乳、断乳以及子代的生长发育和神经行为情况等。毒性作用主要包括子代出生后死亡的增加,生长与发育的改变,子代的功能缺陷(包括神经行为、生理发育)和生殖异常等。

4 试验方法

4.1 受试物

受试物应首先使用原始样品,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

4.2.1 动物选择

实验动物的选择应符合 GB 14922.1 和 GB 14922.2 的有关规定。选择已有资料证明对受试物敏感的动物物种和品系,一般啮齿类动物首选大鼠,避免选用生殖率低或发育缺陷发生率高的品系。为了正确地评价受试物对动物生殖和发育能力的影响,两种性别的动物都应使用。所选动物应注明物种、品系、性别、体重和周龄。同性别实验动物个体间体重相差不超过平均体重的±20%。选用的亲代(F0代)雌鼠应为非经产鼠、非孕鼠。

4.2.2 实验动物数量

为了获得具有统计学要求的基本试验数据,正确地评价受试物对动物生殖发育过程(包括F0代动物生殖、妊娠和哺育的过程,子一代(F1代)动物从出生到成熟过程中的吸乳、生长发育情况,以及子二代(F2代)动物从出生到断乳的生长发育过程相关指标)可能引起的毒性作用,需保证每个受试物组及对照组都能至少获得20只孕鼠。一般在试验开始时两种性别每组各需要30只(F0代),在后续的试验中用来交配的动物每种性别每组各需要25只(F1代)(至少每窝雌雄各取1只,最多每窝雌雄各取2只)。

4.2.3 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,方可进行生殖发育毒性试验。

4.2.4 动物饲养环境

实验动物饲养条件、饮用水、饲料应符合GB 14924、GB 14925、GB 5749的有关规定。实验动物按单笼或按性别分笼饲养,自由饮食、饮水。孕鼠临近分娩时,应单独饲养在分娩笼中,需要时笼中放置造窝垫料。

4.3 剂量及分组

动物按体重随机分组,试验至少设三个受试物组和一个对照组。如果受试物使用溶剂,对照组应给予溶剂的最大使用量。如果受试物引起动物食物摄入量和利用率下降时,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%。

在受试物理化和生物特性允许的条件下,最高剂量应使F0和F1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。如果受试物的毒性较低,1 000 mg/kg体重的剂量仍未观察到对生殖发育过程有任何毒副作用,则可以采用限量试验,即试验不再考虑增设受试物其他剂量组。若高剂量的预试验观察到明显的母体毒性作用,但对生育无影响,也可以采用限量试验。

4.4 试验步骤

4.4.1 受试物给予

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;如受试物经灌胃给予,灌胃频次按每天1次,每周7天给予受试物。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,可将受试物掺入饲料、饮水或灌胃给予。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。受试物应现用现配,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,每周称体重两次,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5%,若超过5%时(最大不应超过10%),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;亦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亦可表示为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 试验方法

选用断乳后7周~9周的F0代雌、雄鼠,适应3 d~5 d后开始给予受试物,至交配前至少持续10周。交配结束后,对F0代雄鼠进行剖检。在3周交配期、妊娠期,直到子代F1断乳整个试验期间,F0代雌鼠每天给予受试物。F1代仔鼠断乳后,给予受试物,并一直延续直到F2代断乳。试验期间根据受试物的代谢和蓄积特性,可适当调整给予剂量(试验程序见表1)。

表1 大鼠生殖发育试验程序

试验周期	亲代(F0)	子一代(F1)	子二代(F2)
第1周至第10周末	给予受试物	—	—
第11周至第13周末	交配(给予受试物)	—	—
第14周至第16周末	妊娠期给予受试物,妊娠结束后处死雄鼠	—	—
第17周至第19周末	哺乳期给予受试物,哺乳结束后处死雌鼠	出生后4 d,每窝调整为8只仔鼠,进行仔鼠生理发育观察	—
第20周至第29周末	—	给予受试物	—
第30周至第32周末	—	交配(给予受试物)	—
第33周至第35周末	—	妊娠期给予受试物,妊娠结束后处死雄鼠	—
第36周至第38周末	—	哺乳期给予受试物,哺乳结束后处死雌鼠	出生后4 d,每窝调整为8只仔鼠,进行仔鼠生理发育观察
第39周至试验结束	—	—	仔鼠生理发育观察 仔鼠神经行为检测

4.4.3 交配

4.4.3.1 生殖发育毒性试验可用 1:1(1 雄:1 雌)或 1:2(1 雄:2 雌)交配。

4.4.3.2 每次交配时,每只雌鼠应与从同一受试物组随机选择的单只雄鼠同笼(1:1 交配),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,并在证明已交配后尽快将雌、雄鼠分开。查到精子或阴栓的当天为受孕 0 d。

4.4.3.3 子代 F1 大鼠鼠龄 13 周才可交配。对子代 F1 的交配,同一受试物组中每窝随机选择与另一窝仔鼠 1:1 交叉交配产生子代 F2。参与交配的仔鼠,每窝雌、雄至少各有 1 只,且应随机抽出,而不应按体重选择。没有被选中的 F1 代雌性和雄性仔鼠至 F2 代仔鼠断乳时处死。

4.4.3.4 如果经过 3 个发情期或两周仍未交配成功,应将交配的雌、雄鼠分开,不再继续同笼。同时应对不育的动物进行检查,分析其原因。另外,也可将未成功交配的动物与证实过生育功能正常的动物重新配对,并在需要时进行生殖器官的病理组织学、发情周期和精子发生周期的检查。

4.4.3.5 由于受试物的毒性作用导致窝仔鼠数目无法达到试验要求,或在第一次交配过程中观察到可疑的变化和结果时,可进行亲代(F0 代)或子一代大鼠(F1 代)的第二次交配。第二次交配时,推荐使用未交配的雌(雄)大鼠与已交配过的雄(雌)大鼠进行。第二次交配一般在第一次交配所产幼鼠断乳后 1 周进行。

4.4.4 每窝仔鼠数量的标准化

F0 和 F1 代母鼠妊娠和哺乳期间给予受试物,断乳期结束后处死。F1 代仔鼠出生后第 4 天,采用随机的方式(而不是以体重为依据),将每窝仔鼠数目进行调整,剔除多余的仔鼠,达到每窝仔鼠性别和数目的统一。每窝尽可能选 4 只雄鼠和 4 只雌鼠,也可根据实际情况进行部分调整,但每窝应不少于 8 只幼鼠。F2 代仔鼠按照同样的方式进行调整。

5 观察指标

5.1 对实验动物做全面的临床检查,记录受试物毒性作用所产生的体症、相关的行为改变、分娩困难或延迟的迹象等所有的毒性指征及死亡率。

5.2 交配期间应检查雌鼠(F0 和 F1 代)的阴道和子宫颈,判断雌鼠的发情周期有无异常。

5.3 交配前和交配期,实验动物摄食量可每周记录一次,而妊娠期间可考虑逐日记录。如受试物通过掺入饮水方式给予,则需每周计算一次饮水消耗量。产仔后,母鼠的摄食量也应记录,时间可选择与每窝仔鼠称量体重时同时进行。

5.4 F0 和 F1 代参与生殖的动物应在给予受试物的第 1 天进行称重,以后每周称量体重一次,逐只记录。

5.5 试验结束时,选取 F0 和 F1 代雄鼠的附睾,进行精子形态、数量以及活动能力的观察和评价。可先选择对照组和高剂量组的动物进行检查,每只动物至少检查 200 个精子。如检查结果有提示,则进一步对低、中剂量组动物进行检查。

5.6 为确定每窝仔鼠数量、性别、死胎数、活胎数和是否有外观畸形,每窝仔鼠应在母鼠产仔后尽快对其进行检查。死胎、哺乳期间死亡的仔鼠以及产后第 4 天由于窝标准化而需处死的仔鼠的尸体,均需要妥善保存并做病理学检查。

5.7 对明显未孕的动物,可处死后取其子宫,采用硫化铵染色等方法检查着床数,以证实胚胎是否在着床前死亡。

5.8 存活的仔鼠在出生后的当天上午、第 4 天、第 7 天、第 14 天和第 21 天分别进行计数和体重称量,并观察和记录母鼠及子代生理和活动是否存在异常。

5.9 以窝为单位,检查并记录全部F1代仔鼠生理发育指标,建议选择断乳前耳廓分离、睁眼、张耳、出毛、门齿萌出时间,以及断乳后雌性阴道张开和雄性睾丸下降的时间等。具体观察时间和频次可根据试验所用大鼠品系特点确定(见表2)。

表2 F1代仔鼠生理发育指标

生理发育指标	观察时间和频次		
	断乳前	断乳后至性成熟	性成熟后
体重、临床表现	每1周一次	每两周一次	每两周一次
脑重	出生后第11天		试验结束
性成熟	—	适当时间	—
其他发育指标	相应的适当时间	—	—

5.10 各试验剂量组随机选取一定数目、标记明确的F2代仔鼠,分别进行相关生理发育和神经行为指标测定。检测的生理发育、神经行为指标以及相应的实验动物数目见表3,其中生理发育指标检查时间和频次同F1代仔鼠。神经行为发育指标的检测分别于F2仔鼠出生后第25天±2 d和第60天左右进行。在这两个发育阶段所采用的认知能力试验方法有所区别,建议选择有针对性、敏感的认知能力试验方法。如果有资料提示受试物可能对认知能力有影响,需要进一步的进行感觉功能、运动功能的检测,并可根据文献报道和前期的研究结果有针对性地选择相关学习和记忆检测方法。如果无上述信息的提供,推荐使用主动回避试验、被动回避试验以及Morris水迷宫试验等作为试验方法。

表3 F2代仔鼠生理和神经行为发育指标

各受试物组每窝选用仔鼠数目/只		各项发育指标实际使用仔鼠数目/只		发育指标
雄	雌	雄	雌	
1	1	20	20	个体运动行为能力的测定
		10	10	出生后11d,对仔鼠大脑称重并进行神经病理学检查
1	1	20	20	进行详细的临床观察并记录、自主活动的观察、性成熟的观察、运动和感觉功能的测定
		10	10	出生后70d,对成年仔鼠大脑称重并进行神经病理学检查
1	1	10	10	出生后23d起,对仔鼠进行学习记忆能力的测定
		10	10	出生后70d,对成年仔鼠大脑称重
1	1	20	20	出生后21d处死

5.11 必要时结合受试物的特点开展其他的临床检测。

6 病理学检查

6.1 生殖毒性病理学检查

6.1.1 大体解剖

生殖发育毒性试验过程中,处死的或死亡的所有成、仔鼠均需进行大体病理解剖,观察包括生殖器

官在内的脏器是否存在病变或结构异常。

6.1.2 器官称量

在大体解剖的基础上应对子宫及卵巢、睾丸及附睾、前列腺、精囊腺、脑、肝脏、肾、脾、脑垂体、甲状腺和肾上腺等重要的器官进行称量，并记录。

6.1.3 组织病理学检查

用于交配和发育毒性检测的 F0 和 F1 代动物，保留其卵巢、子宫、子宫颈、阴道、睾丸、副睾、精囊腺、前列腺、阴茎以及可能的靶器官进行组织病理学检查。雄鼠还应判断精子的数量是否改变，是否出现精子畸形。大体解剖中显示病变的组织应做组织病理学检查，建议对怀疑不育的动物的生殖器官做组织病理学检查。

此外可先对最高剂量受试物组和对照组的动物标本以及剖检中发现有异常的标本进行组织病理学检查。如最高剂量受试物组没有发现有意义的病理改变，其他剂量受试物组的标本可不必再进行病理检查。反之，若最高剂量受试物组发现有意义的病理改变，则其他剂量受试物组相关的标本也应做进一步的检查。

6.2 神经发育毒性病理学检查

于 F2 代仔鼠出生后第 11 天和第 70 天，分别进行相关仔鼠的神经病理学检查。可先进行高剂量受试物组和对照组的检查，如发现有意义的神经病理改变，再继续进行中、低剂量受试物组的检查。神经发育毒性病理检查建议观察嗅球、大脑皮层、海马、基底神经节、丘脑、下丘脑、中脑、脑干以及小脑等组织。

7 数据处理和结果评价

7.1 数据处理

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。生殖、生理发育指标数据，应以窝为单位统计。神经发育毒性以及病理检查等结果应以适当的方法进行统计学分析。计量资料采用方差分析，进行多个试验组与对照组之间均数比较，分类资料采用 Fisher 精确分布检验、卡方检验、秩和检验，等级资料采用 Ridit 分析、秩和检验等。

7.2 结果评价

逐一比较受试物组动物与对照组动物观察指标和病理学检查结果是否有显著性差异，以评定受试物有无生殖发育毒性，并确定其生殖发育毒性的最小观察到有害作用剂量(LOAEL)和未观察到有害作用剂量(NOAEL)。同时还可根据出现统计学差异的指标(如体重、生理指标、大体解剖和病理组织学检查结果等)，进一步估计生殖发育毒性的作用特点。

8 试验报告

- 8.1 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号。
- 8.2 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期。
- 8.3 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。
- 8.4 试验摘要。

8.5 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。

8.6 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)。

8.7 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。

8.8 试验结果:

- a) 按性别和受试物组分别记录的毒性反应,包括生殖、妊娠和发育能力的异常;
- b) 试验期间动物死亡的时间或实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体重;
- d) 任何有关生殖,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) F2 代仔鼠生理发育指标达标的时间;
- h) F2 代仔鼠个体神经行为发育指标检查结果;
- i) F2 代仔鼠学习和记忆功能指标的测试结果;
- j) 病理大体解剖的发现;
- k) 病理组织学检查结果的详细描述;
- l) 结果的统计处理。

8.9 试验结论:受试物生殖发育毒性作用的特点,剂量-反应关系。并得出对各代经口生殖发育毒性的 NOAEL 和(或)LOAEL 结论等。

9 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 F0 和 F1 代雄性和雌性生殖功能的损害及对 F2 代的功能发育的影响,并从剂量-效应和剂量-反应关系的资料,得出生殖发育毒性作用的 LOAEL 和 NOAEL。试验结果应该结合亚慢性试验、致畸试验、生殖毒性试验、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,但也能为初步确定人群的允许接触水平提供有价值的信息。
