

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 240.21—2011

化学品毒理学评价程序和试验方法 第 21 部分：致畸试验

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—
Part 21: Teratogenicity test

2011-08-19 发布

2012-03-01 实施



中华人民共和国卫生部 发布

前 言

根据《中华人民共和国职业病防治法》制定本部分。

GBZ/T 240《化学品毒理学评价程序和试验方法》现分为以下四十四部分：

- 第 1 部分：总则；
- 第 2 部分：急性经口毒性试验；
- 第 3 部分：急性经皮毒性试验；
- 第 4 部分：急性吸入毒性试验；
- 第 5 部分：急性眼刺激/腐蚀性试验；
- 第 6 部分：急性皮肤刺激性/腐蚀性试验；
- 第 7 部分：皮肤致敏试验；
- 第 8 部分：鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验；
- 第 9 部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验；
- 第 10 部分：体外哺乳动物细胞基因突变试验；
- 第 11 部分：体内哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验；
- 第 12 部分：体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验；
- 第 13 部分：哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验；
- 第 14 部分：啮齿类动物显性致死试验；
- 第 15 部分：亚急性经口毒性试验；
- 第 16 部分：亚急性经皮毒性试验；
- 第 17 部分：亚急性吸入毒性试验；
- 第 18 部分：亚慢性经口毒性试验；
- 第 19 部分：亚慢性经皮毒性试验；
- 第 20 部分：亚慢性吸入毒性试验；
- 第 21 部分：致畸试验；
- 第 22 部分：两代繁殖毒性试验；
- 第 23 部分：迟发性神经毒性试验；
- 第 24 部分：慢性经口毒性试验；
- 第 25 部分：慢性经皮毒性试验；
- 第 26 部分：慢性吸入毒性试验；
- 第 27 部分：致癌试验；
- 第 28 部分：慢性毒性/致癌性联合试验；
- 第 29 部分：毒物代谢动力学试验；
- 第 30 部分：皮肤变态反应试验-局部淋巴结法；
- 第 31 部分：大肠杆菌回复突变试验；
- 第 32 部分：酵母菌基因突变试验；
- 第 33 部分：果蝇伴性隐性致死试验；
- 第 34 部分：枯草杆菌基因重组试验；
- 第 35 部分：体外哺乳动物细胞程序外 DNA 合成(UDS)试验；
- 第 36 部分：体内哺乳动物外周血细胞微核试验；

- 第 37 部分:体外哺乳动物细胞姊妹染色单体交换试验;
- 第 38 部分:体内哺乳动物骨髓细胞姊妹染色体交换试验;
- 第 39 部分:精子畸形试验;
- 第 40 部分:繁殖/生长发育毒性筛选试验;
- 第 41 部分:亚急性毒性合并繁殖/发育毒性筛选试验;
- 第 42 部分:一代繁殖试验;
- 第 43 部分:神经毒性筛选组合试验;
- 第 44 部分:免疫毒性试验。

.....

本部分为 GBZ/T 240 的第 21 部分。

本部分由卫生部职业卫生标准专业委员会提出。

本部分由中华人民共和国卫生部批准。

本部分起草单位:上海市疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本部分主要起草人:肖萍、孙金秀、薛春霄、林铮。

化学品毒理学评价程序和试验方法

第 21 部分:致畸试验

1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了动物致畸试验的目的、试验概述、试验方法、数据处理与结果评价、评价报告和结果解释。

本部分适用于检测化学品的致畸性。

2 规范性引用文件

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

GBZ/T 224 职业卫生名词术语

GBZ/T 240.1 化学品毒理学评价程序和试验方法 第 1 部分:总则

3 术语和定义

GBZ/T 240.1 界定的术语和定义适用于本文件。

3.1

母体毒性 maternal toxicity

引起亲代雌性妊娠动物直接或间接的健康损害效应。

4 试验目的

检测妊娠动物接触化学品后引起胎仔畸形的可能性。

5 试验概述

试验应设多个剂量组。选择处于胚胎发育器官形成期的妊娠动物进行染毒,并在胎仔出生前将妊娠动物处死,取出子宫,检查其吸收胎、死胎、活胎及胎仔的骨骼和内脏畸形的情况。

6 试验方法

6.1 实验动物

首选健康、刚进入性成熟期、未经交配的雌性大鼠或家兔,按雌雄动物比例 2:1 或 1:1 交配。试验前的适应期至少为 3 d。

为了获得足够的胎仔数,正确地评价受试样品致畸的可能性,对于大鼠,每个剂量组和对照组至少应有 15 只妊娠动物,家兔至少为 12 只。

6.2 剂量设计

试验至少设 3 个剂量组、1 个阴性对照组,必要时可设 1 个阳性对照组。阳性对照物可选用环磷酰胺、阿司匹林或维生素 A。对照组动物除了不给予受试样品外,其他处理应与剂量组完全相同。试验可以先采用预试验,了解受试样品引起胚胎或胎仔死亡的剂量。在受试样品理化和生物特性允许的条件下,高剂量组剂量应使母体出现明显的毒性反应,如轻微的体重下降,但不能引起超过 10% 的母体死亡;低剂量应不引起动物任何可观察到的毒性反应;在低剂量和高剂量之间可按几何级数设置中间剂量。如果受试样品的毒性较低,1 000 mg/kg 体重的剂量对胚胎无明显毒性或致畸作用,则可以采用限量试验,即试验不需要设其他剂量组。若高剂量的预试验对母体确有一定的毒性作用,但对胚胎无不良影响,也可以采用限量试验。

6.3 试验步骤

6.3.1 染毒途径

通常为经口灌胃,也可以采用其他与人的接触方式相同的给样方式。每天的染毒应在同一时间进行。如果受试样品是通过灌胃染毒的,应按每只母体动物的体重来确定每日的染毒量。

6.3.2 交配及染毒期限

雄性和雌性动物按 1:1 或 1:2 的比例合笼交配。每天早晨应对雌性动物进行检查,查看阴道中是否有精子或阴栓。将检查到精子或阴栓的当天计为雌性动物妊娠的第 0 天。将妊娠动物随机分组后,于胚胎器官的形成期开始染毒(大鼠为孕后 6 d~15 d,家兔为孕后 6 d~18 d),每天一次。

6.3.3 观察期限及指标

6.3.3.1 每日至少对妊娠动物进行一次仔细的临床观察。发现虚弱或濒死的动物,应进行隔离或人道处死,对死亡的动物应进行尸检。如母体有流产、早产症状者也应处死并作大体检查。

6.3.3.2 每日称取妊娠动物体重,每周记录摄食量,并观察其临床症状,包括皮肤、毛、眼睛、黏膜、呼吸系统、循环系统、神经系统、四肢活动和行为方式的改变。

6.3.3.3 及时记录任何毒性反应,包括出现的时间、程度和持续的时间。

6.3.4 观察指标

分娩前一天处死妊娠动物(大鼠为妊娠第 20 天,小鼠为妊娠第 18 天,家兔为妊娠后第 29 天),立即进行解剖检查。

6.3.4.1 子宫观察

取出子宫,分别称取子宫、胎盘和活胎的重量,记着床数、活胎数、死胎数及吸收胎数。

6.3.4.2 外观检查

逐一记录活胎仔的身长和尾长。检查外观有无异常,如头部:无脑、脑膨出、露脑、头盖裂、脑积水、小头、颜面裂、小眼、无眼、眼球突出、无耳、小耳、耳位低、无颚、小颚、下颚、兔唇和下颌裂;躯干部:胸骨裂、胸部裂、脊椎裂、脊椎侧弯、脊椎前弯、脊椎后弯、脐疝、尿道下裂、无肛门、短尾、卷尾、无尾和腹裂;四肢:多肢、无肢、短肢、半肢、多趾、无趾、并趾、短趾和缺趾。胎鼠畸形检查方法见附录 A。

6.3.4.3 骨骼检查

将每窝 1/2 的胎仔放入茜素红液(配制方法见附录 B 的 B.1)中染色,进行骨骼检查。测量囟门大小,矢状缝的宽度,头顶间骨及后头骨缺损情况,然后检查脊柱骨的数目、融合、纵裂、部分裂开、骨化中

心数、发育不全、缩窄、脱离和形状；骨盆的弓数目、骨化中心数、形状异常、融合、裂开、缩窄和脱离；四肢骨的形状和数目；腕骨的骨化中心数；掌骨、趾骨的形状；肋骨的数目、形状、融合、分叉、缺损和发育不全；胸骨的形状、完全缺失、胸骨节融合、裂开、形状异常和发育不良等情况。

6.3.4.4 内脏检查

将每窝另一半的胎仔放入 Bouin's 液（配制方法见附录 B 的 B.2）中，固定两周后作脏器和软组织检查。检查有无异常，如头部：嗅球发育不良、侧脑室扩张、第三脑室扩张、角膜缺损等；胸部：右心位、房中隔缺损、室间隔缺损、主动脉弓、食道闭锁、气管狭窄、无肺、多肺、肺叶融合、膈疝、气管食管瘘和内脏异位等；腹部：肝分叶异常、肾上腺缺失、多囊肾、膀胱缺失、睾丸缺失、阴睾、卵巢缺失、卵巢异位、子宫缺失、子宫发育不全、肾积水、肾缺失和输尿管积水等。对于家兔每个胎仔都应解剖进行脏器检查和骨骼检查。

7 数据处理与结果评价

7.1 数据处理

数据可以用统一的表格进行统计，表中应显示每组的实验动物数、平均体重、受孕动物数、黄体数、着床数、吸收胎数、活胎数、死胎数及其百分率、胎仔的情况（体重、胎盘重、体长、尾长）、畸胎的类型（包括外观、骨骼和内脏）、数目及百分率。

数据可采用任何一种适当的统计方法进行处理。应将各剂量组的指标相应地与对照组进行显著性检验。其中，以畸胎率最为重要，主要有以下两种：

$$\text{每组动物总畸胎率} = \frac{\text{出现畸形的活胎总数}}{\text{该组母体所产的活胎总数}} \times 100\%$$

注：凡每一活胎出现一种以上畸形时，均作一个畸胎计。

当出现的畸胎是以某一种或某几种畸形为主时，就应按畸形种类单独计算该畸形率。

$$\text{每组动物某单项畸胎率} = \frac{\text{出现某种畸胎总数}}{\text{该组母体所产的活胎总数}} \times 100\%$$

$$\text{致畸指数} = \text{雌性动物 LD}_{50} / \text{最小致畸剂量}$$

7.2 结果评价

7.2.1 评价时应结合所用动物品系的历史性的资料进行，包括自发畸变种类和频率。

7.2.2 如果某剂量组的总畸胎率或某单项畸胎率与对照组相比明显增高，且差异有显著性，可表明该剂量有致畸作用。

7.2.3 试验结果应能得出受试样品是否有母体或胚胎毒性、致畸性，最好能得出无致畸剂量和最小致畸剂量。

8 评价报告

除 GBZ/T 240.1 规定的一般项目外，评价报告还应包括以下内容：

- a) 给予受试样品的方法和期限；
- b) 孕鼠体重增长和妊娠情况；
- c) 受孕动物数、黄体数、着床数、吸收胎数、活胎数、死胎数及其百分率；
- d) 胎仔的情况（体重、胎盘重、体长、尾长）、畸胎的类型（包括外观、骨骼和内脏）、数目及百分率。

9 结果解释

解释致畸试验结果时，应注意种属的差异。试验结果从动物外推到人存在着一定的局限性。

附 录 A
(资料性附录)
胎鼠畸形检查方法

A.1 胎鼠外观检查

对每只胎鼠先经肉眼检查,如果肉眼不能确定某种畸形时,将胎鼠放在解剖显微镜下进一步确定并照相,胎鼠的检查顺序如下。

A.2 胎鼠的头部检查

有无露脑(无头盖骨),脑膜膨出,头部大小(大头可能脑积水、小头为头部发育不良)。眼睛的有无,眼所在部位,大小(小眼或大眼),突眼或开眼等。两耳、鼻和嘴外表是否正常和对称,上下颌有无唇裂。

A.3 四肢的检查

四肢有无多趾(指)、并趾、少趾、无趾、足内外翻、短肢等畸形。

A.4 躯干的检查

有无脐疝、腹裂(内脏膨出),脊髓膨出、脊柱裂、脊柱侧突等。

A.5 尾部检查

有无短尾、卷尾、无尾和尾分叉等。

A.6 标本的制作

将每窝 1/2 胎鼠放入 Bouin's 液固定,作为内脏检查,另 1/2 放入 95%酒精中固定作为骨骼检查。

A.7 骨骼标本的制备

胎鼠放入 1% KOH 溶液中软化至能很清楚地看见骨骼为止,必要时中间可更换 1 次 KOH 溶液。

A.8 骨骼染色

将骨骼标本放入茜素红应用液中染色 16 h,直至全部骨骼染成紫红色为止,中间可更换一次染液。

A.9 骨骼透明

染好色以后,用自来水冲净标本,倒掉染液,将标本置于 50%甘油中脱色 3 d~5 d。

A. 10 骨骼检查

A. 10.1 头骨检查:颅骨是否完整,有无骨化不全,骨缝的宽窄,枕骨的形状。

胎鼠上枕骨骨化程度的分级标准如下:

- 0级:上枕骨成片状或哑铃状,两侧骨化点完全融合,融合处宽度大于两侧的1/3。
- Ⅰ级:上枕骨两侧骨化点相连,相连处宽度小于两侧的1/3。
- Ⅱ级:上枕骨两侧骨化点不相连,但可清楚地见到两个较大的骨化点。
- Ⅲ级:上枕骨两侧的骨化点不相连,仅见小骨化点或仅见一侧骨化点。
- Ⅳ级:无上枕骨骨化点。

A. 10.2 胸部骨骼:正常胸骨为6块,畸形时可有骨骼错位及骨化不全,注意观察第2胸骨和第5胸骨。小鼠正常肋骨为13对,观察有无多肋、少肋、肋骨分叉、融合、波状肋等畸形。

A. 10.3 四肢骨:检查骨化程度、长短粗细、指趾骨的发育状况。

A. 11 胎鼠内脏徒手切片检查

将胎鼠从 Bouin's 液中取出,自来水冲净。测量每只胎鼠身长及尾长。

A. 12 头部切片

将胎鼠放在蜡板或木板上,第1刀由嘴开始经两耳切开,暴露舌、腭、上唇和下颌,检查舌有无异常,有无腭、唇裂。将头翻过来前背向上,切剩下的切片。第2刀从眼睛前面切下,暴露鼻中隔、鼻窦,记录鼻腔是否通。第3刀平眼切下,暴露脑鼻叶,鼻中隔后区的大部分及鼻咽腔、眼组织、视网膜、玻璃体、晶状体和角膜,检查这些组织结构有无异常。第4刀从眼后切开,暴露大脑半球和侧脑室,并注意有无畸形和扩张。第5刀横切大脑半球,暴露间脑的Ⅲ脑室、侧脑室、脉络膜等检查这些部位有无异常。

A. 13 内脏切片检查

沿胸腹壁中线和肋下沿水平线各切一刀,暴露胸腔与腹腔内脏,检查各脏器有无异常。

A. 14 统计

应用适当的统计学软件对数据进行分析处理。各组母鼠平均体重,胎鼠体重、身长、尾长,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据采用F检验进行显著性分析。活胎、死胎、畸形、吸收胎等计数资料用百分率表示,数据采用 χ^2 检验进行显著性分析。

- 活胎率=活胎数/胎鼠数×100%;
- 死胎率=死胎数/胎鼠数×100%;
- 吸收胎率=吸收胎数/着床数×100%;
- 畸形率=畸形仔鼠数/受检胎鼠数×100%;
- 孕鼠体重净增长=解剖前体重—受孕第6天体重—含胎子宫重。

附 录 B

(资料性附录)

茜素红液和 Bouin's 液配制方法

B.1 茜素红液配制方法

冰醋酸	5 mL
纯甘油	10 mL
1%水合氯醛	60 mL

临用时用 1% KOH 稀释成 0.1% 的应用液。

B.2 Bouin's 液配制方法

苦味酸饱和液	75 mL
甲醛	25 mL
冰醋酸	5 mL

混合使用。
