

# 致畸试验

## 1 范围

本规范规定了动物致畸试验的基本原则，试验方法和技术要求。

本规范用于检测化妆品原料及产品可能的致畸作用。

## 2 术语和定义

### 2.1 致畸性

化学物质在胚胎发育期引起子代永久性结构异常的特性。

### 2.2 母体毒性

化学物质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 试验原理与目的

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。在胚胎发育的器官形成期给妊娠动物化学物质，可检测该化学物质对胎仔的致畸作用。

检测妊娠动物接触化妆品原料及产品后引起胎鼠畸形的可能性，提供妊娠试验动物和发育中胎儿暴露影响的相关信息，预测其对人体可能的致畸性。

## 4 试验方法

### 4.1 仪器和试剂

#### 4.1.1 仪器和器材

实验室常用设备、生物显微镜、体视显微镜、游标卡尺、电子天平。

#### 4.1.2 主要试剂

4.1.2.1 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。

4.1.2.2 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。

4.1.2.3 茜素红应用液：取贮备液 3 mL~5 mL，用 10g/L~20 g/L 氢氧化钾液稀释至 1000 mL，存于棕色瓶中。

4.1.2.4 茜素红溶液：茜素红 0.1 g，氢氧化钾 10g，蒸馏水 1000 mL，临用时配制（剥皮法骨骼染色法）。

4.1.2.5 透明液 A：甘油 200 mL，氢氧化钾 10g，蒸馏水 790 mL 混合。

4.1.2.6 透明液 B：甘油与蒸馏水等体积混合。

4.1.2.7 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。

## 4.2 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。

## 4.3 实验动物和饲养环境

4.3.1 动物选择：啮齿动物首选大鼠，非啮齿类动物首选家兔。若选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。

4.3.2 动物数量：性成熟的雄鼠和雌鼠通常按 1:1 或 1:2 比例合笼交配，如果 5d 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。

4.3.3 动物的准备和饲养：实验动物及实验动物房应符合国家相应规定。实验动物在试验前应至少进行 3 d~5 d 的环境适应和检疫观察，试验期间动物自由饮水和摄食，妊娠动物应单笼饲养。

## 4.4 剂量和分组

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克松（0.5 mg/kg~1.0 mg/kg 体重）、五氯酚钠（30 mg/kg 体重）、阿司匹林（250 mg/kg~300mg/kg 体重）及维生素 A（7 500  $\mu$ g/kg~13 000  $\mu$ 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 d 腹腔注射 1 次。曾用阳性物开展过致畸试验、并在所用试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，

但不至于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 天重复经口毒性试验、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，如果亚慢性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；如果亚慢性毒性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。

#### 4.5 试验步骤

##### 4.5.1 “受孕动物”的检出和给受试物时间

对于大鼠，雌、雄性动物同笼后，每日早晨对雌鼠检查阴栓（或阴道涂片），查出阴栓（或精子），认为该动物已交配，当天定为“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。检出的“受孕动物”按随机分组，并称重和编号。

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 6 d~15 d，家兔孕期 6 d~18 d）。受试物灌胃给予时，要将受试物溶解或悬浮于合适的溶剂中，首选为水，不溶于水的受试物可使用植物油（如玉米油、橄榄油等），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一次，并根据体重调整给受试物量。灌胃量一般不超过 10 mL/kg 体重，如为水溶液时，最大灌胃量可达 20 mL/kg 体重，如为油性液体，灌胃量应不超过 4 mL/kg 体重；各组灌胃量应一致。

##### 4.5.2 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应及时处死并解剖检查。

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

##### 4.5.3 受孕母体处死和一般检查

分娩前 1 d（一般大鼠为孕第 20 d，家兔为孕第 28 d）处死母体。剖腹检查亲代受孕情况

和胚体发育。迅速取处子宫，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。

#### 4.5.4 活胎鼠检查

逐一记录胎鼠性别、体重、体长、尾长、检查胎鼠外观有无异常。外观检查项目见表 1。

表 1 致畸试验胎鼠外观检查项目

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	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			

#### 4.5.5 胎鼠骨骼标本的制作与检查

骨骼标本制作方法一：将每窝 1/2 的活胎鼠放入 95 % (V/V) 乙醇中固定 2 周~3 周，取出胎仔（或可去皮、去内脏及脂肪）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液中染色 6 h~48 h，并轻摇 1~2 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后，可将标本放在甘油中保存。

骨骼标本制作方法二（剥皮法）：也可将胎鼠剥皮、去内脏及脂肪后，放入茜素红溶液染色，当天摇动玻璃瓶 2~3 次，待骨骼染成红色时为止。将胎鼠放入透明液 A 中 1 d~2 d，换到透明液 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色后，可将标本放在甘油中保存。

胎鼠骨骼检查：将标本放入小平皿中，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，然后检查胸骨的数目，缺失或融合（胸骨为6个，骨化不全时首先缺第5胸骨、次为缺第2胸骨）。肋骨通常12~13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12~13个，腰椎5~6个，底椎4个，尾椎3~5个），有无融合、纵裂等。最后检查四肢骨。致畸试验胎鼠骨骼检查项目见表2。

表2 致畸试验胎鼠骨骼检查项目

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
盆骨	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

#### 4.5.6 胎鼠内脏检查

每窝的1/2活胎鼠放入 Bouins 液中，固定两周后作内脏检查。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，用刀片从头部横切或纵切5刀。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。

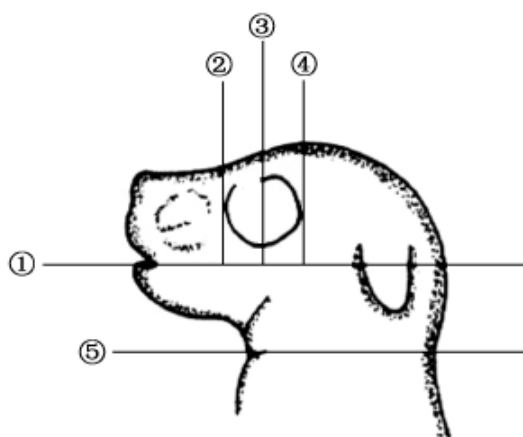


图1 胎鼠头部示意图

- (1) 经口从舌与两口角向枕部横切（切面①），观察大脑、间脑、小脑、舌及顎裂。
- (2) 在眼前面作垂直纵切（切面②），可观察鼻部。

(3) 从头部垂直通过眼球中央作纵切(切面③), 可观察眼部。

(4) 沿头部最大横位处穿过作切面(切面④), 可观察脑室部。

以上切面的目的可分别观察舌裂、双叉舌、顎裂、眼球畸形、鼻畸形, 脑和脑室异常。

(5) 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、子宫或睾丸位置及发育情况。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项目见表 3。

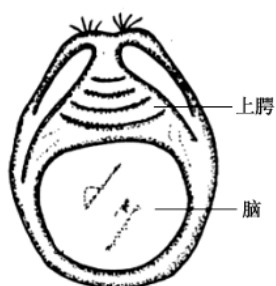


图 2 头部第①切面图示——上腭

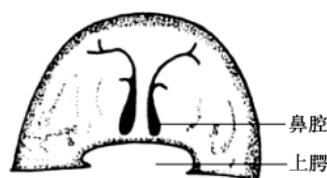


图 3 头部第②切面图示——鼻腔



图 4 头部第③切面图示——眼球

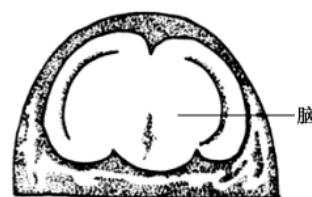


图 5 头部第④切面图示——脑室

表 3 致畸试验胎鼠内脏检查项目

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	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。

#### 4.6 数据处理、统计方法及结果评定

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、各试验组的动物数、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。胎鼠的观察结果，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 6d 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 6d 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。

$$\text{受孕率}(\%) = \text{受孕动物数} / \text{实验动物数} \times 100\%$$

$$\text{活胎率}(\%) = \text{活胎数} / \text{胎鼠总数} \times 100\%$$

$$\text{死胎率}(\%) = \text{死胎数} / \text{胎鼠总数} \times 100\%$$

$$\text{吸收胎率}(\%) = (\text{早期} + \text{中期} + \text{晚期}) \text{吸收胎数} / \text{胎鼠总数} \times 100\%$$

$$\text{外观畸形率}(\%) = \text{外观畸形数} / \text{检查胎鼠数} \times 100\%$$

$$\text{骨骼畸形率}(\%) = \text{骨骼畸形数} / \text{检查胎鼠数} \times 100\%$$

$$\text{内脏畸形率}(\%) = \text{内脏畸形数} / \text{检查胎鼠数} \times 100\%$$

$$\text{畸胎率}(\%) = \text{畸胎总数} / \text{活胎仔总数} \times 100\%$$

## 5 结果解释

解释致畸试验结果时，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考虑，必须注意种属差异，试验结果从动物外推到人的有效性很有限。

# 《致畸试验》修订说明

为进一步完善化妆品安全技术法规体系，中国食品药品检定研究院组织开展了致畸试验方法的制订工作。结合化妆品原料及产品安全性评价的要求，参考其他相关标准对《化妆品卫生规范》（2007年版）相关内容进行修订。

## 一、 起草的必要性

- 1、 作为《化妆品卫生规范》的重要参考文献食品安全国家标准 GB 15193.14 《致畸试验》已更改升级为2015版；
- 2、 OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No.414, January 2001)——Prenatal Development Toxicity Study（胎儿发育毒性研究）不仅包括化学物的致畸作用研究还包括妊娠动物毒性研究，在试验设计和实施方面的要求也就更多，而我国因国情限制在最初制定各种国标和规范时参照的为旧版 OECD Guidelines，仅采用了现行 OECD Guidelines No.414 其中一部分作为致畸试验，另一部分则纳入繁殖试验中。随着经济的发展，国家和民众对健康生活有了更高的要求，因此有必要对各种健康相关的国标和卫生规范进行适当的调整，考虑国情的同时，制定更贴近国际标准的化妆品安全技术规范。

## 二、 起草依据及文献

- 1、 《化妆品卫生规范》（2007年版）十六致畸试验
- 2、 食品安全国家标准 GB15193.14-2015《致畸试验》
- 3、 OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No.414, January 2001)

## 三、 起草原则

- 1、 参考其他相关标准，结合化妆品原料及产品安全性评价的要求，修订致畸试验方法。
- 2、 充分考虑国情。根据我国化妆品卫生规范的要求和试验承担单位的水平，对某些内容进行具体化和明确化，对于国内试验承担单位的技术水平或实验条件在短期内无法达到的内容，根据具体情况进行了适当调整，在尽量提高可操作性的同时，充分



考虑了更好地发挥各试验承担单位的主观能动性，并从长远发展的观点出发，兼顾了技术发展的前瞻性。

- 3、在撰写过程中，还注意了科学性、合理性、协调性和有效性，以及通俗性和规范性之间的关系。

# 《致畸试验》编制说明

## 一、编制说明

本次修订与 2007 版相比，主要变化如下

- “范围”修改为“本规范规定了动物致畸试验的试验方法和技术要求”和“本规范用于检测化妆品原料及产品可能的致畸作用”；
- 增加了“术语和定义、试验原理与目的、仪器和器材、受试物、受试物的配制和给予、母体观察”内容；
- 删除了“致畸性”中“功能异常”的内容；
- 删除了“规范性引用文件”和“试验报告”；
- 规范文字描述和单位的使用；
- 增加“动物选择”中非啮齿动物的选择；动物起始体重的差异应不超过平均体重的 20% 的要求；
- 增加“动物数量”和“动物饲养”要求；
- 修改了试验终止时孕鼠数的要求；
- 增加“剂量与分组”中阳性对照组阳性物种类及参考剂量，受试物剂量选择的具体方法；
- 增加母体动物死亡率不得大于 10% 的内容；
- 增加“受孕动物检出”中受孕雌兔的检出方法及受试物的给予；
- 增加了对所有妊娠母体进行肉眼检查；
- 删除“活胎鼠检查”中检查胎鼠外观有无异常的文字描述；

- 增加了胎鼠外观检查项目表 1、致畸试验胎鼠骨骼检查项目表 2、致畸试验胎鼠内脏检查项目表 3;
- 将“胎鼠骨骼标本的制作”按方法分别描述;
- 增加了胎鼠头部示意图⑤切面及胎鼠头部①~④切面示意图;
- 增加“数据处理、统计方法及结果评定”数据处理,需要整理的数据内容及分析指标;
- 删除“数据处理、统计方法及结果评定”“致畸指数”和“致畸危害指数”相关内容,增加受孕率、活胎率、死胎率等的计算方法。
- 增加“结果解释”中应该结合亚慢性毒性、繁殖毒性、毒物动力学及其他试验结果综合考虑内容。

## 二、确定相关技术内容及新旧技术规范的对比

本部分的主要内容涉及致畸试验方法的基本原则、方法和要求,适用于化妆品原料及产品致畸性的评价。

新化妆品卫生规范的本部内容与原规范相比,从总体编排上结构更合理,层次更清晰。从内容上,确定了本试验部分的适用范围、术语和定义、试验原理和目的,在试验方法中对仪器和试剂、动物选择、数量、准备和饲养,试验剂量和分组,受试物、受试物配置和给予、受孕动物的检出和给样时间、数据处理提出了操作性更强的要求和规定,并对试验结果的解释作了更全面的谨慎的说明,试验内容更具体,更具有可操作性,语言编写更规范、明了。本规范检验方法与 2007 版中致畸试验差异及提出的依据见表。

表 1 主要内容修订简表

编号	试验项目	原方法		现方法		改动情况
		序号	内容	序号	内容	
1	范围	1	本规范规定了动物致畸试验的基本原则，要求和方法。	1	本规范规定了动物致畸试验的试验方法和技术要求。	内容具体化
2	范围	1	本规范用于检测化妆品原料的致畸性。	1	规范用于检测化妆品原料及 <u>产品</u> 可能的致畸作用。	适用范围扩大
3	规范性引用文献	2				删除，根据 2015 规范的统一体例
4	试验目的	3	检测妊娠动物接触化妆品原料后引起胎鼠畸形的可能性。	3	试验原理与目的 检测妊娠动物接触化妆品原料及 <u>产品</u> 后引起胎鼠畸形的可能性，提供妊娠试验动物和发育中胎儿暴露影响的相关信息，预测其对人体可能的致畸性。	将试验目的与试验基本原则合并为试验原理与目的，表述清晰
5	定义	4	致畸性 在胚胎发育期引起胎仔永久性结构和功能异常的化学物质特性。	2	术语和定义 2.1 致畸性 <u>化学物质</u> 在胚胎发育期引起子代永久性结构异常的特性。	删除“功能异常”，
6	定义			2	术语和定义 2.1 致畸性 <u>化学物质</u> 在胚胎发育期引起子代永久性结构异常的特性。 2.2 发育毒性 个体在出生前暴露于 <u>化学物质</u> 、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 <u>化学物质</u> 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。	新增加“发育毒性”和“母体毒性”定义
7	试验基本原则	5	试验基本原则 在胚胎发育的器官形成期给妊娠动物染毒，在胎鼠出生前将妊娠动物处死，取出胎鼠检查其骨骼和内脏畸形	3	试验原理与目的 <u>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。在胚胎发育的器官形成期给妊娠动物<u>化学物质</u>，<u>化学物质</u>，可检测该化学物质对胎仔的致畸作用。</u>	丰富了试验原理，将试验基本原则与试验目的合并为一个条目试验原理与目的，表述更清晰。

8	试验方法	6	试验方法	4	试验方法	调整条目序号
9				4.1	<u>仪器和试剂</u>	调整条目序号, 增加“仪器”内容
10				4.1.1	<u>仪器和器材</u> <u>实验室常用设备、生物显微镜、体视显微镜、游标卡尺、电子天平。</u>	新增, 根据新食品国标
11		6.1	试剂	4.1.2	<u>主要试剂</u>	调整条目序号
12		6.1.1	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。	4.1.2.1	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。	调整条目序号
13		6.1.2	茜素红贮备液: 茜素红饱和液, 50%乙酸饱和液 5.0 mL, 甘油 10.0 mL, 1%水合氯醛 60.0 mL 混合, <u>放入棕色瓶中。</u>	4.1.2.2	茜素红贮备液: 茜素红饱和液, <u>以 50% 乙酸为溶剂的茜素红饱和液 5.0 mL</u> , 甘油 10.0 mL, 1%水合氯醛 60.0 mL 混合, <u>存于棕色瓶中。</u>	调整条目序号, 描述更易于理解, 规范文字使用
14		6.1.3	茜素红应用液: 取贮备液 3~5 mL, 用 1~2g/100 mL 氢氧化钾液稀释至 1000 mL, 存于棕色瓶中。	4.1.2.3	茜素红应用液: 取贮备液 3~5 mL, 用 <u>10~20g/L</u> 氢氧化钾液稀释至 1000 mL, 存于棕色瓶中。	调整条目序号, 规范单位使用
15		6.1.4	茜素红溶液: 茜素红 0.1g, 氢氧化钾 10g, 蒸馏水 1000mL。	4.1.2.4	茜素红溶液: 茜素红 0.1g, 氢氧化钾 10g, 蒸馏水 1000mL, <u>临用时配制 (剥皮法骨骼染色法)。</u>	调整条目序号, 明确使用目的与配制要求
16		6.1.5	透明液 A: 甘油 200mL, 氢氧化钾 10g 蒸馏水 790mL。	4.1.2.5	透明液 A: 甘油 200mL, 氢氧化钾 10g, 蒸馏水 790mL <u>混合。</u>	调整条目序号, 规范描述
17		6.1.6	透明液 B: 甘油与蒸馏水等量混合。	4.1.2.6	透明液 B: 甘油与蒸馏水等 <u>体积</u> 混合。	调整条目序号, 明确配制要求
18		6.1.7	固定液 (Bouins 液): 2, 4, 6-三硝基酚 (苦味酸饱和液) 75 份、甲醛 20 份、冰乙酸 5 份。	4.1.2.7	固定液 (Bouins 液): 2, 4, 6-三硝基酚 (苦味酸饱和液) 75 份、 <u>40%</u> 甲醛 20 份、冰乙酸 5 份。	调整条目序号, 细化配制要求
19				4.2	<u>受试物</u> <u>受试物应使用原始样品, 若不能使用原始样品, 应<u>按照受试物处理原则对受试物进行适当处理。</u></u>	新增内容, 根据新食品国标

20		6.2	试验动物和饲养环境	4.3		调整条目序号
21		6.2	动物选择：首选为健康的性成熟大鼠。	4.3.1	动物选择： <u>啮齿动物首选大鼠，非啮齿类动物首选家兔。若选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±20%，所用动物应注明种类、品系、性别、体重和周龄。</u>	调整条目序号，细化要求
22				4.3.2	动物数量： <u>性成熟的雄鼠和雌鼠通常按 1:1 或 1:2 比例合笼交配，如果 5d 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。</u>	新增内容，细化要求，增加动物数量。根据新食品国标和 OECD Guideline
23		6.2	实验动物及实验动物房应符合国家相应规定。	4.3.3	动物的准备和饲养： <u>实验动物及实验动物房应符合国家相应规定。实验动物在试验前应至少进行 3d~5d 的环境适应和检疫观察，试验期间动物自由饮水和摄食，妊娠动物应单笼饲养。</u>	调整条目序号，细化要求
24		6.3	剂量和分组 至少设三个剂量组，高剂量应能引起母鼠某些毒性反应，但不应引起 10%以上动物的死亡。低剂量组不会出现可观察到的毒性反应。另设阴性对照组。每组至少 12 只孕鼠。当初次进行致畸试验或使用新的动物种属和品系时，必须同时设阳性对照组，阳性对照物可选用敌枯双、维生素 A 等。	4.4	剂量和分组 <u>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克松（0.5 mg/kg~1.0 mg/kg 体重）、五氯酚钠（30mg/kg 体重）、阿司匹林（250 mg/kg~300 mg/kg 体重）及维生素 A（7 500 μg/kg~13 000 μg/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、并在所用试验动物种系有阳性结果发现，试验看可略去设置阳性对照组。</u> <u>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，但不至于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。</u> <u>试验剂量的设计参考急性毒性试验剂量、28 天重复经口毒性试验、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 LD50 的受试物，根据 LD50 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 LD50 的受试物，如果亚慢性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；如果亚慢性毒性试验观察到有害作用，以最小观察到有害作用剂量（LOAEL）</u>	调整条目序号，细化要求，规范文字使用，增强可操作性

					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。	
25	6.4	试验步骤		4.5	试验步骤	调整条目序号
26	6.4.1	<p>“孕鼠”的检出和给受试物时间</p> <p>雌鼠和雄鼠按 1:1 (或 2:1) 同笼，每日晨观察阴栓 (或阴道涂片)，查出阴栓 (或精子) 的当天定为孕期零天。如果 5 d 内没查出“受精鼠”，应调换雌鼠。检出的“受精鼠”按随机分组。在孕期 6d~15d，每天经口给予受试物。孕鼠与孕期 0、6、10、15、和 20d 称重，并根据体重调整给受试物量。</p>		4.5.1	<p>“受孕动物”的检出和给受试物时间</p> <p>对于大鼠，雌、雄性动物同笼后，每日早晨对雌鼠检查阴栓 (或阴道涂片)，查出阴栓 (或精子)，认为该动物已交配，当天定为“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。检出的“受孕动物”随机分组，并称重和编号。</p> <p>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 6d~15d，家兔孕期 6d~18d)。受试物灌胃给予时，要将受试物溶解或悬浮于合适的溶剂中，首选为水，不溶于水的受试物可使用植物油 (如玉米油、橄榄油等)，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一次，并根据体重调整给受试物量。灌胃量一般不超过 10mL/kg 体重，如为水溶液时，最大灌胃量可达 20mL/kg 体重，如为油性液体，灌胃量应不超过 4mL/kg 体重；各组灌胃量应一致。</p>	调整条目序号，细化试验方法，删去已有和不恰当的描述
27				4.5.2	<p>母体观察</p> <p>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应及时处死并解剖检查。</p> <p>在受孕第 0 d、给予受试物第 1 d、给予受试物期间每 3 d 及处死单日称母体体重。如通过饮水途径给予受试物，还应记录饮水量。</p>	新增内容，根据新食品国标和 OECD Guideline

28	6.4.2	大鼠于妊娠第 20 d 处死。剖腹检查卵巢内黄体数，取出子宫，称重；检查活胎、早期吸收和死胎数。	4.5.3	分娩前 1 d（一般大鼠为孕第 20 d，家兔为孕第 28 d）处死母体。 剖腹检查亲代受孕情况和胚体发育。迅速取处子宫，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。	调整条目序号，操作方法具体化，根据新食品国标和 OECD Guideline
29	6.4.3	逐一记录胎鼠体重、体长、尾长、检查胎鼠外观有无异常，如头部有无脑膨出、露脑、小头、小耳、小眼、无眼和睁眼、兔唇、下颌裂，躯干部有无腹壁裂、脐疝、脊柱弯曲，四肢有无小肢、短肢、并趾、多趾、无趾等畸形，尾部有无短尾、卷尾、无尾、肛门有无闭锁。	4.5.4	逐一记录胎鼠性别、体重、体长、尾长、检查胎鼠外观有无异常， <u>外观检查项目见表 1。</u>	调整条目序号，内容具体化，表格表示更清晰
30	6.4.4	胎鼠骨标本的制作与检查	4.5.5	胎鼠骨骼标本的制作与检查 <u>骨骼标本制作方法一：</u> <u>骨骼标本制作方法二（剥皮法）：</u> <u>胎鼠骨骼检查：</u> <u>致畸试验胎鼠骨骼检查项目见表 2。</u>	调整条目序号，内容分条目表述，表格表示更清晰



31		6.4.5	<p>每窝的 1/2 胎鼠放入 Bouins 液中，固定两周后作内脏检查。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，用刀片从头部到尾部逐段横切或纵切。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。</p> <p>(6) 经口从舌与两口角向枕部横切（切面 1），观察大脑、间脑、<b>延髓</b>舌及顎裂。</p> <p>(7) 在眼前面作垂直纵切（切面 2），可见鼻部。</p> <p>(3)从头部垂直通过眼球中央作纵切（切面 3）。</p> <p>(4)沿头部最大横位处穿过作横切（切面 4）。</p> <p>以上切面的目的可观察舌裂顎裂、眼球畸形、脑和脑室异常。</p> <p>(5)沿下颚水平通过颈部中部作横切，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、肠等脏器的尺寸、位置，查毕将其摘除，再检查肾脏、输尿管、膀胱、子宫或睾丸位置及发育情况。然后将肾脏切开，观察有无肾盂积水与扩大。</p>	4.5.6	<p>每窝的 1/2 活胎鼠放入 Bouins 液中，固定两周后作内脏检查。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。用刀片从头部横切或纵切 5 刀。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。</p> <p>(1)经口从舌与两口角向枕部横切（切面①），观察大脑、间脑、小脑、舌及顎裂。</p> <p>(2)在眼前面作垂直纵切（切面②），可观察鼻部。</p> <p>(3)从头部垂直通过眼球中央作纵切（切面③），可观察眼部。</p> <p>(4)沿头部最大横位处穿过作横切（切面④），可观察脑室部。以上切面的目的可分别观察舌裂、双叉舌、顎裂、眼球畸形、鼻畸形，脑和脑室异常。</p> <p>(5)沿下颚水平通过颈部中部作切面（切面⑤），可观察气管、食管和延脑或脊髓。</p> <p>以后自腹中线剪开胸、腹腔，依次检查心、肺、横膈膜、肝、胃、肠等脏器的尺寸、位置，查毕将其摘除，再检查肾脏、输尿管、膀胱、子宫或睾丸位置及发育情况。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。致畸试验鼠内脏检查项目见表 3。</p> <p>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。</p>	调整条目序号，内容分条目表述，表格表示更清晰
32		6.5	<p>统计方法及结果评定</p> <p>各种率的检查用 <math>X^2</math> 检验，孕鼠增重用方差分析或非参数统计，胎鼠身长、体重、窝平均活胎数用 T 检验。结果应能得出受试物是否有母体毒性和胚胎毒性、致畸性，最好能得出最小致畸剂量。</p>	4.6	<p>数据处理、统计方法及结果评定</p> <p><u>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、各试验组的动物数、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。胎鼠的观察结果，包括畸形类型及其他相关信息。</u></p> <p><u>用合理的统计方法对下述指标进行统计分析：母体体重、体重增量（处死时母体体重—孕 6d 体重）、子宫连胎重、体重净增量（处死时母体体重—子宫连胎重—孕 6d 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</u></p>	调整条目序号，细化各种统计指标及其计算方式。根据新食品国标和 OECD Guideline

					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。		
33		<p>为比较不同有害物质的致畸强度，可计算致畸指数，以致畸指数 10 以下为不致畸，10~100 为致畸，100 以上为强致畸。为表示有害物对人体危害的大小，可计算致畸危害指数，如指数大于 300 说明受试物对人危害小，100~300 为中等，小于 100 为危害大。</p> $\text{致畸指数} = \frac{\text{雌鼠}LD_{50}}{\text{最小致畸剂量}}$ $\text{致畸危害指数} = \frac{\text{最大不致畸剂量}}{\text{最大可能摄入量}}$				删除根据新食品国标和 OECD Guidline	
34					<p><u>受孕率 (%) = 受孕动物数 / 实验动物数 × 100%</u>  <u>活胎率 (%) = 活胎数 / 胎鼠总数 × 100%</u>  <u>死胎率 (%) = 死胎数 / 胎鼠总数 × 100%</u>  <u>吸收胎率 (%) = (早期 + 中期 + 晚期) 吸收胎数 / 胎鼠总数 × 100%</u>  <u>外观畸形率 (%) = 外观畸形数 / 检查胎鼠数 × 100%</u>  <u>骨骼畸形率 (%) = 骨骼畸形数 / 检查胎鼠数 × 100%</u>  <u>内脏畸形率 (%) = 内脏畸形数 / 检查胎鼠数 × 100%</u>  <u>畸胎率 (%) = 畸胎总数 / 活胎仔总数 × 100%</u></p>		新增内容，
35	试验报告	7					删除，根据 2015 版规范的一体例
36	结果解释	8	解释致畸试验结果时，必须注意种属差异，试验结果从动物外推到人的有效性很有限。	5.	解释致畸试验结果时， <u>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考虑</u> ，必须注意种属差异，试验结果从动物外推到人的有效性很有限。		调整条目序号，对结果的解释更为慎重周全

编制者：

附件

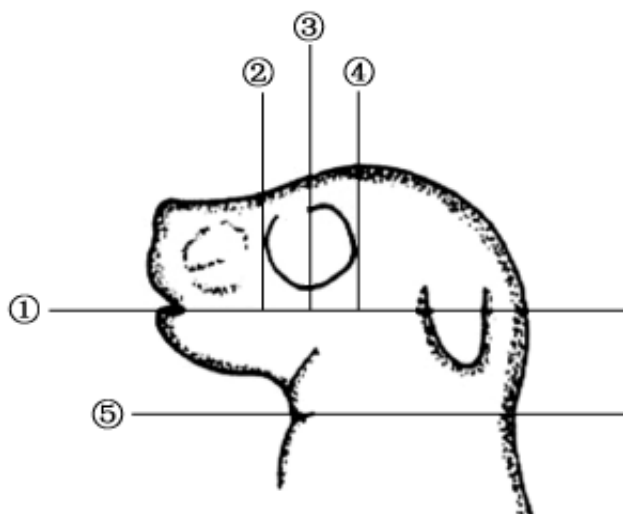


图 1 胎鼠头部示意图

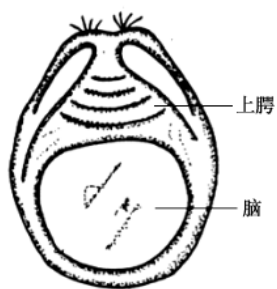


图 2 头部第①切面图示——上腭

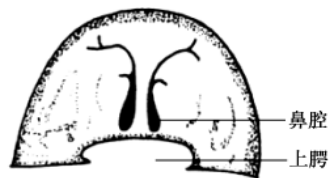


图 3 头部第②切面图示——鼻道



图 4 头部第③切面图示——眼球

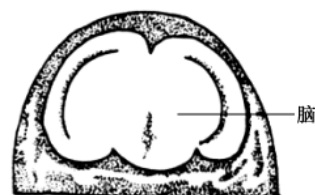


图 5 头部第④切面图示——脑室

表 1 致畸试验胎鼠外观检查项目

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	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			

表 2 致畸试验胎鼠骨骼检查项目

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
盆骨	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

表 3 致畸试验胎鼠内脏检查项目

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	内脏异位	子宫缺失	子宫发育不全	
	房中隔缺损	肝分叶异常	输卵管积水		
	室间隔缺损	肾上腺缺失			