



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 21766—2008

## 化学品 生殖/发育毒性筛选试验方法

Chemicals—Test method of reproduction/developmental toxicity screening

2008-05-28 发布

2008-08-01 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. 421(1995 年)《生殖/发育毒性筛选试验》(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。

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B 为资料性附录。

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：中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、天津市检验检疫科学技术研究院。

本标准主要起草人：马中春、孙金秀、龙再浩、侯粉霞、陈小青、林振兴。

## OECD 引言

1. 1990年1月,一个特设的专家组在伦敦讨论了生殖毒性的筛选方法,并达成了“初步生殖毒性筛选试验”的方案,该方案能有效对现有化学物质进行初步评价。

2. 本指南是伦敦会议达成方案的更新版本,它是1992年10月在东京举行生殖毒性筛选方法的提名专家会议取得的成果。它建立在各个成员国用原有方法检测已有的高产量化学品以及用阳性对照物进行的探索试验获得的经验的基础上。

3. 本指南用来设计评价化学品对雄性和雌性生殖功能影响的试验,例如性腺功能、交配行为、受孕、胎儿发育和分娩,结果获得的信息是有限的。它不是替代方法,也不能用来代替已有的指南方法414,415和416。

4. 本指南能用于提供生殖/发育方面的可能效应,包括评价化学品毒理学性质的早期阶段或者是受关注的化学品。它也能作为一组初步筛选试验的一部分来检测毒理学信息很少或没有的已有化学品,也可以作为更广泛的生殖/发育研究的确定剂量范围,或其他所有相关研究。

5. 本试验不能提供生殖与发育所有方面的完整信息。仅能提供有限的方法来检测产前暴露引起的产后表现,或者可能是产后期暴露而诱导的效应。由于染毒组动物数量相对较少、毒性终点的选择、试验周期短,因此本方法无法提供没有效应的证据。因此,尽管阴性结果不能表明对生殖和发育绝对安全,但是如果实际暴露水平明显低于未观察到有害作用剂量(NOEL),那么这一信息可确保一定的安全性。而且在缺少从其他生殖/发育毒性试验获得数据的情况下,阳性结果对于初步危害评估是有用的,可有助于决定额外试验的必要性和时机选择。

6. 本指南采用经口染毒。如果使用其他暴露途径,需要进行一些修改。

# 化学品 生殖/发育毒性筛选试验方法

## 1 范围

本标准规定了化学品生殖/发育毒性筛选试验的范围、术语和定义、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致畸性、繁殖及生长发育毒性筛选。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 2.1

**生殖毒性 reproduction toxicity**

对后代的有害作用,和(或)损害雄性、雌性(动物)生理或生殖功能。

### 2.2

**母体毒性 maternal toxicity**

对雌性妊娠动物直接或间接的有害作用。

### 2.3

**繁殖力的损害 impairment of fertility**

雌性或雄性动物生殖功能或能力异常。

### 2.4

**生长发育毒性 developmental toxicity**

属生殖毒性,系指子代在出生前、围产期和出生以后所显现出的结构(机体缺陷)或功能异常。

### 2.5

**剂量 dose**

系指所受受试物的量,常以质量(g、mg)或动物单位体重所给予的受试物的量(mg/kg)来表示;如将受试物掺入饲料进行喂养染毒时,也可以用受试物在饲料中的恒定质量分数(mg/kg)来表示。

### 2.6

**用量 dosage**

包括染毒剂量、染毒次数及染毒期限在内的一般性术语。

### 2.7

**明显毒性 evident toxicity**

给予受试样品后出现的明确的毒作用表现,可作为危险度评价的充分证据,预期随染毒剂量的增加可发展为严重的中毒症状直至死亡。

### 2.8

**未观察到有害作用的剂量 no-observed-adverse-effect level(NOEL)**

未发现与染毒有关的有害作用的最高剂量。

## 3 试验基本原则

按照雌、雄两个性别,设多个剂量组给予受试物。

从试验开始至处死时,雄性动物的染毒期至少为4周,即交配前期最少染毒2周,交配期和交配后期染毒2周。由于雄性动物交配前期的染毒时间较短,仅以繁殖能力的大小来评价化学品对雄性动物

生殖系统的影响是不够的,因此应进行病理组织学检查。以全面评价化学品对雄性动物繁殖力和精子形成的毒性作用。

雌性动物在整个试验周期内都应进行染毒,交配前期至少染毒 2 周(相当于两个完整的发情期),交配期,妊娠期和分娩后至少 4 d 都需进行染毒,直至处死的当日。

适应期过后,试验周期的长短取决于雌性动物的状态,一般为 54 d(交配前至少 14 d,交配期为 14 d,妊娠期 22 d,哺乳期 4 d)。

染毒期间要每天认真观察动物的中毒症状。在试验过程中死亡或被处死的动物都要进行大体解剖,试验结束时,存活的动物也要处死并进行大体解剖。

## 4 试验方法

### 4.1 实验动物

#### 4.1.1 动物种属

本试验方法主要是针对大鼠设计的。如果使用其他种类的动物,需要进行相应的修改。不能使用低生育力或者已知发育缺陷率高的动物品系。要使用健康、未交配和未曾做过试验的动物。应当明确实验动物的种属、品系、性别、体重和年龄。试验初,动物的体重差异应当控制在最小范围,每只动物的体重不能超过同性别平均体重的 $\pm 20\%$ 。

#### 4.1.2 饲养条件

实验动物的房间温度要保持在  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 。除了房间清洗时,房间湿度要至少控制在  $30\% \sim 70\%$ ,最好控制在  $50\% \sim 60\%$ 。要人工光照,按照 12 h 白天/黑夜循环。动物要用常规饲料饲养,不限制饮水。有些受试物可能需要通过与饲料混合来染毒动物,这样就要考虑对动物饲料的选择问题。

动物可以单独饲养或者同性别动物分笼群养,每笼不能超过 5 只动物,饲养笼要适合动物交配。受孕雌鼠要单笼饲养,同时要放入筑巢材料。

#### 4.1.3 动物准备

选择健康、初成年动物,将其随机分为对照组和染毒组。饲养笼要放置有序,最大程度减少由于位置移动可能导致的影响。要对动物逐一标记,在试验开始前至少要在饲养笼中至少适应实验室环境 5 d。

#### 4.1.4 染毒途径和受试物制备

除非认为其他染毒方式更合适,否则推荐的受试物染毒途径为经口。当选择经口途径时,通常采用灌胃方法染毒;当然也可以通过饲料或者饮水方法给予受试物。

如果需要,受试物需溶解或悬浮在适当的赋形剂中。首先考虑要使用水性溶液/悬浮液,其次考虑油性溶液/乳状液(比如玉米油),然后再是其他溶剂的溶液。如果赋形剂不是水,那么就必须要知道其毒性特征。而且要测定受试物在赋形剂中的稳定性。

## 4.2 试验程序

### 4.2.1 动物数量和性别

为了获得足够的孕鼠(至少每组 8 只)和子代,正确地评价受试样品对动物繁殖、妊娠和哺育的影响,以及对  $F_1$  子代从受孕到出生后 4 d 的哺乳、生长发育情况可能引起的健康损害效应,每个试验组至少应有 20 只动物,雌雄各半。

### 4.2.2 剂量设计

4.2.2.1 通常情况下,每次试验要有至少 3 个染毒组和 1 个对照组。染毒剂量水平可依据急性毒性试验或重复染毒试验的结果来设定。对照组动物除了不给予受试物外,其他处理方法与染毒组相同。如果受试物染毒过程中使用了赋形剂,那么对照组就要给予使用的最大体积的赋形剂。

4.2.2.2 受试物的剂量选择要考虑到本身或相关物质已有的毒性和毒代动力学资料。设置的最高剂量要诱导动物出现毒性效应,但不能出现动物死亡或痛苦表现。然后设置递减次序的剂量水平,原则是

要反映出剂量-反应关系和在最低剂量时要未观察到有害作用的剂量(NO<sub>AE</sub>L)。在设置低剂量时,通常选择 2~4 倍组间距,如果要增加第 4 个剂量组,那么第 4 个剂量组的组距则可以考虑大一些(例如超过 10 倍)。

#### 4.2.3 限量试验

如果按照本试验方法,受试物经口(包括饲料和饮用水方式)一次染毒剂量达到 1 000 mg/(kg·d),但没有观察到动物中毒反应,同时根据结构相关化合物进行的分析也预计受试物没有毒性,那么再进行其他剂量的染毒试验是没有必要的。但当人体暴露表明需要进行更高剂量试验时,则不应进行限量试验。若试验采用其他类型的染毒方式,例如吸入或皮肤染毒,染毒的最高浓度或剂量通常可由受试样品的理化特性来决定。

#### 4.2.4 染毒

4.2.4.1 动物要连续染毒,每天 1 次。当通过灌胃方式染毒时,用胃管或合适插管一次剂量完成。液体受试物一次性灌胃染毒的最大体积取决于实验动物的大小。除了水溶液的灌胃体积可以为 2 mL/100 g,其他性质的溶液不能超过 1 mL/100 g。除了刺激性或腐蚀性受试物需要较高浓度来给予外,一般受试物可通过调节受试物浓度来达到不同染毒剂量的灌胃体积保持一致。

4.2.4.2 如果受试物是通过饲料或饮水方法来染毒,要确保受试物的添加量不能破坏饲料或饮水中的营养平衡。当受试物通过饲料染毒时,可以采用恒定质量分数(mg/kg)或者根据动物体重使用恒定剂量,使用其他方法必须进行说明。采用灌胃染毒时,动物每天染毒时间要一致,而且要根据动物体重至少按周调节来维持受试物恒定的染毒剂量。

#### 4.2.5 试验步骤

4.2.5.1 动物在至少 5 d 适应期结束后,雌、雄动物在开始交配前还要至少染毒 2 周。试验日程应当安排在动物性成熟后。在不同实验室不同品系的大鼠的性成熟时间会略微不同,比如 SD 大鼠 10 周龄、Wistar 大鼠 12 周龄。有后代的母鼠应当在产后第 4 d 处死。出生当天(就是当分娩完成时)被定义为出生后 0 d。没有交配迹象的雌鼠要在交配期最后 1 d 后再过 24 d~26 d 才处死。雌鼠和雄鼠在交配期间要持续染毒。雄鼠在交配期结束后要继续染毒,直到完成总计最少 28 d 染毒期。接着雄鼠被处死,如果认为合适,也可以保留并继续染毒用来二次交配。

4.2.5.2 亲代雌鼠在妊娠期要每天染毒,一直到(包括)幼鼠出生后的第 3 d 或者被处死之日。对于吸入或皮肤染毒途径的试验,染毒至少要一直持续到(包括)妊娠第 19 d。

4.2.5.3 试验日程图见附录 A。

#### 4.2.6 动物交配

通常试验中要按照 1:1(1 雌鼠对 1 雄鼠)形式进行动物交配。在偶然发生雌鼠死亡情况下除外。一只雌鼠要与同一只雄鼠同笼一直到受孕或者 2 周时间。每天早上要检查雌鼠阴道中是否有无精子或阴栓。将检查到精子或阴栓的日期被定义为妊娠 0d。若交配两周后仍未受孕,可以将不孕雌鼠与同组的其他已证实有生殖能力雄鼠重新交配。

#### 4.2.7 观察

4.2.7.1 试验期间,要每天至少进行一次一般临床观察,如果发现中毒症状,就要增加观察次数。每天的观察时点应固定,并选择在染毒后毒性体征可能出现的高峰期。记录有关的行为改变、难产或滞产症状和所有的毒性反应,包括死亡率。还要记录这些毒性症状出现的时间、程度和持续时间。

4.2.7.2 要记录动物的妊娠周期(从受孕 0 d 开始计算)。动物生产后要尽快确定每窝幼鼠的性别和死胎、活胎、低体重鼠(明显小于对照组的幼崽)数量和出现的畸形。

4.2.7.3 要对活的幼鼠进行计数和区分性别,并在分娩后 24h 内(产后第 0 天或第 1 天)和产后第 4 天称窝重。除了观察亲代动物的行为外,也应记录子代动物的任何异常行为。

#### 4.2.8 体重和食物/水消耗

4.2.8.1 雌鼠和雄鼠在染毒第 1d 称重,以后每周至少称重 1 次,试验结束时再称重 1 次。在妊娠期,

雌鼠要分别在妊娠第 0 天、第 7 天、第 14 天和第 20 天、以及分娩的 24 h 内(产后第 0 天或第 1 天)和产后第 4 天称重。报告中要有每个成年动物的个体数据。

4.2.8.2 在交配前、妊娠期和哺乳期,要至少按周来测量动物的饲料消耗量。可选择检测动物在交配期的饲料消耗量。当受试物通过饮水方式染毒时,也要测量这些时期动物的水消耗量。

#### 4.2.9 病理检查

##### 4.2.9.1 大体解剖检查

4.2.9.1.1 在试验中有成年动物被处死或死亡时,要立即肉眼检查有无任何畸形或病理改变。尤其要注意生殖系统的组织器官。要记录着床的数目。强烈推荐计数黄体数量。

4.2.9.1.2 对所有亲代雄鼠的睾丸和附睾进行称重。

4.2.9.1.3 对死胎和产后 4 d 处死的仔鼠至少要仔细检查外观有无畸形。

4.2.9.1.4 保留所有亲代动物的卵巢、睾丸、附睾、附属性器官和有肉眼可见损害的所有器官标本。对睾丸和附睾的常规检查时避免使用福尔马林固定,建议使用 Bouin 固定液。

##### 4.2.9.2 组织病理学检查

先对高剂量组 and 对照组动物的卵巢、睾丸、附睾进行详细的组织学检查(特别强调精子发生的阶段和睾丸间质的细胞结构)。如果有必要,也可检查保存的其他组织。在高剂量组发现组织病理学改变时,就要对其他剂量组的动物进行检查。

## 5 试验数据和报告

### 5.1 数据

5.1.1 对每只动物的数据,分别进行记录,列表表示试验结果,表中应显示每组的实验动物数、试验中死亡、到期处死的动物数或出于人道原因处死的动物数量、交配的动物数、受孕动物数、各种毒性反应及其出现动物百分数。详细描述观察到的毒性症状,包括出现的时间、持续时间和程度,病理组织学改变和相关的仔鼠资料。附录 B 中的总结报告表格是非常有用的。

5.1.2 受到研究规模的限制,对试验中许多终点,尤其对生殖终点进行的差异性统计分析很难保证其完全准确。选择的统计方法应当适合所研究变量的分布,而且要在试验前就确定统计方法。由于该试验的样本量小,如果有历史对照数据(例如窝的大小)对本试验的结果分析是有帮助的。

### 5.2 结果评价

5.2.1 试验结果要根据观察到的毒性作用、大体解剖和病理组织学检查结果来评价。评价内容包括研究受试物剂量与畸形出现与消失、发生率和严重程度之间的关系,以及一般损伤、确定靶器官、无生育力、临床畸形、受影响的生殖和产仔功能、体重变化、死亡率和其他毒性效应。

5.2.2 当评估雄鼠的生殖功能时,由于雄鼠的染毒时间短,因此对睾丸和附睾进行组织病理学检查时必须与其生育数据一起考虑。

### 5.3 试验报告

试验报告必须包括下列信息:

#### 5.3.1 受试物

- a) 物理性状和相关理化性质;
- b) 名称和识别码。

#### 5.3.2 赋形剂

如果不是水,要说明选择的理由。

#### 5.3.3 实验动物

- a) 种类/品系;
- b) 数量、年龄、性别;
- c) 来源、居住条件、食物等;

d) 试验开始时的个体重量。

#### 5.3.4 试验条件

- a) 剂量选择的原则；
- b) 详细说明受试物制备、取得浓度、稳定性和样品制备的均匀程度；
- c) 详细说明受试物染毒情况；
- d) 按需要，将饲料/饮用水中受试物浓度转换成实际剂量[ $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ]；
- e) 详细说明饲料和水的质量。

#### 5.3.5 结果

- a) 体重/体重变化；
- b) 饲料消耗、水消耗；
- c) 按照性别和剂量的毒性反应数据，包括繁殖力、妊娠和其他毒性症状；
- d) 妊娠期；
- e) 关于生殖、子代、产后生长等的毒性或其他效应；
- f) 临床观察到的现象、严重程度和持续时间(是否可逆)；
- g) 活仔数、流产数；
- h) 可见异常的仔鼠数量、矮小仔鼠数量；
- i) 试验过程中动物死亡时间；
- j) 着床数、黄体数、记录时窝大小和窝重；
- k) 亲代动物被处死时的体重和器官重量的数据；
- l) 大体解剖检查结果；
- m) 详细描述镜检雄鼠生殖器和其他组织的结果；
- n) 流产数据(如果能获得)；
- o) 结果的统计处理。

#### 5.3.6 结果讨论

#### 5.3.7 结论

#### 5.3.8 结果解释

本试验可评价动物在多次接触某一受试样品后所引起的对繁殖/生长发育的毒性作用。可为进一步的生殖毒性试验提供依据。



附录 A  
(规范性附录)

生殖/发育毒性筛选试验日程图

A.1 生殖/发育毒性筛选试验日程图(在 14 d 交配期基础上的最大试验周期),见表 A.1。

表 A.1 生殖/发育毒性筛选试验日程图

				雄鼠/父体		延长暴露(可选)					
雄鼠		雄鼠 +									
						怀孕雌鼠		母体			
雌鼠								幼仔			
						未怀孕的雌鼠					
交配前期(14 d)		交配期(最长 14 d)		妊娠期(大约 22 d)		哺乳期(4 d)					
1	7	14	21	28	35	42	50	54			
试验开始				解剖雄性 (至少 4 周染毒期)			分娩	产后 4 d 解剖雌鼠 和幼鼠 雄鼠(可选)			
染毒			未染毒								

## 附录 B

(资料性附录)

## 生殖/发育试验效应汇总报告表

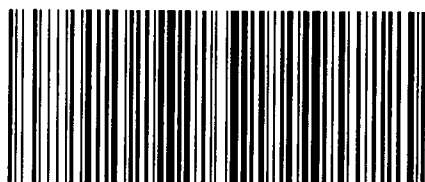
B.1 生殖/发育试验效应汇总报告,见表 B.1。

表 B.1 生殖/发育试验效应汇总报告表

观察	数值				
	对照	剂量 1	剂量 2	剂量 3	...
剂量(单位)					
起始配对数					
交配过的雌鼠数					
成功受孕雌鼠数					
交配 1 d~5 d 内受孕动物数					
交配 6 d~14 d 内受孕动物数					
妊娠					
妊娠=22 d 动物数					
妊娠≥23 d 动物数					
产下活仔的母鼠数					
幼仔 4 d 存活的母鼠数					
母鼠平均黄体数					
母鼠平均着床数					
出生时每只母鼠活仔平均数					
出生后 4 d 母鼠平均活仔数					
出生时幼仔平均性别比例					
出生后 4 d 仔鼠平均性别比例					
出生时每窝仔鼠平均重量					
出生后 4 d 每窝仔鼠平均重量					
出生时每只仔鼠平均重量					
出生后 4 d 每只仔鼠平均重量					
畸形仔鼠					
未产下畸形仔鼠的母鼠数					
产下 1 只畸形仔鼠的母鼠数					
产下 ≥2 只畸形仔鼠的母鼠数					
后代缺失					
没有吸收胎的母鼠数					
1 个吸收胎的母鼠数					
2 个吸收胎的母鼠数					
吸收胎 ≥3 个的母鼠数					

表 B.1 (续)

观察	数值				
	对照	剂量 1	剂量 2	剂量 3	...
产前					
死胎数为 0 个的母鼠数					
死胎数为 1 个的母鼠数					
死胎数为 2 个的母鼠数					
死胎数 $\geq 3$ 个的母鼠数					
产后					
仔鼠产后 4 d 仍存活的母鼠数					
仔鼠产后 4 d 死亡 1 只的母鼠数					
仔鼠产后 4 d 死亡 2 只的母鼠数					
仔鼠产后 4 d 死亡 $\geq 3$ 只母鼠数					



GB/T 21766-2008

版权专有 侵权必究

\*

书号:155066 · 1-32175

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
化 学 品 生 殖 / 发 育 毒 性 筛 选 试 验 方 法  
GB/T 21766—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](http://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 18 千字  
2008年7月第一版 2008年7月第一次印刷

\*

书号: 155066·1-32175 定价 14.00 元

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