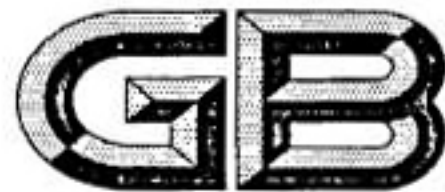


ICS 07.100
C 53



中华人民共和国国家标准

GB 15193.15—2003
代替 GB 15193.15—1994

繁 殖 试 验

Reproductive study

2003-09-24 发布

2004-05-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布
中国国家标准化管理委员会

95

前 言

本标准全文强制。

本标准代替 GB 15193.15—1994《繁殖试验》。

本标准与 GB 15193.15—1994 相比主要修改如下：

- 在“范围”中增加了受试物的具体内容：食品生产、加工、保藏、运输和销售过程中所涉及的可能对健康造成危害的化学、生物和物理因素，检验对象包括食品添加剂（含营养强化剂）、食品新资源及其成分、新资源食品、辐照食品、食品容器与包装材料、食品工具、设备、洗涤剂、消毒剂、农药残留、兽药残留、食品工业用微生物等；
- 将“实验大鼠”改为“实验动物”，并增加了对实验动物的周龄、数量等的具体要求；
- 在“剂量及分组”中增加了各组设置的一些原则要求；
- 在“操作步骤”中：增加受试物的配制、实验动物的处理、交配、每窝仔鼠的标准化及观察代数的内容；
- 在“观察指标”中，增加临床观察、饮水消耗量、器官称重和病理检查指标；
- 将原“3.3.2 计算”内容的改为“数据处理”，并增加“出生活仔率、性别比”，将妊娠率的计数修改为：

$$\text{妊娠率}(\%) = \frac{\text{分娩有活体幼仔的动物数}}{\text{怀孕动物数}} \times 100$$

- 增加“报告内容”。

自本标准实施之日起，GB 15193.15—1994 同时废止。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准主要起草人：韩驰、李悠慧。

本标准于 1994 年首次发布，本次为第一次修订。

繁殖试验

1 范围

本标准规定了繁殖试验的基本技术要求。

本标准适用于评价食品生产、加工、保藏、运输和销售过程中所涉及的可能对健康造成危害的化学、生物和物理因素对受试动物生殖机能的影响,检验对象包括食品添加剂(含营养强化剂)、食品新资源及其成分、新资源食品、辐照食品、食品容器与包装材料、食品工具、设备、洗涤剂、消毒剂、农药残留、兽药残留、食品工业用微生物等。

2 原理

凡受试物能引起生殖机能障碍,干扰配子的形成或使生殖细胞受损,其结果除可影响受精卵或孕卵的着床而导致不孕外,尚可影响胚胎的发生及胎仔的发育,如胚胎死亡导致自然流产、胎仔发育迟缓以及胎仔畸形。如果对母体造成不良影响会出现妊娠、分娩和乳汁分泌的异常,亦可出现胎仔出生后发育异常。

3 实验动物

选用5周~9周龄大鼠,试验开始时动物体重的差异应不超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。购买后至少应适应3天。每组应有足够的雌鼠和雄鼠配对,产生约20只受孕雌鼠。为此,一般在试验开始时两种性别每组各需要30只(F₀);在继续的试验中用来交配的动物每种性别每组需要25只(至少每窝雌雄各取1只,最多每窝雌雄各取2只)。选用的亲代雌鼠应是非经产鼠、非孕鼠。

4 剂量及分组

至少设3个剂量的受试物组和一个对照组。健康的动物随机分为处理组和对照组,试验开始时动物体重的差异应不超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。某些受试物的高剂量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%。其剂量设计可选最大耐受剂量或有胚胎毒性的剂量作为高剂量,低剂量组对亲代动物应不产生全身毒性或繁殖毒性(可按最大未观察到有害作用剂量的1/30或可能摄入量的100倍)。同时设对照组,对照组的饲养和处理方式与受试物组相同,根据情况,对照组可以是未处理对照、假处理对照,如果给予受试物时使用某种介质,则应设介质对照。如果受试物通过加入饲料的方式给予并引起食物摄入量 and 利用率的降低,需要考虑使用配对饲养的对照组。

5 操作步骤

5.1 受试物配制

一般用蒸馏水作溶剂,如受试物不溶于水,可用食用油、医用淀粉、羧甲基纤维素等配成乳化液或悬浮液。受试物应于灌胃前新鲜配制,除非有资料表明以溶液(或悬浊液、乳浊液等)保存具有稳定性。同时应考虑使用的介质可能对受试物的吸收、分布、代谢或滞留的影响;对化学性质的影响及由此而引起的毒性特征的影响;对饲料或饮水消耗量或动物营养状况的影响。

5.2 实验动物的处理

5.2.1 受试物的给予:经口给予,可加入饲料、饮水中或灌胃。如果受试物是灌胃给予,应每周称体重

2次,根据体重计算给予受试物的体积。

5.2.2 亲代和子代接受的受试物剂量(按动物体重给予,mg/kg 体重或 g/kg 体重)、饲料和饮水相同。F₁代的雌鼠和雄鼠在断乳后每日给予。两种性别的大鼠(亲代和 F₁代)在交配前应每日给予受试物至少连续 10 周,并继续给予受试物至试验结束。

5.2.3 给予受试物方案:试验期间,所有动物应采用相同的方式给予受试物;连续给予受试物,每周 7 天。

5.3 交配

每次交配时,每只雌鼠应与从同一剂量组随机选择的单个雄鼠同笼(1:1 交配),直到检测到阴栓,或者经过 3 个发情期或两周。查到阴栓后应尽快将雌、雄鼠分开,如果经过 3 个发情期或两周还未进行交配,也应将雌雄鼠分开,不再继续同笼。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。查到阴栓的当天为受孕 0 天。预计已怀孕的雌鼠应分开放入繁殖笼中,孕鼠临产时应提供筑巢的垫料。

5.4 每窝仔鼠数量的标准化

将每窝仔鼠于出生后第 4 天调整至相同数量(一般每窝 8 只~10 只,不应少于 8 只),尽量做到每窝内雌、雄数量相等,也可以窝内雌、雄数量不等,但各窝之间两性的鼠数应分别相同。原窝中多余的鼠应随机抽出,而不应按体重选择。

5.5 观察代数

观察代数随受检目的而异,可作一代、二代、三代或多代观察。如果在两代繁殖试验中观察到受试物对子代有明显的生殖、形态或毒性作用,则需要进行第 3 代繁殖试验,确定受试物的蓄积作用。

5.6 一代、二代和三代繁殖试验法

5.6.1 一代繁殖试验法

一代繁殖试验法示意图见图 1。

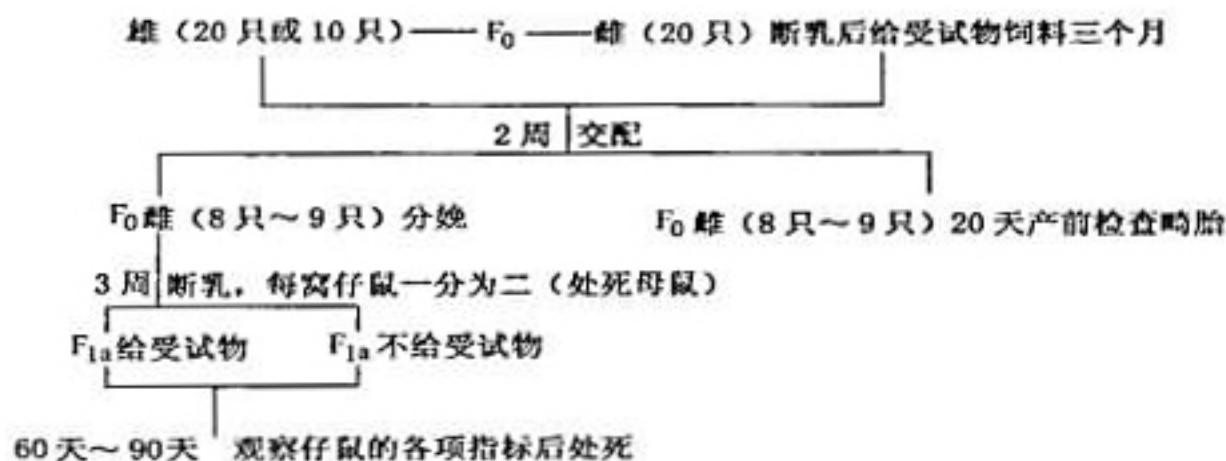


图 1 一代繁殖试验法示意图

5.6.2 两代繁殖试验法

5.6.2.1 两代繁殖试验法示意图见图 2。

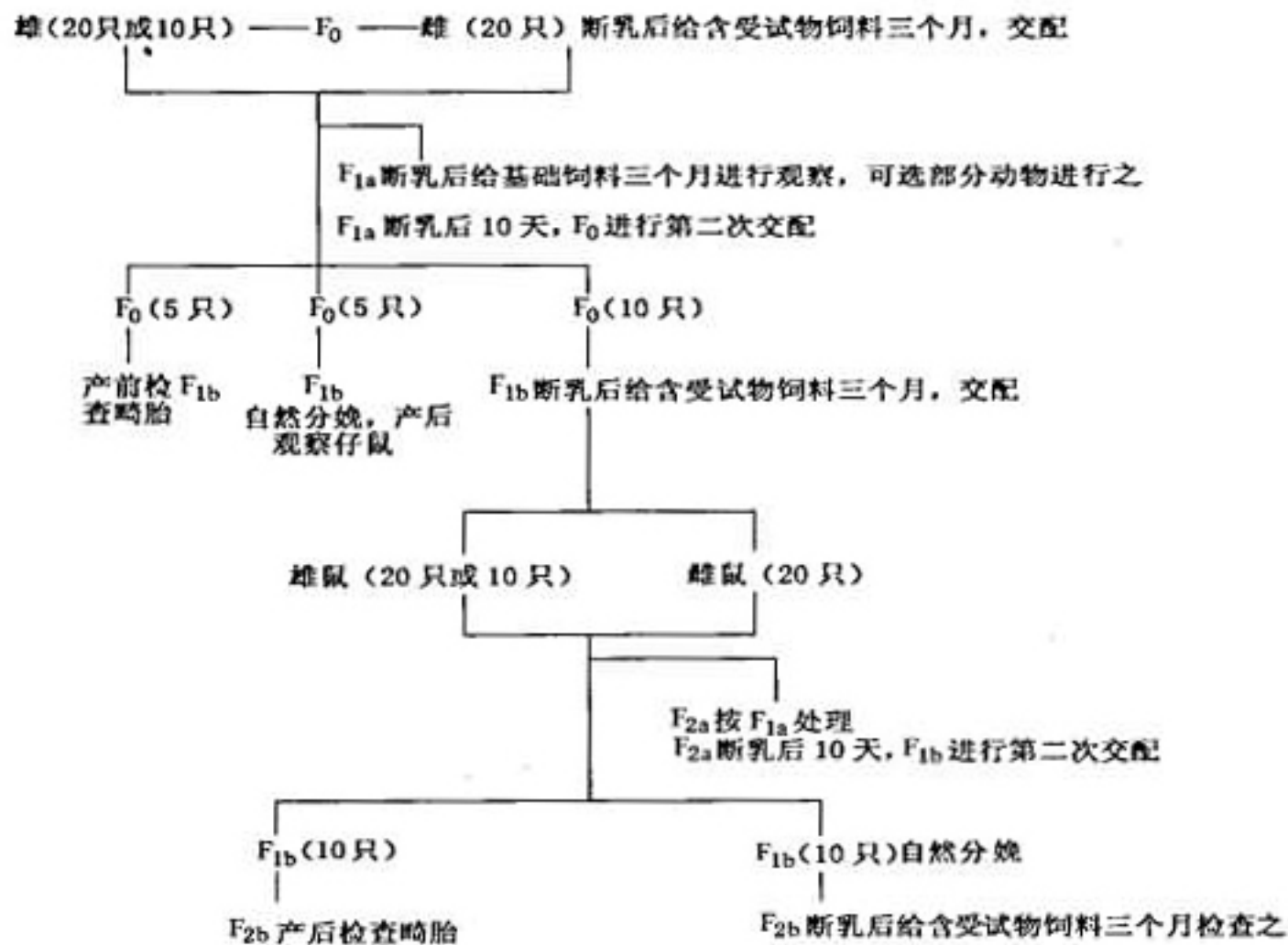


图 2 两代繁殖试验法示意图

5.6.2.2 亲代 F₀ 断乳后, 喂含受试物饲料三个月, 雌-雄即可交配, 所产仔鼠为 F_{1a}。F_{1a} 断乳后饲以不含受试物的基础饲料, 观察三个月。

5.6.2.3 F_{1a} 断乳后 10 天将 F₀ 再次交配, 所产仔鼠为 F_{1b}, 将 20 只孕鼠(F₀) 中, 5 只产前 2 天~3 天剖腹检查胎鼠有无畸形; 另 5 只自然分娩观察产后仔鼠情况; 作 10 只孕鼠自然分娩, 所产仔鼠 F_{1b} 继续繁殖。

5.6.2.4 F_{1b} 断乳后喂含受试物饲料三个月, 进行交配, 所产仔鼠 F_{2a}。在断乳后喂不含受试物的饲料, 观察三个月。

5.6.2.5 仔鼠 F_{2a} 断乳后 10 天与 F_{1b} 再次交配, 产 F_{2b} 前将 F_{1b} 孕鼠分两群, 每群 10 只, 同 5.6.2.3。

5.6.3 三代繁殖试验法

三代繁殖试验法示意图见图 3。

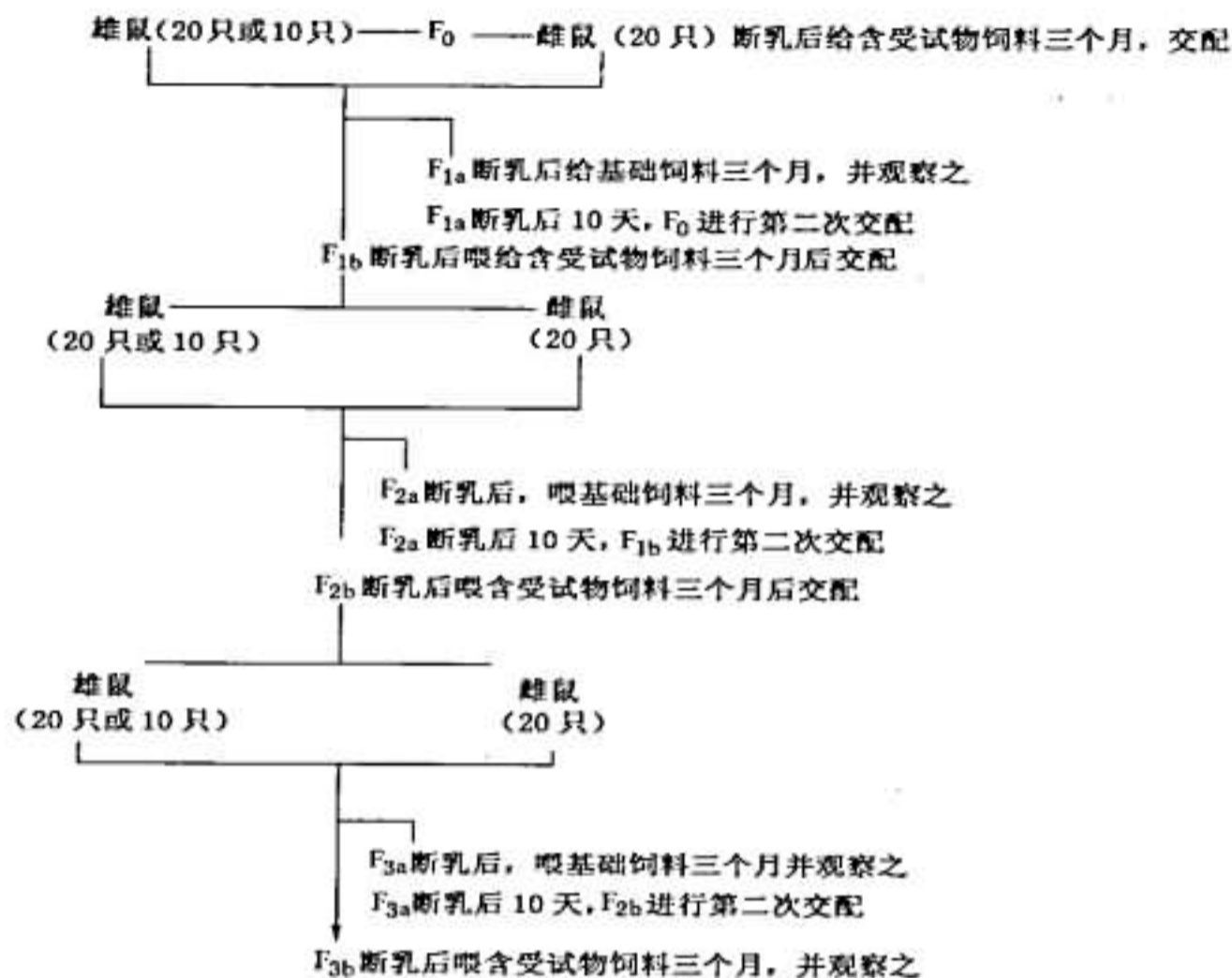


图3 三代繁殖试验法示意图

5.7 亲代、一代、二代、三代繁殖试验

5.7.1 亲代、一代、二代、三代繁殖试验可参考 5.6.2.2, 5.6.2.3 进行。

5.7.2 根据情况可繁殖两窝以上。

6 观察指标

6.1 一般情况观察: 做全面的临床检查, 记录一般健康状况、受试物的所有的毒性和功效作用所产生的症状、相关的行为改变、分娩困难或延迟的迹象、所有的毒性指征及死亡率, 通过每日检查(F₀、F₁代雌鼠)阴栓估计性周期长短和正常状态。

6.2 称体重, 亲代动物(P、F₁代, 和 F₂代, 根据繁殖的代数确定)在给予受试物的第一天称重, 以后每周称重, 母鼠应在受孕的 0、7、14 和 21 天称重, 在哺乳期应同时称仔鼠的窝重。

6.3 在交配前及受孕期, 至少每周称一次食物消耗量, 如受试物掺在饮水中喂养, 则至少每周量一次饮水消耗量。

6.4 试验结束时, 所有亲代(F₀)和 F₁代(F₂代、F₃代, 根据繁殖的代数确定)雄鼠均应对附睾的精子进行检查, 对精子的活动性、形状及数量进行评价。精子的活动性可在镜下观察; 精子形状可只检查对照组和高剂量组的亲代和子代雄鼠, 每个动物至少检查 200 个精子。

6.5 子代(offspring)观察指标: 在分娩后(哺乳 0 天)应尽快检查每窝仔鼠的数量、性别、死产数、活产数及肉眼可见的异常, 在出生当天死亡的, 应尽可能检查其缺陷和死亡原因。记录活产数量、性别, 并在出生时(或尽快)对单个活产仔鼠称重, 以后至少在哺乳期的第 4、7、14 和 21 天, 阴道开放或龟头包皮分开, 以及试验结束时称重。用来进行交配的 F₁代断乳鼠应记录其阴道开放或包皮分开的年龄, 观察性

别比例及性成熟情况。

6.6 器官称重：试验结束时所有 P、F₁ 代亲本动物称重：子宫（包括输卵管和子宫颈）、卵巢；睾丸、附睾（两侧总重量）；脑、肝、肾、脾和已知的靶组织。

6.7 病理检查：试验结束时和试验期间死亡的所有亲代动物均应作大体解剖并在显微镜下检查，观察各种形态结构异常及病理改变，特别注意生殖器官。如果每窝仔鼠的数量足够，F₁ 代、F₂ 代（和 F₃ 代）每窝每种性别至少取 3 只进行同样检查。应检查的器官及组织有：子宫、卵巢、睾丸、附睾、靶器官（如果已知其靶器官），大体观察异常的组织。

7 数据处理

$$\text{受孕率}(\%) = \text{怀孕动物数} / \text{交配雌性动物数} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{妊娠率}(\%) = \text{分娩有活体幼仔的动物数} / \text{怀孕动物数} \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$\text{出生活仔率}(\%) = \text{出生时活的仔鼠数} / \text{出生时仔鼠总数} \times 100 \quad \dots\dots\dots(3)$$

$$\text{出生存活率}(\%) = \text{产后 4 天仔鼠存活数} / \text{出生时活仔数} \times 100 \quad \dots\dots\dots(4)$$

$$\text{哺乳存活率}(\%) = \text{21 天断乳时仔鼠存活数} / \text{出生 4 天后仔鼠存活数} \times 100 \quad \dots\dots\dots(5)$$

$$\text{性别比} = \text{仔鼠成熟时雄鼠数} / \text{雌鼠数} \quad \dots\dots\dots(6)$$

8 报告内容

8.1 试验方案、受试物剂量、所有数值的绝对值、每个个体的完整数据、各窝的数据汇总表和分析表。

8.2 一般健康状况、体重、进食量、死亡情况、受孕率、妊娠率、出生活仔率、性别比、出生存活率、哺乳存活率（4 天、21 天存活）、产仔总数、宫重及平均仔重。

8.3 对所有主要参数进行讨论。分析结果时可以与历史对照比较，但应提供历史对照的试验资料，如日期、动物种系、受试物介质和给予受试物途径。