



中华人民共和国国家标准

GB 15193.9—2014

食品安全国家标准 啮齿类动物显性致死试验

2014-12-24 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

前 言

本标准代替 GB 15193.9—2003《显性致死试验》。

本标准与 GB 15193.9—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 啮齿类动物显性致死试验”;
- 增加了术语和定义;
- 修改了试验目的和原理;
- 修改了试验方法;
- 修改了数据处理;
- 增加了试验报告;
- 增加了试验的解释。

食品安全国家标准

啮齿类动物显性致死试验

1 范围

本标准规定了啮齿类动物显性致死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致突变作用。

2 术语和定义

2.1 显性致死突变

发生于生殖细胞的一种染色体畸变,这种遗传上的结构或数目改变并不引起生殖细胞(精子或卵子)的机能障碍,而是直接造成受精卵或发育期胚胎的死亡。

3 试验目的和原理

显性致死试验是检测受试物诱发哺乳动物生殖细胞遗传毒性的试验方法,其观察终点为显性致死突变。致突变物可引起哺乳动物生殖细胞染色体畸变,以致不能与异性生殖细胞结合或导致受精卵在着床前死亡,或导致胚胎早期死亡。一般以受试物处理雄性啮齿类动物,然后与雌性动物交配,按照顺次的周期对不同发育阶段的生殖细胞进行检测,经过适当时间后,处死雌性动物检查子宫内容物,确定着床数、活胚胎数和死亡胚胎数。如果处理组死亡胚胎数增加或活胚胎数减少,与对照组比较有统计学意义,并呈剂量-反应关系或试验结果能够重复者,则可认为该受试物为哺乳动物生殖细胞的致突变物。

4 试验方法

4.1 受试物

4.1.1 受试物的配制:受试物应溶解或悬浮于合适的溶媒中,溶媒应为无毒物质,不与受试物发生化学反应。首选溶媒为水,脂溶性的受试物可使用食用植物油(如橄榄油、玉米油等),不溶于水或油的受试物可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液,不能配制成混悬液时,还可配制成如糊状物的其他形式。一般情况下受试物应现用现配,有资料表明其溶液或混悬液储存稳定者除外。

4.1.2 给予途径:应采用灌胃法,或用喂饲法,小鼠常用灌胃体积为 10 mL/kg 体重~20 mL/kg 体重,大鼠常用灌胃体积为 10 mL/kg 体重。阳性对照物也可采用腹腔注射的方法,注射体积为 10 mL/kg 体重~20 mL/kg 体重。

4.1.3 给予受试物的方式:一般采用每天 1 次、连续 5 d 的给予方式。如果认为其他方式合理的也可采用,如一次性或连续 3 个月给予受试物。

4.2 实验动物

4.2.1 动物品系与级别:动物品系应选择显性致死本底值低、受孕率高且着床数多、经生殖能力预试受孕率在 70% 以上者,推荐使用小鼠或大鼠。实验动物应符合 GB 14922.1 和 GB 14922.2 的有关规定且有质量

合格证,健康的雄性成年小鼠(性成熟,6周龄~8周龄,或体重30 g以上),或大鼠(性成熟,8周龄~10周龄,或体重200 g以上)。交配用的成年雌鼠,应该是未曾有过交配和生育史者,不同交配周期的雌鼠周龄、体重应相近似。

4.2.2 动物数量:应使用适当数目的雄性动物,雄鼠的数目应足以使每个交配周期每组产生30只~50只受孕雌鼠。每组雄鼠应不少于15只。

4.2.3 动物饲养:实验动物饲养条件应符合GB 14925、饮用水应符合GB 5749、饲料应符合GB 14924的有关规定。

4.3 剂量

试验至少设3个受试物剂量组,高剂量组应能引起动物出现某些毒性体征,如生育力轻度下降,高剂量组受试物剂量可在 $1/10 LD_{50}$ ~ $1/3 LD_{50}$ 之间。急性毒性试验给予受试物最大耐受剂量(最大使用浓度和最大灌胃容量)求不出 LD_{50} 时,则以10 g/kg体重、或人体可能摄入量的100倍、或受试物最大给予剂量为最高剂量,然后在此剂量下再设2个剂量组。一般应同时做阳性和阴性(溶媒)对照组,如果同一实验室最近12个月内阳性对照组已获得阳性结果,且实验室环境条件和动物品系没有变化,则可不再设阳性对照组。阳性对照物常选用环磷酰胺(cyclophosphamide),30 mg/kg体重~40 mg/kg体重,腹腔注射,每天1次,连续5 d;其他还可选用三亚乙基密胺(triethylenemelamine)、甲基磺酸乙酯(ethyl methanesulfonate)、甲基磺酸甲酯(methyl methanesulfonate)等。

4.4 试验步骤和观察指标

4.4.1 交配:给予雄鼠受试物后次日(一次染毒法),或末次给予雄鼠受试物后次日(多次染毒法),雄鼠与雌鼠按1:1或1:2比例同笼交配5 d后,或根据阴道精子、阴栓检查确定交配成功后,取出雌鼠另行饲养。间隔2 d后,雄鼠以同样比例再与另一批雌鼠同笼交配,小鼠如此进行5批~6批,大鼠8批~10批。

4.4.2 胚胎检查:以雄鼠与雌鼠同笼日期算起第15天~第17天,处死雌鼠后,剖腹取出子宫,检查并记录每一雌鼠的活胚胎数、早期死亡胚胎数与晚期死亡胚胎数。

胚胎存活或死亡的鉴别方法如下:

——活胎:完整成形,色鲜红,有自然运动,机械刺激后有运动反应。

——早期死亡胚胎:胚胎形体较小,外形不完整,胎盘较小或不明显。最早期死亡胚胎会在子宫内壁上隆起一小瘤。如已完全被吸收,仅在子宫内壁上留一隆起暗褐色点状物。

——晚期死亡胚胎:成形,色泽暗淡,无自然运动,机械刺激后无运动反应。

5 数据处理和结果评价

5.1 数据处理

5.1.1 统计分析方法

显性致死试验的检查结果,以试验组为单位分别计算每个交配周期的下列指标。按试验组与对照组动物的各项指标分别采用适当的统计分析方法,如 χ^2 检验、单因素方差分析或秩和检验等,以评定受试物的致突变性。受孕率可用 χ^2 检验,平均着床数、平均死亡胚胎数可用单因素方差分析或秩和检验法,胚胎死亡率经反正弦转换后用单因素方差分析或秩和检验。

5.1.2 生育能力指标

生育能力指标按式(1)~式(3)计算:

$$\begin{aligned} \text{受孕率} &= \text{受孕雌鼠数} / \text{交配雌鼠数} \times 100\% && \dots\dots\dots(1) \\ \text{总着床数} &= \text{活胚胎数} + \text{早期死亡胚胎数} + \text{晚期死亡胚胎数} && \dots\dots\dots(2) \\ \text{平均着床数} &= \text{总着床数} / \text{受孕雌鼠数} && \dots\dots\dots(3) \end{aligned}$$

5.1.3 显性致死指标

显性致死指标按式(4)~式(6)计算:

$$\begin{aligned} \text{死亡胚胎数} &= \text{早期死亡胚胎数} + \text{晚期死亡胚胎数} && \dots\dots\dots(4) \\ \text{胚胎死亡率} &= \text{死亡胚胎数} / \text{总着床数} \times 100\% && \dots\dots\dots(5) \\ \text{平均死亡胚胎数} &= \text{死亡胚胎数} / \text{受孕雌鼠数} && \dots\dots\dots(6) \end{aligned}$$

5.2 结果评价

主要依据显性致死指标的结果进行判定:

- a) 试验组与对照组相比较,胚胎死亡率(%)和(或)平均死亡胚胎数明显高于对照组,有统计学意义并有剂量-反应关系时,即可确认为阳性结果。
- b) 若统计学上差异有显著性,但无剂量反应关系时,则应进行重复试验,结果能重复者可确定为阳性。与此同时,应在综合考虑生物学意义和统计学意义的基础上做出最终评价。

6 试验报告

- 6.1 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号。
- 6.2 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期。
- 6.3 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。
- 6.4 试验摘要。
- 6.5 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。
- 6.6 实验动物:物种、品系、级别、数量、年龄或体重、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,实验动物饲养环境(温度、相对湿度、实验动物使用许可证号),饲料来源(供应商名称、实验动物饲料生产许可证号)。
- 6.7 试验方法:试验分组、每组动物数、阳性和阴性(溶媒)对照组,选择剂量的原则或依据、剂量、受试物给予途径及期限,试验周期、交配程序、确定是否交配成功的方法、动物处死时间、观察指标、统计学方法。
- 6.8 试验结果:以文字描述和表格逐项进行汇总,包括中毒体征、妊娠情况、着床数、活胚胎数、死亡胚胎数及相关指标(胚胎死亡率、平均死亡胚胎数),给出结果的统计处理方法。
- 6.9 试验结论:根据观察到的效应和产生效应的剂量水平评价是否具有显性致死作用。

7 试验的解释

显性致死是染色体结构畸变或染色体数目异常的结果,但也不能排除基因突变和毒性作用。因此,显性致死试验结果阳性表明受试物对该物种动物的生殖细胞可能具有遗传毒性;显性致死试验结果阴性表明在本试验条件下受试物对该种属动物的生殖细胞可能没有遗传毒性。