

16 致畸试验

Teratogenicity Test

1 范围

本规范规定了动物致畸试验的基本原则，要求和方法。
本规范用于检测化妆品原料的致畸性。

2 试验目的

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 定义

致畸性 teratogenicity

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。

4 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。

5 试验方法

5.1 试剂

5.1.1 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。

5.1.2 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，放入棕色瓶中。

5.1.3 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。

5.1.4 茜素红溶液：茜素红 0.1g，氢氧化钾 10g，蒸馏水 1000mL。

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

5.1.6 透明液 B：甘油与蒸馏水等量混合。

5.1.7 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

5.2 实验动物和饲养环境

动物选择：首选为健康的性成熟大鼠。

实验动物及实验动物房应符合国家相应规定。

5.3 剂量和分组

至少设三个剂量组，最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。最低剂量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。

5.4 试验步骤

5.4.1 “孕鼠”的检出和给受试物时间

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。孕鼠于孕期 0、6、10、15 和 20 d 称重, 并根据体重调整给受试物量。

5.4.2 孕鼠处死和一般检查

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。

5.4.3 活胎鼠检查

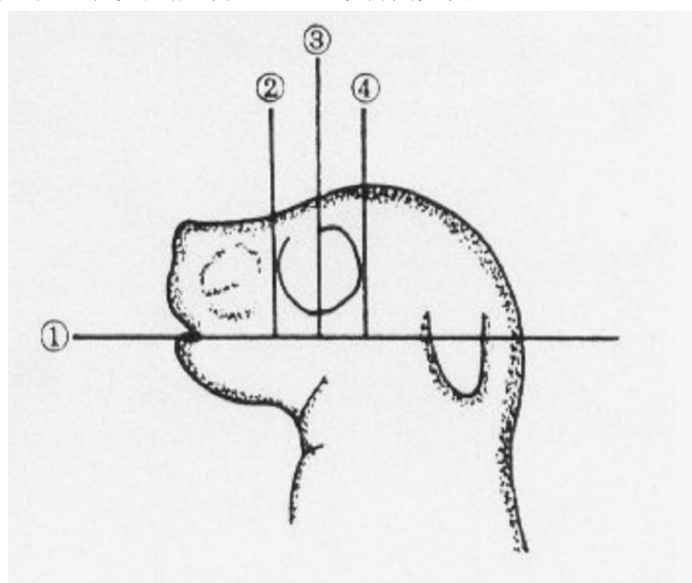
逐一记录胎鼠体重、体长、尾长、检查胎鼠外观有无异常, 如头部有无脑膨出、露脑、小头、小耳、小眼、无眼和睁眼、兔唇、下颌裂, 躯干部有无腹壁裂、脐疝、脊柱弯曲, 四肢有无小肢、短肢、并趾、多趾、无趾等畸形, 尾部有无短尾、卷尾、无尾、肛门有无闭锁。

5.4.4 胎鼠骨标本的制作与检查

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 1g—2g/100mL 的氢氧化钾溶液内 (至少 5 倍于胎仔体积) 8h—72h, 透明后放入茜素红应用液中染色 6h—48h, 并轻摇 1—2 次/d, 至头骨染红为宜。再放入透明液 A 中 1d—2d, 放入透明液 B 中 2d—3d, 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。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—2 天, 换到透明液 B 中 2—3 天。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。(剥皮法) 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、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。

5.4.5 胎鼠内脏检查

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。



- (1) 经口从舌与两口角向枕部横切（切面 1），观察大脑、间脑、延髓、舌及顎裂。
- (2) 在眼前面作垂直纵切（切面 2），可见鼻部。
- (3) 从头部垂直通过眼球中央作纵切（切面 3）。
- (4) 沿头部最大横位处穿过作横切（切面 4）。

以上切面的目的可观察舌裂、顎裂、眼球畸形、脑和脑室异常。

- (5) 沿下顎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。

5.5 统计方法及结果评定

各种率的检查用 X^2 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。

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。

$$\text{致畸指数} = \frac{\text{雌鼠 } LD_{50}}{\text{最小致畸剂量}}$$

$$\text{致畸危害指数} = \frac{\text{最大不致畸剂量}}{\text{最大可能摄入量}}$$

6 结果解释

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。