

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，试验方法和技术要求。

本规范用于检测化妆品原料的致畸作用。

2 术语和定义

2.1 致畸性 teratogenicity

化学物质在器官发生期间引起子代永久性结构异常的特性。

2.2 母体毒性 maternal toxicity

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予妊娠动物化学物质，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后引起胎仔畸形的可能性，预测其对人体可能的致畸性。

4 仪器和试剂

4.1 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。

4.2 主要试剂

4.2.1 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。

4.2.2 茜素红储备液：以50% 乙酸为溶剂的茜素红饱和液5.0mL，甘油10.0mL，1%水合氯醛60.0mL混合，存于棕色瓶中。

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

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

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

4.2.6 透明液B：甘油与蒸馏水等体积混合。

4.2.7 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。

5 试验方法

5.1 受试物

受试物应使用原始样品，若不能使用原始样品，应对受试物进行适当处理。

5.2 实验动物和饲养环境

5.2.1 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。

5.2.2 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，家兔每个剂量水平的怀孕动物数不少于12只。

5.2.3 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标准和规定。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。

5.3 剂量和分组

试验至少设3个剂量组，同时设溶剂对照组，溶剂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为敌枯双、五氯酚钠、阿司匹林及维生素A等，或者用环磷酰胺于孕第12d腹腔注射1次。曾用阳性物开展过致畸试验、并在所用实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28天或90天经口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28天或90天经口毒性试验观察到有害作用，以最小观察到有害作用剂量为高剂量组，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。

5.4 试验步骤和观察指标

5.4.1 “受孕动物”的检出

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，当天作为“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。

5.4.2 受试物的给予途径

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，首选溶剂为水，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，并根据母体体重调整灌胃体积。灌胃体积一般为10mL/kg体重，如为水溶液时，最大灌胃体积可达20mL/kg体重，如为油性液体，灌胃体积应不超过4mL/kg体重；各组灌胃体积应一致。

5.4.3 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，发现虚弱或频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0d、给予受试物第1d、给予受试物期间每3d及处死当日称母体体重。若通过饮水途径给予受试物，还应记录饮水量。

5.4.4 受孕母体处死和一般检查

分娩前1d（一般大鼠为孕第20d，家兔为孕第28d）处死母体。剖腹检查亲代受孕情况和胎体发育。迅速取出子宫，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。

5.4.5 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。致畸试验胎鼠外观常见检查项目见表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	躯干部	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		

5.4.6 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，取出胎仔流水冲洗数分钟后放入10g/L~20g/L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次/d~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。

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次~

3次，待骨骼染成红色时为止。将胎鼠放入透明液A中1d~2d，换到透明液B中2d~3d。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（胸骨骨化中心为5个，剑突1块；骨化不全时首先缺第5胸骨、次为缺第2胸骨）。肋骨通常12对~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个~13个，腰椎5个~6个，底椎4个，尾椎3个~5个），有无融合、纵裂等。最后检查四肢骨。致畸试验胎鼠骨骼常见检查项目见表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
骨盆	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

5.4.7 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，将胎鼠仰放在石蜡板上，剪去四肢和尾，用刀片在头部横切或纵切5刀，再剖开胸腔和腹腔。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。

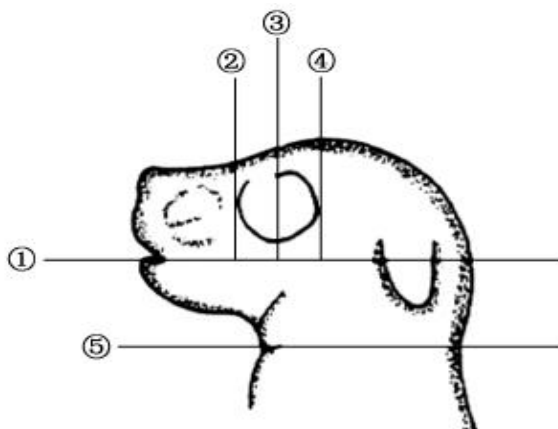


图 1 胎鼠头部示意图

(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脑部作切面(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。致畸试验胎鼠内脏常见检查项目见表3。

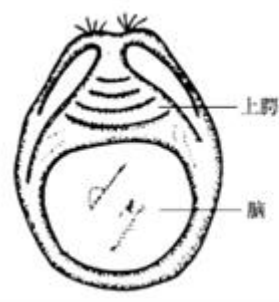


图 2 头部第①切面图示——上颌

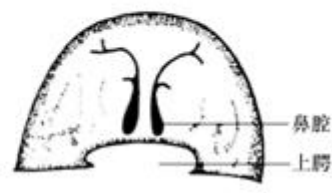


图 3 头部第②切面图示——鼻道



图 4 头部第③切面图示——眼球

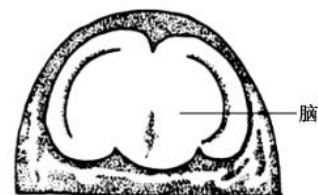


图 5 头部第④切面图示——脑室

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		气管食管痿		卵巢异位
胸部	右位心	腹部	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。

5.5 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、子代动物数、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。

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

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

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

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

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

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

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

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

6 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，试验结果从动物外推到人时，必须注意种属差异。