



中华人民共和国国家标准

GB/T 20035—202×
代替GB/T 21035—2007

饲料安全性评价 喂养致畸试验

Feed Safety Evaluation—Feeding Teratogenicity Test

(征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

前言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替GB/T 21035—2007《饲料安全性评价 喂养致畸实验》，与GB/T 21035—2007相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a. 增加了试验目的和原理（见第1章，2007年版的第1章）；
- b. 增加了术语和定义、试验目的、试验报告和解释的内容；
- c. 增加了动物起始体重的差异应不超过平均体重的20%的要求；
- d. 增加了动物饲养要求；
- e. 增加了一种建立阳性对照组的方式“用环磷酰胺(15 mg/kg体重)于孕第 12天腹腔注射1次”；
- f. 增加了母体动物死亡率不得大于10%的内容；
- g. 修改了传统致畸试验中给予大鼠受试物的时间；
- h. 增加了观察给予受试物期间母体的表现，必要时记录饮水量；
- i. 删除了表格“致畸试验记录内容”，增加了需要整理的数据内容；统计项目中增加了净增重和性别比，删除了卵巢重量统计；
- j. 增加了试验报告应列出的内容和信息。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2007年首次发布为GB/T 21035—2007；

——本次为第一次修订。

饲料安全性评价 喂养致畸试验

1 范围

本文件描述了喂养致畸试验的试验方法、技术要求和评价报告信息。
本文件适用于评价饲料和饲料添加剂的致畸性。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 20195 动物饲料 试样的制备
- GB 14922.1 实验动物 寄生虫学等级及监测
- GB 14922.2 实验动物 微生物学等级及监测
- GB 14924.1 实验动物 配合饲料通用质量标准
- GB 14924.2 实验动物 配合饲料卫生标准
- GB 14924.3 实验动物 小鼠、大鼠配合饲料
- GB 14925 实验动物 环境与设施
- 国家科委第2号令 实验动物管理条例

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 饲料

饲料是指经工业化加工、制作的供动物食用的产品，包括单一饲料、添加剂预混合饲料、浓缩饲料、配合饲料和精料补充料。

3.2 饲料添加剂

饲料添加剂是指在饲料加工、制作、使用过程中添加的少量或者微量物质，包括营养性饲料添加剂和一般饲料添加剂。

3.3 发育毒性

个体在出生前暴露于受试物、发育成为成体之前（包括胚期、胎期以及出生后）出现的有害作用，表现为发育生物体的结构异常、生长改变、功能缺陷或死亡。

3.4 致畸性

受试物在妊娠的关键时期（尤其是器官发生期间）暴露时，导致子代发育畸形的能力。

3.5 母体毒性

受试物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。

3.6 妊娠率 gestation index

妊娠动物数占确认交配雌性动物数的百分比。

3.7 分娩率 parturition index

分娩活仔雌性动物数占妊娠动物数的百分比。

3.8 死胎率 fetal mortality

死胎仔数占分娩胎仔总数的百分比。

3.9 畸胎出现率 incidence of terata

畸胎总数占活胎仔总数的百分比。

3.10 畸胎总数 sum of terata

出现畸形的所有活胎仔数。

3.11 单项畸形出现率 incidence of single teratosis

出现某种畸形的活胎仔数占活胎仔总数的百分比。

3.12 活胎仔平均畸形出现率 mean incidence of teratosis

畸形总数占活胎仔总数的百分比。

3.13 畸形总数 sum of teratosis

所有活胎仔出现的各种畸形种类数。

3.14 母体畸胎出现率 incidence of terata parturition

分娩畸胎的母体数占妊娠母体总数的百分比。

4 试验目的和原理

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。因此,在受孕动物胚胎的器官形成期给予受试物,可检出该物质对胎仔的致畸作用。

检测妊娠动物接触受试物后引起的致畸可能性,预测其对人体可能的致畸性。

5 试剂及溶液配制

除非另有规定,本法所用试剂均为分析纯,水为去离子水,符合GB/T 6682规定的二级用水要求。

5.1 乙醇固定液: 95%乙醇。

5.2 鲍因(Bouins)固定液: 取饱和苦味酸溶液750mL、40%甲醛250 mL和乙酸50mL混合而成。

5.3 氢氧化钾溶液: 分别配制1%和2%两种不同浓度的氢氧化钾溶液。

- 5.4 茜素红 (alizarin red) 贮备液：将茜素红加入5mL乙酸、10mL纯甘油和60mL 1%水合氯醛的混合液中至饱和。
- 5.5 茜素红应用液：取茜素红贮备液1-5mL，用10g/L-20g/L氢氧化钾溶液稀释至1000mL，用前临时配制。
- 5.6 茜素红溶液：取茜素红 0.1 g，氢氧化钾 10g，蒸馏水 1000mL，临用时配制（剥皮法骨骼染色液）。
- 5.7 脱水透明液A：甘油200mL、2%氢氧化钾溶液30mL，加蒸馏水至1000mL。
- 5.8 脱水透明液B：甘油500mL、2%氢氧化钾溶液30mL，加蒸馏水至1000mL。
- 5.9 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。

6 仪器与设备

- 6.1 实验室常用设备。
- 6.2 放大镜和解剖显微镜。
- 6.3 生物显微镜。
- 6.4 体视显微镜。
- 6.5 分析天平。
- 6.6 游标卡尺（百分尺）。

7 受试物

受试物应使用原始样品，若不能使用原始样品，应按照受试物处理原则对受试物进行适当处理。

8 实验动物及饲养管理

8.1 实验动物

8.1.1 种、系选择

实验动物的选择应符合 GB 14922.2 的有关规定。啮齿类首选大鼠，非啮齿类首选家兔。若选用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20%。所用动物应注明种类、品系、性别、体重和周龄。

8.1.2 动物性别和数量

性成熟雄性和雌性动物通常按1:1 或 1:2 比例合笼交配，如果5 d内未交配，应更换雄性动物。为了获得足够的胎仔来评价其致畸作用，每个剂量水平的怀孕动物数不少于12只。

8.2 动物准备

试验前动物在实验动物房至少应进行 3 d~5d环境适应和检疫观察。

8.3 动物饲养

实验动物饲养条件、饮用水、饲料应分别符合 GB 14925、GB 5749、GB 14924.3 有关规定。试验期间动物自由饮水和摄食，妊娠动物应单笼饲养。

9 剂量分组

试验组剂量一般选择在1/10~1/100母体LD50之间。高剂量一般应使母体产生中毒症状；低剂量应不引起母鼠产生可观察到的中毒症状；在高剂量组与低剂量组之间设1~2个中剂量组。设1个空白对照组或溶剂对照组，必要时还要设阳性对照组。每组孕鼠不能低于12只。

试验至少设3个剂量组，同时设溶媒对照组，溶媒对照组除不给受试物外，其余处理均同剂量组。

常用经口给予的阳性对照物及参考剂量为敌枯双(0.5 mg/kg体重-1.0 mg/kg 体重)、五氯酚钠 (30 mg/kg体重)、阿斯匹林 (250 mg/kg体重-300 mg/kg体重) 及维生素A (7500 μg/kg体重-13000 μg/kg体重重视黄醇当量) 等, 或者用环磷酰胺(15mg/kg体重) 于孕第12天腹腔注射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, 试验可略去一置阳性对照组。

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28d或90d经口试验观察到有害作用, 以最小观察到有害作用剂量水平(no-observed-adverse-effect level, NOAEL)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。

10 操作步骤

10.1 受试物给予与观察

一般采用混饲或混饮给予受试物, 若选用其他途径应说明理由。以大鼠为例, 原则上雄鼠交配前4周~8周开始给予受试物直至交配成功, 确证雌鼠受孕为止。雌鼠从交配前2周~4周开始给予受试物至孕期的第13天~第15天。在试验期间, 每天观察试验鼠的体征、行为活动、采食和饮水情况。每周至少称1次体重, 并同时计算采食量。

若采取受试物经口灌胃给予, 要将受试物溶解或悬浮于合适的溶媒中, 首选溶媒为水, 不溶于水的受试物可使用植物油(如橄榄油、玉米油等), 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1次, 根据母体体重调整灌胃体积。灌胃体积一般不超过10 mL/kg体重, 如为水溶液时, 最大灌胃体积可达20 mL/kg体重; 如为油性液体, 灌胃体积应不超过4 mL/kg体重; 各组灌胃体积一致。

试验期间, 每天观察试验动物的体征、行为活动、采食和饮水情况。每周至少称1次体重, 并同时计算采食量。

10.2 受孕检查

雌、雄大鼠按1:1(或2:1) 同笼后, 每日早晨检查笼底有无阴道栓(石蜡状圆柱体) 或用浸湿生理盐水的棉签取阴道分泌物涂布于滴有1滴生理盐水的玻片上, 置低倍显微镜下检查有无精子。发现阴道栓或精子的当天定为孕期的0 d。

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。将检出的"受孕动物"随机分到各组, 并称重和编号。

一般每组应获得13~15只受孕动物, 以保证实验结束时妊娠母兽数不少于12只。

10.3 母体观察和称重

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, 发现虚弱或濒死的动物应进行隔离或处死, 母体有流产或早产征兆时应及时剖检。

孕鼠于孕期的0 d、7 d、14 d 和20 d 称重, 以观察孕鼠的体重变化, 随时注意记录孕鼠的状况。若通过饮水途径给予受试物, 还应记录饮水量。

孕兔或其它动物称重时间根据各自孕期长短确定。

10.4 受孕母体处死和检查

10.4.1 一般检查

于分娩前1天(一般大鼠为孕第20天、家兔为孕第28天)处死母体,沿腹中线剖开腹腔,取出子宫。剖腹检查亲代受孕情况和胎体发育。迅速取出子宫,称量子宫连胎重,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。

10.4.2 活胎检查(以胎鼠为例)

逐个记录活胎鼠体重、性别、体长,外观检查头颅外形、面部、躯干、四肢等有无畸形,包括,露脑、脑膨出、眼部畸形(小眼、无眼、睁眼等)鼻孔扩大,单鼻孔、唇裂、脊柱裂,四肢及尾畸形等等,见表1。

表 1 致畸试验活胎外观检查项目

部位	检查项目	部位	检查项目	部位	检查项目
头部	无脑	躯干部	胸骨裂	四肢	多肢
	脑膨出		胸部裂		无肢
	顶骨裂		脊椎裂		短肢
	脑积水		腹裂		半肢
	小头症		脊椎侧弯		多趾
	颜面裂		脊椎后弯		无趾
	小眼症		脐疝		并趾
	眼球突出		尿道下裂		短趾
	无耳症		无肛门		缺趾
	小耳症		短尾、卷尾		
	耳低位		无尾		
	无颚症				
	小颚症				
	下颚裂				
	口唇裂				

10.4.3 骨骼标本制作与检查(以胎鼠为例)

骨骼标本制作方法一:将每窝1/2的活胎放入95%乙醇中固定2周~3周,取出胎仔,流水冲洗数分钟后放入10 g/L~20 g/L的氢氧化钾溶液内(至少5倍于胎仔体积)8 h~72 h,透明后放入茜素红应用液中染色6h~48 h,并轻摇1次/d~2次/d,至头骨染红为宜。再放入透明液A中1 d~2 d,放入透明液B中2 d~3 d,待骨骼染红而软组织基本褪色。

骨骼标本制作方法二(剥皮法):将胎鼠去皮、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。将胎仔换入透明液A中1 d~2 d,换入透明液B中2 d~3 d。待胎鼠骨骼已染红,而软组织的紫红色基本褪去,可换置甘油中。

胎仔骨骼检查:将骨骼标本放入小平皿中,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。脊椎发育和椎体数目(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。见表2。

表2 致畸试验胎仔骨骼检查项目

部位	检查项目
枕骨	骨化中心缺失
脊椎骨	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(指骨)	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

10.4.4 内脏检查(以胎鼠为例)

将每窝1/2的胎鼠放入鲍因固定液(4.2)中,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。观察不同切面器官的大小、形状和相对位置。切面制作参见图1~图5。

- a) 经口从上腭与舌之间向枕部横切(切面1),可观察大脑、间脑、正脑、舌及顎裂。
- b) 从眼眶前缘垂直纵切(切面2),可观察鼻道、鼻中隔。
- c) 从头部经眼球中央垂直纵切(切面3),可观察眼球、视网膜、嗅球。
- d) 从头部最大横位处纵切(切面4),可观察大脑及脑室。
- e) 沿下顎水平穿过颈部横切(切面5),可观察舌、咽、气管、食管和延髓。

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、子宫和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等。见表3。

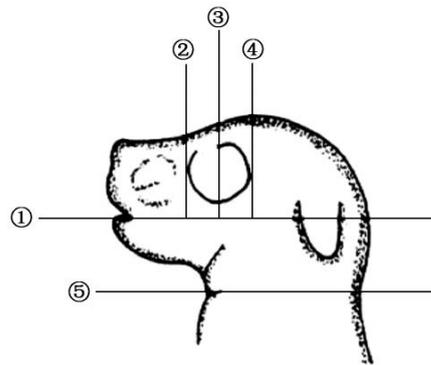


图 1 胎鼠切面制作示意图

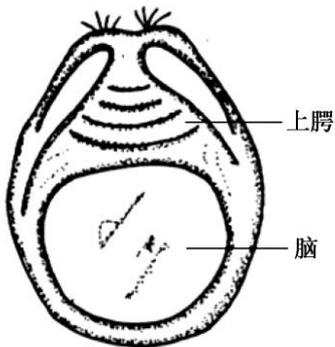


图 2 头部第①切面图示——上腭

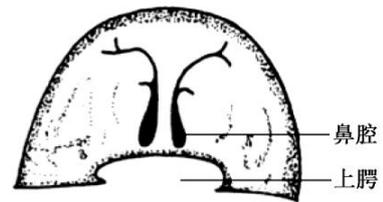


图 3 头部第②切面图示——鼻道

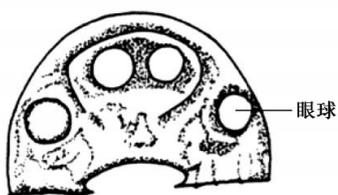


图 4 头部第③切面图示——眼球

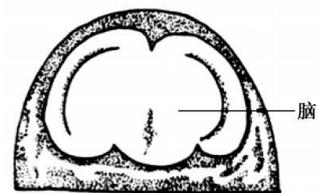


图 5 头部第④切面图示——脑室

表 3 致畸试验胎仔内脏检查项目

部位	检查项目	部位	检查项目	部位	检查项目
	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

头部 (脊髓)	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	气管食管瘘	卵巢异位
		内脏异位	子宫缺失
		右位心	子宫发育不全
		房中隔缺损	输卵管积水
		室间隔缺损	肝分叶异常
			肾上腺缺失

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。

11 统计处理和结果评价

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。胎仔的观察结果，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6 d 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6 d 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。

12 试验报告

试验报告中应包括以下具体信息：

- a) 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号；
- b) 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期；
- c) 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；
- d) 试验摘要；
- e) 受试物名称、剂型、生产日期(批号)、外观性状、配制所用溶媒和方法；
- f) 实验动物种属、品系、级别、数量、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，饲养环境(温度、相对湿度、实验动物设施使用许可证号),饲料来源(供应商名 称、实验动物饲料生产许可证号)；
- g) 剂量和组别，包括选择剂量的原则或依据、剂量和组别、动物分组方式和每组动物数；
- h) 试验条件和方法，包括受试物给予方式和期限、试验周期、观察指标等；
- i) 试验结果：以文字描述和表格逐项进行汇总，包括母体体重、妊娠情况、黄体数、着床数、吸收胎 数、活胎数、死胎数及百分率。胎仔的情况(体重、体长)、畸胎的类型(外观、骨骼和内脏)、数目及百分率，给出结果的统计处理方法；
- j) 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致畸性，及畸形的类型。给出致畸作用、其他发育毒性终点及母体毒性的LOAEL和未观察到有害作用剂量(NOAEL)。

13 试验的解释

致畸试验检验动物孕期经口重复暴露于受试物产生的子代致畸性和发育毒性。试验结果应该结合亚慢性、繁殖毒性、毒物动力学及其他试验结果综合解释。
