



中华人民共和国国家标准

GB/T 21752—2008

化学品 啮齿动物 28 天重复剂量经口 毒性试验方法

Chemicals—Test method of repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents

2008-05-12 发布

2008-09-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试指南 No. 407(2005 年)《啮齿动物 28 天重复剂量经口毒性试验》(英文版)。

本标准作了下列编辑性修改：

- 增加了范围部分；
- 计量单位改成我国法定计量单位；
- 删除 OECD 的参考文献部分。

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准负责起草单位：中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本标准参加起草单位：广东出入境检验检疫局、深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：许崇辉、侯粉霞、谢建军、刘丽。

OECD 引 言

1. 1998年,OECD启动了一项具有高度优先权的活动,即,修订现存指南、建立用于筛查和检测潜在内分泌干扰物的新指南。其中一项工作就是修订啮齿动物28天重复剂量经口毒性试验(OECD TG 407),在其中增添适用于检测受试物内分泌活性的评价指标。为了验证所增添的这些新指标与内分泌的相关性及其可操作性,在国际范围内开展了广泛的验证性研究。选用一些具有雌激素、抗雌激素、雄激素、抗雄激素、甲状腺素、抗甲状腺素活性的化学品进行试验,测定这些新指标,证明这些指标与内分泌功能的相关性,比较测定结果在实验室内和实验室间的可重复性,说明修订前的OECD407中要求测定的指标对新增添的指标的影响。在上述研究中使用的化学品包括炔雌醇(ethinylestradiol)、金雀异黄酮(genistein)、壬基苯酚(nonylphenol)、它莫西芬(tamoxifen)、CGS 18320 B、甲基睾酮(methyl testosterone)、氟他胺(flutamide)、二氯二苯二氯乙烯(p, p' -DDE)、丙硫氧嘧啶(propylthiouracil)和1-甲状腺素(1-thyroxine)。所获得的大量研究数据已经被汇总到一起,OECD的一份综合性报告对这些研究结果进行了详细的评价。该修订后的TG 407是上述国际范围内验证试验得出的经验和结果的结晶。新TG 407允许在评价其他毒理学效应时同时评价内分泌介导的毒性效应。

2. 在OECD TG 407中增添用于检测内分泌介导的毒性效应指标的合理性在OECD专论中进行了论述。该专论中列出了主要的修订内容,其中大部分修订内容的合理性在国际性验证研究的第一阶段使用氟他胺和丙硫氧嘧啶进行了验证。在第一阶段还使用了更多的化合物进行了验证,但是后来开展的这些研究没有对前版本TG 407要求的所有观察终点进行观察,比如FOB或运动功能评价,有些研究也没有很充分地报道,有些与前版本TG 407的要求相比使用剂量太低。根据第一阶段验证试验对新增添评价指标测定时所获得的有关其测定的可操作性、重复性和灵敏性等方面的资料,来决定应选择其中的哪些评价指标进行国际范围内的第二阶段验证试验。现行TG 407是在第二阶段验证试验结果的基础上形成的。

3. 本试验作为一种体内试验方法,可提供关于多种内分泌机制及其效应的数据,可在“OECD内分泌干扰物测定与评价的概念框架”(附录A)中看到。在该概念性框架中,TG 407被包含在第4级。该试验除了可获得原版本可能提供的信息外,还提供多种内分泌机制及其效应的相关数据、并说明这种多种内分泌机制效应是否存在剂量-反应关系。

4. 国际范围内对TG 407的验证研究表明,该TG 407在要求的灵敏度范围内,检测出了已知的具有强内分泌活性作用的化学品,包括(抗)雌激素类化学品、(抗)雄激素类化学品或(抗)甲状腺素类化学品。用甲基睾酮和二氯二苯二氯乙烯(p, p' -DDE)进行的试验表明,该试验程序也可用于检测对甲状腺产生微弱作用的化学品。关于金雀异黄酮(植物雌激素)、壬基苯酚(弱雌激素作用)、 p, p' -DDE(弱的抗雄性激素作用)等测试物,其产生的内分泌活性作用与其产生的其他毒性效应相比太弱了,即使在高剂量组也检测不到内分泌相关指标的明显改变,另一种情况是,各实验室得出的试验结果都具有不确定性(指异黄酮的试验结果)。

5. 通过对国际范围内验证试验结果的详尽分析,认为需要对TG 407进行进一步修订以提高试验的灵敏度,特别是检测弱雌激素类物质和(抗)雄性激素类物质的灵敏度。推荐在试验中进行雌性和雄性动物乳腺的组织病理学检查、评价雌性生殖器官的组织病理学改变(应特别注意雌性生殖器官组织结构与发情周期(阴道涂片检查)同步性的改变)。这些方面的测定内容未包含在提供给参与验证实验室的研究程序中。

6. 国际范围内验证研究的结果不能明确说明是否需要在TG 407中加入甲状腺激素的测定,但是明确提示甲状腺激素(T4、T3)和促甲状腺素(TSH)应作为更新指标加入到TG 407的试验程序中。

7. 国际范围内的验证研究的结果表明, TG 407 验证试验中数据的质量主要依赖于实验室的经验, 特别是实验室在检查雌性生殖器官组织结构周期性改变方面的经验以及在分离和称量激素依赖性小器官的重量时所具有的经验。因此, 建议各实验室在按照 TG 407 进行试验时应进行适当的质量控制。

8. 该 TG 407 是经过两次会议讨论后的产物, 一次是哺乳动物试验方法确认管理小组/内分泌干扰物测试与评估任务组于 2006 年 4 月在华盛顿召开的, 另一次是 OECD 于 2006 年 4 月在斯德哥尔摩召开的。新版 TG 407 是在国际范围内对其进行方法验证的基础上产生的。

9. 由于按照 TG 407 进行试验需要花费大量动物、很多费用、很长时间, 因此, 如果对 TG 407 进行像体外试验方法验证要求的那样进行全面的方法验证, 则无论是过去还是现在看来都不太合适。无论从动物福利还是从经济方面考虑都不应开展这种全面的验证试验。根据对 TG 407 中某些评价指标的验证结果, 认识到需要对某些评价指标进行进一步的验证和优化。在新版 TG 407 的应用过程中, 将会获得更多的有关这些评价指标的经验。

10. 该 TG 407 在今后的几年里可用于测定受试物重复经口染毒所引起的毒性作用, 包括对内分泌系统的作用。在该试验程序经世界范围内的应用而进一步取得经验后, 应召集专家对 TG 407 进行进一步的修改、提炼和认可。今后在对 TG 407 进行修改时, 必要时应重点对那些目前尚不能明确其价值的一些观察终点进行评价, 如, 乳腺的组织病理学检查、雌性生殖器官组织结构周期性变化与动情周期的一致性测定、甲状腺相关激素的测定等。

11. 对化学品进行毒性特征评价时, 可在获得最初的急性毒性资料后进行重复剂量经口毒性试验。该试验可提供在一个相对有限的时间内重复染毒受试物可能产生的健康危害效应资料, 包括对内分泌系统的毒性作用。该试验作为一种重复剂量毒性试验, 可在未要求进行 90 天重复染毒试验时(如, 受试物的产量未超过规定的限值)进行或作为长期毒性试验的预试验来开展。染毒期限应为 28 天。

12. 该修改后的 TG 407 增加了用于检测化学品对甲状腺生理功能影响和对雄性和(或)雌性生殖器官影响的评价指标, 同时仍然保留修改前的 TG 407 中的所有毒理学评价指标。根据验证试验的数据资料, 必须强调的是该试验程序的敏感性尚不足以检测出所有的(抗)雄激素类物质或(抗)雌激素类物质。用于 TG 407 试验的动物未处于对内分泌干扰物最敏感的年龄。该 TG 407 可检测出强的或中等程度的内分泌活性物质, 但是, 在多数情况下, 检测不出弱的内分泌活性物质。因此, 不能把该试验当作内分泌干扰作用的筛选试验。

13. 因此, 未检测出内分泌效应时并不能据此认为化学品对内分泌系统无影响。按照内分泌介导的效应对受试物进行分类时, 不能仅依赖该 TG 407 的结果, 而是应该对现有的可反映受试物潜在内分泌活性的所有资料进行证据权重分析后再进行分类。当要制定化学品内分泌活性(化学品分类)相关的管理决策时, 应依据上述经证据权重分析后的结果, 而不是仅仅依赖于该 TG 所获得的结果。

14. 该 TG 407 是为了根据试验所观察到的毒性效应, 包括内分泌影响效应, 来检测受试物可能的危害作用。也就是说, 根据该 TG 407 的结果可对受试物进行危害识别和危险度评价。有关内分泌评价指标的测定结果可参见“OECD 内分泌干扰化学品测定与评价的概念框架”(附录 A)。

15. 众所周知, 所有涉及到动物的操作都应当符合当地的动物保护标准; 下面所述的动物保护和处理要求是最低要求, 当地的动物保护标准应高于此要求。OECD 另外还有一项关于“人道对待动物”的规范。

化学品 啮齿动物 28 天重复剂量经口 毒性试验方法

1 范围

本标准规定了啮齿动物 28 d 重复剂量经口毒性试验的范围、术语和定义、试验基本原则、试验方法、试验数据和报告。

本标准适用于检测化学品的 28 d 重复剂量经口毒性试验。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

剂量 dose

所受受试物的量,常以质量(g、mg)或动物单位体重所给予的受试物的量(mg/kg)来表示;如将受试物掺入饲料进行喂养染毒时,也可以用受试物在饲料中的恒定浓度(mg/kg)来表示。

2.2

用量 dosage

包括染毒剂量、染毒次数及染毒期限在内的一般性术语。

2.3

明显毒性 evident toxicity

受试物染毒后出现了明显的毒性表现,根据这些毒性表现完全可以对受试物进行危害评价,而且在增加染毒剂量时,预期可产生严重的毒性表现、甚至引起动物死亡。

2.4

未观察到可见作用剂量 no-observed-effect level(NOEL)

未发现可引起任何观察指标发生改变的最高剂量。

2.5

未观察到有害作用的剂量 no-observed-adverse-effect level(NOAEL)

未发现与染毒有关的有害作用的最高剂量。

2.6

雌激素作用 oestrogenicity

一种化学品可发挥与哺乳动物体内雌激素(如:雌二醇 β 17)相同作用的能力。

2.7

雄激素作用 androgenicity

一种化学品可发挥与哺乳动物体内雄激素(如:睾酮)相同作用的能力。

2.8

甲状腺素活性 thyroid activity

一种化学品可发挥与哺乳动物体内甲状腺激素(如:T3)相同作用的能力。

2.9

抗雌激素作用 antioestrogenicity

一种化学品可抑制哺乳动物体内雌激素(如:雌二醇 β 17)作用的能力。

2.10

抗雄激素作用 antiandrogenicity

一种化学品可抑制哺乳动物体内雄激素(如:睾酮)作用的能力。

2.11

抗甲状腺活性 antithyroid activity

一种化学品可抑制哺乳动物体内甲状腺激素(如:T3)作用的能力。

2.12

确认 validation

是一个科学过程,用于对一种试验方法的操作要求及其检测的局限性进行具体规定,并证明该试验方法用于某种特定检测目的具有可靠性和相关性。

3 试验基本原则

动物分为几个剂量组,每组1个染毒剂量,各染毒剂量之间具有一定的间距,各组动物每天经口染毒一次受试物,连续28 d。在染毒期间每天仔细地观察动物的毒性表现,对死亡或处死的动物进行大体解剖。试验结束时处死全部存活动物并进行大体解剖。

4 试验方法

4.1 动物品系选择

特选大鼠,因为在本标准前期的验证试验中仅选用了大鼠进行试验。如果选用其他种类的啮齿动物进行某些指标的测定时,应详细说明理由,并提供证据证明所选用的动物品系对所测指标反应的敏感性与大鼠是可比的。应使用实验室常用品种的大鼠,使用健康、初成年大鼠。雌性大鼠应未生育过和未孕。动物在7周断乳后应尽快开始染毒,开始染毒时动物一定不要超过9周。试验开始时,应尽量减少动物的体重差别,每种性别动物的体重差别不应超过平均体重的20%。当该重复剂量毒性试验作为更长期试验的预试验时,则预试验和随后的更长期试验最好选用相同品系、相同来源的动物。

4.2 饲养条件

动物房的温度应为 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$,相对湿度应大于30%,除非在清洗动物房时相对湿度最好不超过70%,50%~60%最合适。应采用人工照明,12 h明暗交替。实验室常规饲料喂养,饮水不限。采用喂饲方式染毒时,由于需要将受试物混和在饲料中,这对饲料选择可能会有一定影响。动物可单笼饲养,也可按性别分笼饲养。一般每笼不超过5只。

应定期对饲料进行分析以检查其是否被污染。在发出试验报告之前应保留一份饲料样本。当试验出现了预想不到的结果时,应考虑进行饲料中雌激素类化合物的测定。

4.3 动物准备

将健康、初成年动物随机分成对照组和染毒组。应尽量减少动物笼摆放位置对动物可能产生的不良作用。动物于试验前在动物笼中饲养观察至少5 d,以使动物适应试验条件。

4.4 受试物的处理

可采用灌胃、加入饲料中、加入饮水中等方式给予受试物,具体采用其中哪一种方式进行经口染毒取决于试验目的以及受试物的理化性质。

有时需要将受试物溶解或悬浮在合适的溶剂中。应尽可能地选用水做溶剂,其次再考虑选用油(如:玉米油),最后才考虑选用其他溶剂。当使用的溶剂不是水时,应了解所使用溶剂的毒性作用特征。应测定受试物在溶剂中的稳定性。

4.5 试验规程

4.5.1 动物数量与性别

每组至少要有10只动物(5只雌性和5只雄性)。如计划在试验过程中处死部分动物,则应依据试

验结束前计划要处死的动物的个数来相应增加剂量组内的动物数。另外,对照组和高剂量组应考虑设立附加组(雌、雄动物各5只),在染毒结束后14 d期间内,观察毒性反应的可恢复性、持续性以及迟发性。

4.5.2 染毒剂量

一般至少应设3个染毒组和1个对照组。如果有资料证明剂量为1 000 mg/(kg·d)时,预期不会产生毒性作用,则可进行限量试验。在选择染毒剂量时,如果没有合适的资料可参考,应开展预试验来寻找剂量范围。对照组动物除不染毒受试物外,其他处理应与染毒组动物相同。给予受试物时如果使用了溶剂,对照组给予溶剂的量应不低于染毒组的溶剂用量。

选择染毒剂量时,应考虑受试物及其结构类似物质的现有毒性资料及毒物动力学资料。最高剂量应可引起毒性效应,但不引起动物死亡或严重痛苦。最低剂量应不引起任何可观察到的有害效应(NOAE)。剂量间距最好为2~4倍。若要设置第4个染毒组(试验组),则最好使用大的剂量间距(例如,大于10倍)。

内分泌介导的毒性效应可能是一种继发于其他毒性的效应。为了准确地检测这种效应,应在可产生明显毒性的剂量下至少再设2个更低的剂量。

4.5.3 限量试验

如果选用至少1 000 mg/(kg·d)的染毒剂量,按照本试验的方法进行试验,未出现可观察到的毒性效应时,或者,如果根据与受试物结构类似的物质的毒性资料认为1 000 mg/(kg·d)的受试物预期不会产生毒性作用时,则没有必要设三个剂量组进行试验。当人类接触受试物的资料表明应选择更高剂量进行动物试验时,应进行限量试验。

4.5.4 受试物的给予

4.5.4.1 动物每天染毒一次受试物,每周7 d,雄性动物连续染毒28 d,雌性动物依据其发情间期所在的日期连续染毒28 d至32 d。采用灌胃方式染毒时,使用灌胃针灌胃、一次性完成单次受试物的给予。最大灌胃量取决于动物的大小。灌胃量不应超过1 mL/100 g,但水溶液/悬浮液的灌胃量可以为2 mL/100 g。对于刺激性和腐蚀性受试物,由于在较高浓度时可表现出更严重的刺激性和腐蚀性作用,这时可降低受试物的浓度、相应增加灌胃量;但是,除上述情况外,一般应尽量减少各剂量组灌胃量的差异,各剂量组给予的受试物溶液/悬浮液的浓度可以不同,但应保证单位体重的灌胃量不变。

4.5.4.2 如果受试物采用加入饲料或加入饮水方式染毒时,必须保证加入的受试物的量不影响饲料的正常营养或水的平衡。当以受试物加入饲料方式染毒时,受试物的剂量可用饲料中受试物的恒定浓度(mg/kg)表示,也可用按体重计算的剂量(mg/kg)表示,但应说明具体采用的是两者中的哪一种。采用灌胃方式染毒时,应在每天基本相同的时间点进行灌胃染毒,并应根据动物体重变化调整灌胃量以使染毒剂量保持不变。如果该重复剂量染毒试验是作为长期试验的预试验时,则这两项试验所用的饲料应相似。

4.5.5 观察

4.5.5.1 雄性动物的观察期限为28 d,雌性动物观察到发情期结束、最多不超过32 d(见4.5.4)。为了追踪观察而设的附加组动物,染毒28 d后不再染毒,继续观察14 d,以便检查毒性效应的迟发性、持续性或可恢复性。

4.5.5.2 每天至少进行一次临床观察,最好在每天的相同时间观察,并考虑在染毒后预期产生毒效应的高峰期进行观察。应记录动物的健康状况。每天应至少观察2次以检查动物的中毒状态和死亡情况。

4.5.5.3 在首次染毒前对全部动物进行一次详细的临床观察(以便今后对动物进行自身对照比较)、以后每周至少观察一次。这些观察应在动物笼外的一个标准观察台上进行,最好在同一时间观察。应详细记录所观察到的改变,最好按照实验室制定的打分标准对观察到的症状进行打分。应尽量避免试验条件的改变。观察者最好不了解动物的染毒情况。观察的症状应包括但不限于如下方面的改变:皮肤、

被毛、眼、黏膜、口鼻分泌物增多、尿粪排泄异常、自主神经活动(如:流泪、被毛竖起、瞳孔大小、呼吸类型异常等)。也应记录步态、体态、抓取动物时动物的反应、肌肉阵挛性或强直性运动、固定保持一种动作(如:前爪反复做洗脸样动作、反复做转圈运动)、行为异常(如:动物自残、后退行走)等改变。

4.5.5.4 在染毒的第4周,应对感觉器官对不同刺激(如:听觉刺激、视觉刺激以及本体感觉刺激)的反应能力、握力(抓力)以及运动功能进行评价。测定上述功能所用方法的详细步骤见各自的参考文献,但是也可使用与参考文献中方法不同的方法。

4.5.5.5 如果该28 d重复剂量毒性试验是作为要开展的亚慢性(90 d)毒性试验的预试验时,则不需要对上述功能进行测定,而是需要在亚慢性试验中进行测定。另外,如果可获得28 d重复剂量经口染毒对感觉器官功能影响的相关资料,则可有用于亚慢性经口毒性试验中染毒剂量的设计。

4.5.5.6 如果某一剂量组动物所出现的中毒表现可能会对上述功能的测定产生影响时,也不需要进行上述功能测定。

4.5.5.7 在染毒结束前至少5 d内(最晚从染毒的第24 d开始),雌性动物每天进行阴道涂片来检查其发情周期。进行阴道涂片时,尽管操作者可能对前几天阴道涂片的结果已有所了解,但应使操作者不了解动物所在的染毒组。

4.5.5.8 由于可用于进行发情周期测定的天数有限,在可测定发情周期的有限日期内难以对发情周期的不规律性进行可靠的测定,但可保证使雌性动物在处于发情周期基本相同的阶段时被处死。如果化学品染毒天数是28 d~32 d,则动物处死时应处于发情间期,此时未处于发情间期的动物应在染毒的第32 d处死。

4.5.6 动物体重和饲料/水消耗量

全部动物每周至少称体重一次,每周至少测量一次饲料消耗量。受试物加入饮水中进行染毒时,应每周至少测量一次饮水消耗量。

4.5.7 血液学检查

试验结束时应进行下列血液学检查:红细胞比积、血红蛋白浓度、红细胞数、白细胞总数及其分类、血小板数及凝血功能测定。

动物采血可在处死动物前进行,也可在处死动物时进行。从动物的指定部位采血、血样用合适的条件保存。动物在处死前不需要禁食。

4.5.8 临床生化检查

4.5.8.1 试验结束时,应对所有动物进行血液临床生化检查。临床生化检查项目应能反映受试物对组织产生的主要毒性效应,特别是对肾脏和肝脏的毒性效应。动物采血可在处死动物前进行,也可在处死动物时进行。雌性动物应在发情周期的相同阶段采血。血浆或血清临床生化检查项目应包括:钠、钾、葡萄糖、总胆固醇、尿素、肌酐、总蛋白量及白蛋白量、至少两种可反映肝细胞功能的酶(例如:丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶、 γ -谷氨酰转氨酶和山梨醇脱氢酶)。在某种情况下,测定反映肝细胞功能的其他酶类或来源于其他脏器的酶类和胆酸也许可提供有用的信息。

4.5.8.2 一般情况下不要求进行尿分析,但是仅在受试物的预期毒性或已观察到的毒性提示需要时才进行尿液分析。进行尿液分析时,在试验的最后一周收集固定时间段内的尿液,进行如下分析:外观、尿量、密度、pH值、尿蛋白、尿糖、尿潜血和血细胞。

另外,应考虑对可反映受试物主要损伤效应的血清标志物进行测定。如果根据受试物的已有信息认为它可能或怀疑它可以影响钙、磷、甘油三酯、某种激素、高铁血红蛋白、胆碱脂酶等的代谢时,应测定血液中的这些成分。对于某些种类的化学品或在某些情况下,应说明是否需要进行上述成分的测定。

4.5.8.3 尽管本方法中内分泌相关的观察终点在方法验证阶段的研究结果未能证明进行甲状腺激素(T_3 、 T_4)和促甲状腺素(TSH)检测的必要性,但当受试物可能损伤脑垂体-甲状腺轴时,保留血样进行 T_3 、 T_4 和TSH检测是有帮助的。下列因素可能影响激素的测定结果:

- a) 由于在白天动物体内的激素水平可发生波动,因此处死动物的时间可影响激素的测定结果。

b) 处死动物时,为了避免对动物产生不适当的应激而选择的某种处死方法(如:麻醉)可能会影响动物体内的激素浓度。

c) 由于激素检测试剂盒的标准曲线可能不同,因而可能影响激素的测定结果。

随着该试验的应用,在获得更多的经验后,应对测定 T_3 、 T_4 和 TSH 的必要性进行重新评估。然而,为了鉴定甲状腺活性化学品而对甲状腺进行全面的和常规的组织病理学检查是多余的。

4.5.8.4 用于检测激素水平的血浆样本应在一天中具有可比性的时间段内采集,最好是在靠近中午时段内采集,此时 TSH 水平最高。建议在甲状腺出现组织病理学改变时考虑进行 T_3 、 T_4 和 TSH 的测定。如果测定时使用的试剂盒不同,所测出的数值也不同。因此,不太可能依据既往的测定资料得出一个激素水平的标准值。但是,实验室应尽量控制测定值的变动范围, T_3 和 T_4 测定值的变动范围应控制在 25 以内、促甲状腺素(TSH)在 35 以内。 T_3 、 T_4 和 TSH 的浓度单位均用 ng/mL 表示。

总的来说,应依据所使用的动物的品系、已观察到的受试物的毒性效应或受试物预期的毒性效应等情况,灵活选择临床生化指标进行测定。

如果实验室已有的血液学和临床生化的正常值资料不够充分时,应考虑在染毒开始前进行血液学和临床生化测定。

4.5.9 病理学

4.5.9.1 大体解剖

应对全部动物进行全面的大体解剖,包括体表、体腔的各开口处,颅腔、胸腔和腹腔及其内部的器官和组织。肝、肾、肾上腺、睾丸、副睾、胸腺、脾脏、脑和心脏在分离后应尽快称重以免失水干燥。

另外,下列器官分离后也应及时称重以免干燥:双侧卵巢、子宫、精囊(包括其中凝结的分泌液)、前列腺(包括背外侧叶和腹侧叶)。精囊和前列腺也可先经固定、然后再剔除周围组织、称重。在固定时,可用夹子和绷带来防止精囊内液体的外漏以免影响精囊的结构。

- a) 下列器官应在固定后称重:甲状腺(为了避免造成组织损伤,组织修整也应在固定后进行)、前列腺的背外侧叶和腹侧叶。
- b) 将下述器官组织保存于最适当的固定液中以便保存其组织形态以及用于组织病理学检查:大体解剖发现的病变组织、脑(有代表性的脑区域,包括大脑、小脑和桥脑)、脊髓、胃、小肠和大肠(包括 Peyer 氏集合淋巴结)、肝、肾、肾上腺、脾、心、胸腺、甲状腺、气管和肺(先用固定液灌流固定,然后再浸泡固定)、性腺器官、副性腺器官(如子宫、前列腺)、膀胱、淋巴结(最好选择一个引流染毒部位的淋巴结和一个远离染毒部位进行全身引流的淋巴结)、周围神经(坐骨神经或胫神经,最好在靠近肌肉的部分取材)、剪取一段骨髓组织(或者制备新鲜的骨髓涂片);根据临床观察和检查结果以及其他结果,也可能需要对其他组织进行组织病理学检查。如果受试物的已有资料提示某些器官可能是靶器官时,则这些器官也应进行固定保存。
- c) 下列组织或许能对内分泌相关作用提供有价值的提示:性腺(卵巢和睾丸)、副性腺器官(子宫颈、阴道、附睾、精囊腺及其分泌液、前列腺的背侧叶、前列腺的腹侧叶)、垂体和雄性和雌性动物的乳腺和甲状腺。
- d) 该试验方法在前期方法验证时的有关结果表明,在受试物仅产生很微弱的内分泌干扰效应、而不太可能影响性激素的产生时,不同组织的组织结构与发情周期的不同步性(同步性发生了改变)可能说明这种微弱的效应,而仅通过分析雌性性器官的组织病理学改变则不太能鉴别出这种微弱的效应。虽然目前还没有明确的证据来证明上述同步性的改变与微弱的内分泌干扰效应之间的联系,但是,仍然建议这时应重点检查卵巢(卵泡细胞、膜细胞和颗粒细胞)、子宫、子宫颈、阴道、脑垂体和乳腺等器官组织的组织结构与经阴道涂片方法所测定的大鼠所处的动情周期阶段之间的一致性。随着本标准的应用,在获得了更多的经验后,可考虑对检查雌性生殖器官组织结构与动物动情周期同步性时所采用的详细方法进行验证。

4.5.9.2 组织病理学检查

高剂量组和对照组全部固定保存的器官和组织都应进行全面的病理组织学检查。如果在高剂量组已观察到与染毒相关的病理变化时,应进一步对其他剂量组动物的所有器官和组织进行检查。

大体解剖发现病变的所有组织都应做组织病理学检查。

如果某个组设置了附加组,则附加组需要进行组织病理学检查的器官和组织应是在所对应的剂量组中已观察到病变的器官和组织。

5 试验数据和报告

5.1 数据

应提供每只动物的数据。此外,以表格形式报告各组动物的下列数据:试验开始时的动物数、试验期间死亡的动物数以及发现动物死亡的时间、试验期间安乐处死的动物数及处死时间、出现中毒症状的动物数、描述观察到的中毒症状(包括各种毒性效应的出现时间、持续时间及其严重程度)、出现病理损伤的动物数、病理损伤的类型、发生各种类型病理损伤动物的百分数。

可能的情况下,应采用合适的及常用的统计学方法对试验数据进行分析。统计学方法的选择应在试验设计时完成。

为了进行质量控制,建议收集对照组的历史资料,计算某种指标既往测定值的变动范围,尤其是新增加的评价指标测定值的变动范围。根据历史资料所获得的某指标测定值的变动范围可用于与试验中所测数据进行比较,评价后者是否在该指标许可的范围内。

5.2 试验报告

试验报告必需包括下述内容:

5.2.1 受试物

- a) 物理性状、纯度、理化特性;
- b) 名称和识别码。

5.2.2 赋形剂

如果使用的赋形剂不是水,则应说明理由。

5.2.3 试验动物

- a) 所用动物的品系;
- b) 动物的数量、周龄和性别;
- c) 动物来源、饲养条件及饲料等;
- d) 试验开始时每只动物的体重。

5.2.4 试验条件

- a) 剂量选择的依据;
- b) 详细描述下列信息:灌胃所用的受试物溶液/悬浮液的配制或喂饲染毒时所用的含受试物饲料的制备、受试物在灌胃液或饲料中的浓度、在其中的稳定性以及在其中是否均匀分布等;
- c) 详细描述给予受试物的方式;
- d) 将饲料和饮水中受试物浓度换算成实际剂量(mg/kg·d)(可以时);
- e) 饲料质量和饮水质量的详细信息。

5.2.5 结果

- a) 体重/体重变化;
- b) 食物消耗量,饮水消耗量(可以时);
- c) 不同性别、不同剂量组动物的毒性反应资料,包括中毒症状;
- d) 临床观察所发现的中毒症状的性质、程度及其持续时间(是否可恢复);
- e) 对感觉器官功能、抓力和运动功能的评价;

- f) 血液学测定结果以及各测定指标的正常界限值；
- g) 临床生化测定结果以及各测定指标的正常界限值；
- h) 动物处死时的体重及器官重量；
- i) 大体解剖结果；
- j) 详细描述组织病理学检查发现的各种病变；
- k) 反映受试物吸收情况的资料(有资料时)；
- l) 对结果进行统计学处理的有关资料(合适时)。

5.2.6 讨论

5.2.7 结论

附录 A
(资料性附录)

OECD 内分泌干扰物测定与评价的概念框架

A.1 OECD 内分泌干扰物测定与评价的概念框架,见表 A.1。

表 A.1 OECD 内分泌干扰物测定与评价的概念框架

| | | |
|---|---|--|
| 1 级 根据现有信息对受试物进行分类并根据分类对某些物质特别关注 | <ul style="list-style-type: none"> — 理化特性,如:分子量、反应性、挥发性、生物降解度; — 人类和环境暴露受试物的情况,如:受试物的产量、释放情况、使用方式; — 危害,如:相关的毒理学资料 | |
| 2 级 体外试验,提供机制方面的资料 | <ul style="list-style-type: none"> — 与雌激素、雄激素和甲状腺素受体的结合亲和力; — 转录活化; — 体外芳香酶和类固醇合成; — 芳香烃受体识别/结合: <ul style="list-style-type: none"> — QSARs; — 高通量预筛选; — 甲状腺功能; — 鱼类肝细胞卵黄蛋白(VTG)试验; — 其他(适合的) | |
| 3 级 体外试验,提供单一的内分泌机制和效应资料 | <ul style="list-style-type: none"> — 子宫增重试验(检测雌激素活性物质); — Hershberger 试验(检测雄激素活性物质): <ul style="list-style-type: none"> — 非受体介导的激素功能; — 其他(如:甲状腺) | 鱼类卵黄蛋白(VTG)试验(检测雌激素活性物质) |
| 4 级 体外试验,提供多种内分泌机制和效应资料 | <ul style="list-style-type: none"> — 新版 OECD407(内分泌相关的评价指标); — 雄性和雌性的青春期测定; — 对成年雄性的动物的生殖系统的全面检测 | <ul style="list-style-type: none"> — 鱼类性腺组织病理学检测; — 蛙类变态发育试验 |
| 5 级 体内试验,提供内分泌以及其他机制方面的效应资料 | <ul style="list-style-type: none"> — 一代繁殖试验(新版 TG 415)^a; — 二代繁殖试验(新版 TG 416)^a; — 生殖筛选试验(新版 TG 421)^a; — 28 d 合并生殖毒性筛选试验(新版 TG 422)^a | 对鱼类、鸟类、两栖类和无脊椎动物的部分和全部生命时间进行的试验(发育和生殖) |
| <p>注 1: 根据受试物现有的用于危害和危险度评价的资料的性质,可选择不同级别进行试验。</p> <p>注 2: 在第 5 级试验中,生态毒理学试验应包括可反应有害作用机制和对人潜在损伤的评价指标。</p> <p>注 3: 当多种内分泌效应机制试验包括了若干个单一检测终点时,应进行多种内分泌效应机制试验来代替这些单一终点试验。</p> <p>注 4: 对每一种化学品进行评价时应根据化学品的具体情况进行分析,要考虑所有可能利用的信息,要记住框架中各级别的分类。</p> <p>注 5: 就目前来说,并不能认为这一框架是全面的,第 3、4、5 级中所包含的试验有的通过了方法确认,有的却正在被确认。这些正在被确认的方法只是暂时被包括进来,一旦被正式确认后这些试验将被正式纳入本框架中。</p> <p>注 6: 不能认为只有第 5 级中的试验才能用于最后的危害和危险评估,各个级别中所包含的试验对于受试物的危害和危险评估都是有帮助的。</p> | | |
| <p>^a 哺乳动物试验和评估方法确认管理小组(VMG mamm)可能考虑对这些 TG 进行修订。</p> | | |