



中华人民共和国国家标准

GB/T 15670.24—2017
部分代替 GB/T 15670—1995

农药登记毒理学试验方法 第 24 部分：两代繁殖毒性试验

Toxicological test methods for pesticides registration—
Part 24: Two-generation reproduction toxicity study

2017-07-12 发布

2018-02-01 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

GB/T 15670《农药登记毒理学试验方法》分为以下部分：

- 第1部分：总则；
- 第2部分：急性经口毒性试验 霍恩氏法；
- 第3部分：急性经口毒性试验 序贯法；
- 第4部分：急性经口毒性试验 概率单位法；
- 第5部分：急性经皮毒性试验；
- 第6部分：急性吸入毒性试验；
- 第7部分：皮肤刺激性/腐蚀性试验；
- 第8部分：急性眼刺激性/腐蚀性试验；
- 第9部分：皮肤变态反应(致敏)试验；
- 第10部分：短期重复经口染毒(28天)毒性试验；
- 第11部分：短期重复经皮染毒(28天)毒性试验；
- 第12部分：短期重复吸入染毒(28天)毒性试验；
- 第13部分：亚慢性毒性试验；
- 第14部分：细菌回复突变试验；
- 第15部分：体内哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验；
- 第16部分：体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验；
- 第17部分：哺乳动物精原细胞/精母细胞染色体畸变试验；
- 第18部分：啮齿类动物显性致死试验；
- 第19部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验；
- 第20部分：体外哺乳动物细胞基因突变试验；
- 第21部分：体内哺乳动物肝细胞程序外DNA合成(UDS)试验；
- 第22部分：体外哺乳动物细胞DNA损害与修复/程序外DNA合成试验；
- 第23部分：致畸试验；
- 第24部分：两代繁殖毒性试验；
- 第25部分：急性迟发性神经毒性试验；
- 第26部分：慢性毒性试验；
- 第27部分：致癌试验；
- 第28部分：慢性毒性与致癌合并试验；
- 第29部分：代谢和毒物动力学试验。

本部分为GB/T 15670的第24部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本部分部分代替GB/T 15670—1995《农药登记毒理学试验方法》。

本部分与GB/T 15670—1995的两代繁殖试验部分相比主要变化如下：

- 修改和调整了标准的总体结构和编排格式；
- 增加了部分章节内容(见第1章、第2章、第3章、第5章、6.1、6.2.3和第8章)；
- 修改了对实验动物的要求(见6.2,1995年版的16.4)；
- 修改了剂量和分组的内容(见6.3,1995年版的16.5)；

——修改了观察指标的内容(见 6.4.4,1995 年版的 16.11)。

本部分由中华人民共和国农业部提出并归口。

本部分起草单位:中华人民共和国农业部农药检定所。

本部分主要起草人:李宁、张丽英、陶传江。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB/T 15670—1995。

农药登记毒理学试验方法

第 24 部分：两代繁殖毒性试验

1 范围

GB/T 15670 的本部分规定了两代繁殖毒性试验的基本原则、方法和要求。
本部分适用于为农药登记而进行的两代繁殖毒性试验。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 14925 实验动物 环境及设施

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

繁殖毒性 reproductive toxicity

受试物引起的亲代雌性或雄性繁殖功能损伤或生殖能力下降。

3.2

发育毒性 developmental toxicity

接触受试物的妊娠动物的子代在出生前、围产期和出生后所表现出的机体缺陷或功能障碍。

4 试验目的

用于检测受试物对雌性和雄性动物繁殖功能的影响,如性腺功能、发情周期、交配行为、妊娠、分娩、哺乳和断乳以及子代的生长发育等。并可提供有关受试物发育毒性的信息,如出生缺陷、死亡和畸形等。

5 试验概述

将雌雄动物各分成几个剂量组,为评价受试物对精子生成的影响,染毒期限为亲代雄性动物(P)至少覆盖一个完整的精子形成周期(小鼠约 56 d,大鼠约 70 d)。亲代雌性(P)动物至少为两个完整的发情周期。此后,交配动物(P)均给予受试物,雌性亲代妊娠期持续给予受试物直至 F1 代断奶。F1 代断奶后持续给予受试物,从子代 F1 的青春期、成熟期、交配,子代 F2 的出生直至 F2 代断奶,以评价受试物的两代繁殖毒性效应。

6 试验方法

6.1 受试物配制

灌胃给予时,根据不同受试物的特性选择合适的溶剂或介质,通常首选溶剂为水。不溶于水的受试物可使用食用油(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钠、淀粉等配成混悬液。掺入饲料给予时,要将受试物与饲料或水混匀并保证受试物配制的稳定性,应进行稳定性、含量和均一性的测定。受试物掺入饲料或水时,应不影响饲料营养质量和水的平衡,一般在饲料中的掺入量不超过饲料浓度的5%。

6.2 实验动物

6.2.1 种属和周龄

首选大鼠和小鼠。不可使用繁殖率低和/或发育缺陷发生率高的品系。常用雌雄动物为初断乳4周~5周,试验开始时动物体重差异不应超过同性别平均体重的±20%。所用动物应注明种类、品系、性别、体重和周龄。

6.2.2 动物性别和数量

雌性和雄性动物通常按1:1或2:1比例合笼交配,每个剂量组和对照组至少能获得20只孕鼠,以评价受试物对两代动物繁殖过程的影响,包括对亲代动物繁殖能力、怀孕、妊娠行为和哺育过程的影响,对子代F1从出生到成熟期以及对子代F2从出生到断乳期生长发育的影响。

6.2.3 饲养条件

实验动物饲养条件应符合GB 14925的有关规定。实验期间自由饮水和摄食,妊娠动物应单笼饲养。

6.3 剂量及分组

试验至少设三个剂量组和一个对照组。高剂量组应使亲代动物出现明显的毒性反应,但不引起动物的死亡。如果发生不期望的死亡,亲代动物(P)死亡率应小于10%。中间剂量可引起轻微的毒性反应,低剂量不引起亲代和子代任何毒性反应。当掺入饲料染毒时,如果食物摄入量和利用率降低,则需考虑设配对饲养对照组。

如果受试物毒性较低,预期在1 000 mg/kg体重剂量不可能对繁殖产生任何毒性影响或在高剂量的预试验中有母体毒性但未观察到发育毒性时,则可不设定三个剂量。对照组为溶剂对照组或介质对照组,除不给予受试物外,其余处理均与剂量组相同。

6.4 操作步骤

6.4.1 染毒途径和时间

根据受试物的特性或试验目的,可将受试物混入饲料、灌胃或饮水给予。首选掺入饲料给予,如果灌胃染毒,每日灌胃一次,时间地点应相同,并定期按体重调整灌胃量,以维持染毒剂量不变。灌胃量一般不超过10 mL/kg体重,各组灌胃体积一致。

动物染毒时间,以大鼠为例,初断乳4周~5周的雌雄大鼠染毒8周后进行交配,交配期最长持续2周,雌性动物妊娠、哺乳期继续染毒至仔鼠断乳为止,雄性动物染毒至交配结束为止。染毒时间见表1。

表 1 大鼠两代繁殖毒性试验程序表

| 试验周期 | 亲代(P) | 子一代(F1) | 子二代(F2) |
|-----------|--------|------------------|------------------|
| 3 周末 | 出生 | | |
| 4 周~6 周 | 母乳喂养 | | |
| 7 周 | 基础饲料喂养 | | |
| 8 周~15 周 | 染毒 | | |
| 16 周~17 周 | 交配(染毒) | | |
| 17 周末 | 处死雄鼠 | | |
| 18 周~20 周 | 妊娠(染毒) | | |
| 20 周末 | | 出生 | |
| 21 周~23 周 | 哺乳(染毒) | 母乳喂养(每窝留雌雄各 4 只) | |
| 24 周 | 处死 | 基础饲料喂养 | |
| 25 周~32 周 | | 染毒 | |
| 33 周~34 周 | | 交配(染毒) | |
| 34 周末 | | 交配结束,处死雄鼠 | |
| 35 周~37 周 | | 妊娠(染毒) | |
| 37 周末 | | | 出生 |
| 38 周~40 周 | | | 母乳喂养(每窝留雌雄各 4 只) |
| 40 周末 | | | 断乳后全处死 |

6.4.2 交配程序

6.4.2.1 亲代交配

雌鼠应与同一剂量组的雄鼠按 1:1 或 2:1 的比例进行同笼交配,直至怀孕或 2 周交配期结束。每天查看雌鼠阴道有无精子或阴栓。将查到阴栓或精子的当天计为雌鼠妊娠的第 0 天。如交配失败,可以将不孕的雌鼠与同组中已证明有生育能力的雄鼠重新交配。预计已怀孕的雌鼠应分开放入繁殖笼中,孕鼠临产时应提供筑巢的垫料。

6.4.2.2 F1 代交配

大鼠 F1 代出生后至少应长到 13 周(小鼠为 11 周)才能进行交配,交配时,从 F1 代每窝中随机选择雌性,与同剂量组中不同窝的雄性动物以 1:1 或 2:1 的比例进行交叉配对繁殖 F2 代,未被选做交配的 F1 代在断乳后处死。

6.4.3 每窝仔鼠数量的标准化

每窝仔鼠于出生后第 4 天调整至相同数量,一般每窝 8 只,雌、雄各 4 只,雌或雄不足 4 只,则总数留取 8 只。原窝中多余的仔鼠应随机抽出,而不应按体重选择。F2 代按同样的方法进行调整。每窝的幼仔数小于 8 只时,则全部留取。

6.4.4 观察指标

6.4.4.1 临床观察

每日观察动物,包括行为改变、难产或滞产等所有的中毒表现。

6.4.4.2 体重和摄食量

在交配前和交配期,每周测量食物消耗量,在妊娠期每天测量食物消耗量,母鼠应在受孕的第0天、第7天、第14天和第21天称重。产仔后哺乳期,食物消耗量和仔鼠称重应同一天测量,仔鼠称重应于出生第0天、第4天、第7天、第14天和第21天进行,出生第0天和第4天以窝称重。如通过饮水给予受试物,则每周测量饮水量。亲代应在染毒的第一天称重,以后每周称重一次。

6.4.4.3 精子检查

交配结束时,处死所有亲代和F1代,取睾丸和附睾并称重,每种器官要保存1个,以备组织病理学检查。采集亲代附睾的精子进行检查,在显微镜下观察精子的活动性、形状及数量,可只检查对照组和高剂量组的亲代和子代雄鼠的精子形状,每个动物至少检查200个精子。

6.4.4.4 子代观察

分娩后第1天应尽快对仔鼠进行观察,记录每窝出生数、活产数、死产数以及幼仔外观有无异常和畸形。

6.4.4.5 大体解剖观察

在试验期间死亡或试验结束处死的所有亲代和成年子代F1动物均应进行大体检查,肉眼观察有无组织和形态上的改变,要特别注意生殖系统器官的改变。对死亡或濒临死亡的仔鼠也应检查,查看是否有外观或器官形态的缺陷。并对子宫、卵巢、睾丸、附睾、前列腺、脑、肝、肾、脾和已知的靶器官等进行称重。

6.4.4.6 组织病理学检查

保留上述所有亲代和子代动物的子宫、卵巢、阴道、睾丸、附睾、精囊、前列腺、脑垂体和靶器官(如果已知其靶器官)等标本,先对高剂量组和对照组的动物标本以及剖检中发现的异常动物标本进行组织病理学观察,如果高剂量组没有发现有意义的改变,则不需要进行其他剂量组标本的组织病理学检查。

6.4.4.7 其他检查

必要时,根据受试物的性质及所观察的毒性反应,增加神经系统和神经行为等敏感检测指标。

7 试验结果和评价

7.1 繁殖指数

交配成功率、受孕率、活产率、出生存活率、生存率、哺育存活率等分别见式(1)~式(6):

交配成功率 = $\frac{\text{交配成功动物数}}{\text{用于交配的雌性动物数}} \times 100\%$ (1)

受孕率 = $\frac{\text{怀孕动物数}}{\text{用于交配的雌性动物数}} \times 100\%$ (2)

$$\text{活产率} = \frac{\text{分娩有活体幼仔的动物数}}{\text{怀孕动物数}} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$
$$\text{出生存活率} = \frac{\text{出生时活的仔鼠数}}{\text{出生时仔鼠总数}} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$
$$\text{生存率} = \frac{\text{出生后第4天仔鼠存活数}}{\text{出生时活的仔鼠数}} \times 100\% \dots\dots\dots (5)$$
$$\text{哺育存活率} = \frac{\text{21天断乳时仔鼠存活数}}{\text{出生后第4天仔鼠存活数}} \times 100\% \dots\dots\dots (6)$$

7.2 数据处理

数据用表格表示,表中应列出每组实验动物数、能生育的雄性动物数和受孕的雌性动物数、各种毒性反应及繁殖指数(交配成功率、受孕率、活产率、出生存活率、生存率和哺育存活率)等。对所有数据用适当的统计方法进行分析。

7.3 结果评价

对试验组和对照组所有观察指标包括体重、摄食量、大体解剖和组织病理学检查结果、各繁殖指数进行统计学分析,观察有无显著性差异和剂量-反应关系以确定受试物的繁殖毒性,同时根据某一指标的差异进一步评价繁殖毒性的损害作用特点。

8 报告内容

试验报告至少应包含以下信息:

- 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、样品受理日期和封样情况;
- 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、有效成分美国化学文摘登录号(CAS号)(如已知)、代码(如有)、纯度(或含量)、剂型、生产日期(批号)、理化性质、配制所用溶剂和方法;
- f) 实验动物种属、品系、级别、数量、性别、体重、周龄、来源(供应商名称、实验动物质量合格证号、实验动物生产许可证号),检疫、适应情况,实验动物饲养环境,包括温度、相对湿度、饲料、单笼饲养或群饲、实验动物设施使用许可证号;
- 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每种性别动物数;
- h) 试验条件和方法:包括主要仪器设备、染毒途径、染毒方案、试验周期、观察指标等;
- i) 试验结果:体重(亲代体重、子代体重)和摄食量、繁殖指数(交配成功率、受孕率、活产率、出生存活率、生存率和哺育存活率)、脏器重量和组织病理学检查结果、任何有关繁殖和子代及其后期生长发育的毒性信息、精子检查信息等;
- j) 结论:受试物对亲代及其后代作用的未观察到有害作用剂量水平(NOAE)和观察到有害作用最低剂量水平(LOAE),明确受试物有无繁殖毒性;
- k) 原始记录保存情况的说明。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
农药登记毒理学试验方法
第 24 部分:两代繁殖毒性试验
GB/T 15670.24—2017

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字
2017 年 7 月第一版 2017 年 7 月第一次印刷

*

书号: 155066 • 1-54527 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 15670.24-2017