

ICS 65.020.30

B 44

DB44

广东省地方标准

DB 44/ XXXXX—20XX

日化用品致畸毒性斑马鱼评价指南

Guidelines for the Evaluation of Teratogenic Toxicity of Daily Chemical Products
Using Zebrafish

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(送审稿)

(本稿完成日期:)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

发布

目 次

前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 原理.....	2
5 试验条件要求.....	2
6 试验程序要求.....	2
7 受试物含量的测定.....	3
8 发育情况检查.....	3
9 质量保证.....	4
10 数据处理.....	4
11 致畸危害评估.....	4
12 结果解释.....	4
附录 A (资料性附录) 测试流程.....	5
附录 B (资料性附录) 各检查指标参考致畸特征.....	6
附录 C (资料性附录) 胚胎发育参考分期图.....	8
附录 D (资料性附录) 致畸危害指数.....	11
参 考 文 献.....	12

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则编写。

本文件由广东省科学技术厅提出。

本文件由广东省实验动物标准化技术委员会归口。

本文件由广东省科学技术厅组织实施。

本文件起草单位：广东省生物技术研究院（广东省实验动物监测中心），水中银（国际）生物科技有限公司，广州质量监督检测研究院。

本文件主要起草人：XXXXXXX

本文件于202X 年XX 月首次。

日化用品致畸毒性斑马鱼评价指南

1 范围

本标准规定了日化用品致畸毒性斑马鱼 (*Danio rerio*) 评价的基本要求。
本标准适用于日化用品产品及其原料的致畸毒性评价。

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，仅所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 15193.14 食品安全国家标准 致畸试验

GB/T 21807 化学品 鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性试验

GB/T 39649 实验动物 实验鱼质量控制

HJ 1069 水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法

3 术语和定义

3.1

斑马鱼胚胎 zebrafish embryo

处在依靠卵黄提供能量发育阶段的动物体。

3.2

斑马鱼仔鱼 zebrafish larvae

从卵膜内孵化出到卵黄吸收完毕且具奇鳍褶的鱼苗。

3.3

致畸毒性 teratogenicity

受试物在器官发育期间引起胚胎永久性结构异常的毒性。

3.4

无可观察效应浓度 no observed effect concentration, NOEC

指与对照组相比，对受试生物不产生显著效应 ($p > 0.05$) 的最高受试物浓度。

[来源： GB/T 21807，有改动]

3.5

半数致死浓度 half lethal concentration, LC_{50}

在一定观察期内，造成50%的斑马鱼死亡的受试物浓度。

3.6

半数致畸效应浓度 half teratogenesis effective concentration, EC_{50}

在一定观察期内，引起50%斑马鱼产生致畸效应的受试物浓度。

[来源：HJ 1069-2019，有改动]

4 原理

斑马鱼作为国际通用发育生物学研究模式生物，与人类基因组相比同源性达70%，人类疾病相关基因有82%能在斑马鱼中找到同源基因，生理特征、信号调控机制与哺乳类动物相似，同时胚胎体外受精发育、胚胎透明可见，可直观观察物质是否具有潜在致畸效应，是优良的致畸毒性评价替代模型。通过将斑马鱼胚胎暴露于受试物水溶液中，在一定时间后观察斑马鱼各组织器官发育情况，包括死亡、畸形等指标，评价受试物是否具有致畸毒性。

5 试验条件要求

5.1 设施设备

5.1.1 应配备斑马鱼养殖设备、繁殖配对器具、胚胎孵化用光照培养箱、带成像功能的显微镜等主要设备。养殖容器应由对生物无毒害的食品级 PC 或玻璃等材质制备。

5.1.2 试验用器具应由玻璃或聚苯乙烯等材质制备。如测试物可能吸附于聚苯乙烯容器时（如非极性化学品），应选用玻璃等惰性材料。

5.1.3 其他常规仪器设备，包括恒温培养箱、分析天平、水质检测设备、卤虫孵化器、旋涡混合仪、超声水浴锅、低温冰箱、可调节移液器等。

5.2 主要试剂

5.2.1 应使用标准稀释水作为斑马鱼胚胎培养及试验用水，标准稀释水配置方法可参照标准 HJ 1069 执行。

5.2.2 选择合适物质作为参比毒物，如 3,4-二氯苯胺等，浓度设置参照 HJ 1069 规定执行。

5.2.3 除非另有说明，所有试剂应为符合国家标准的分析纯试剂。

6 试验程序要求

6.1 受试物制备

6.1.1 水溶性受试物

原则上使用标准稀释水作为标准稀释液直接将受试物溶解配制成测试溶液。

6.1.2 非水溶性受试物

可选常用助溶剂如甲醇或二甲基亚砷等，设置的助溶剂浓度不宜对生物产生毒性效应。

6.2 实验生物准备

6.2.1 斑马鱼质量应符合 GB/T 39649 的规定。

6.2.2 斑马鱼胚胎获取参照 HJ 1069 的规定执行。

6.2.3 应选取健康的受精后 6~8 h 的斑马鱼胚胎作为实验生物。

6.3 暴露试验

6.3.1 预实验

当受试物毒性难以预估时，需进行预实验。以 10 倍稀释倍数设置 3 个连续受试物浓度组，确定 100% 死亡或 100% 致畸至无死亡和无致畸的浓度范围。如有用到助溶剂，则应设置助溶剂对照组。

6.3.2 正式试验

7.3.2.1 根据预实验或已有的相关毒性数据，确定受试物的测试浓度范围。浓度设置应遵循以下原则：最高浓度应尽可能引起 100% 鱼胚胎死亡，最低浓度不应导致鱼胚胎出现畸形或死亡。测试浓度应按照几何级数进行分布，设置不少于 5 个连续的浓度组，且浓度间隔系数不大于 3.2。

7.3.2.2 每个测试组应设置生物学重复，通常不低于 3 个平行组；胚胎数量应满足统计学需求，通常每个生物学重复设置 10 粒胚胎。试验开始时应准确记录胚胎所处的发育时期。

7.3.2.3 推荐采用微孔板作为测试容器，每孔放置 1 粒胚胎，含测试溶液不少于 0.2 mL。

7.3.2.4 尽量减少对胚胎的干扰，分放时宜控制在 60 min 内完成。

7.3.2.5 完成胚胎分放后，将含胚胎的测试容器放置于恒温培养箱或恒温室中，温度控制在 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照控制在 540 lux 左右。持续时间为 96 h。

7.3.2.6 对于理化性质不稳定的原料类受试物，可按需要定期更换测试溶液。

7 受试物含量的测定

对于理化性质不稳定的原料类受试物，整个试验期间应对试验液至少取样测定 2 次，分别为新配制的试验液和试验即将结束前的测试溶液。对于理化性质稳定的原料及产品类受试物，受试物含量根据试验需要测定。

8 发育情况检查

8.1 一般观察项目

持续监测并观察记录胚胎的死亡个数、畸形数量、开始出膜时间、出膜数量以及可观测到异常行为的数量，并将死亡的鱼胚胎移除；观察时间可依具体试验的需要而设定，一般以 24~48 小时为宜。各项指标的参考特征详见附表 B，胚胎不同发育时期的代表图见附录 C。

8.2 组织器官发育检查

试验结束时，即受精后至斑马鱼胚胎发育（ 96 ± 2 ）h时，利用显微镜逐一检查存活个体各组织和器官发育情况。各指标参考特征见附表B。

9 质量保证

试验结果应符合下列要求，结果方为有效，否则，应查明原因重新进行实验。

- a) 试验期间，溶解氧浓度应 $\geq 80\%$ 空气饱和值。
- b) 实验容器温差不大于 ± 1.5 °C。
- c) 对照组和助溶剂对照组胚胎总死亡和致畸率 $\leq 10\%$ 。
- d) 阳性对照组鱼胚胎致死率或致畸率与对照组有显著性差异（ $p < 0.05$ ）。

10 数据处理

10.1 对各组各指标进行统计，利用方差分析或其他合适方法分析各单项指标在各平行组间的变化，估算各单项指标的NOEC，以最低NOEC对应的浓度值作为终点NOEC。

10.2 采用适当的统计方法对各项数据进行处理（如概率单位法）对鱼胚胎死亡率及致畸率和样本测试浓度之间进行剂量反应曲线拟合计算 LC_{50} 和 EC_{50} ，以最低 EC_{50} 浓度值作为该受试物的终点 EC_{50} 值。

11 致畸危害评估

综合毒性试验数据，评估受试物无致畸效应对应的浓度范围。

结合 LC_{50} 和 EC_{50} 等数据，综合评估受试物致畸危害风险，致畸危害指数评估参见附录D。

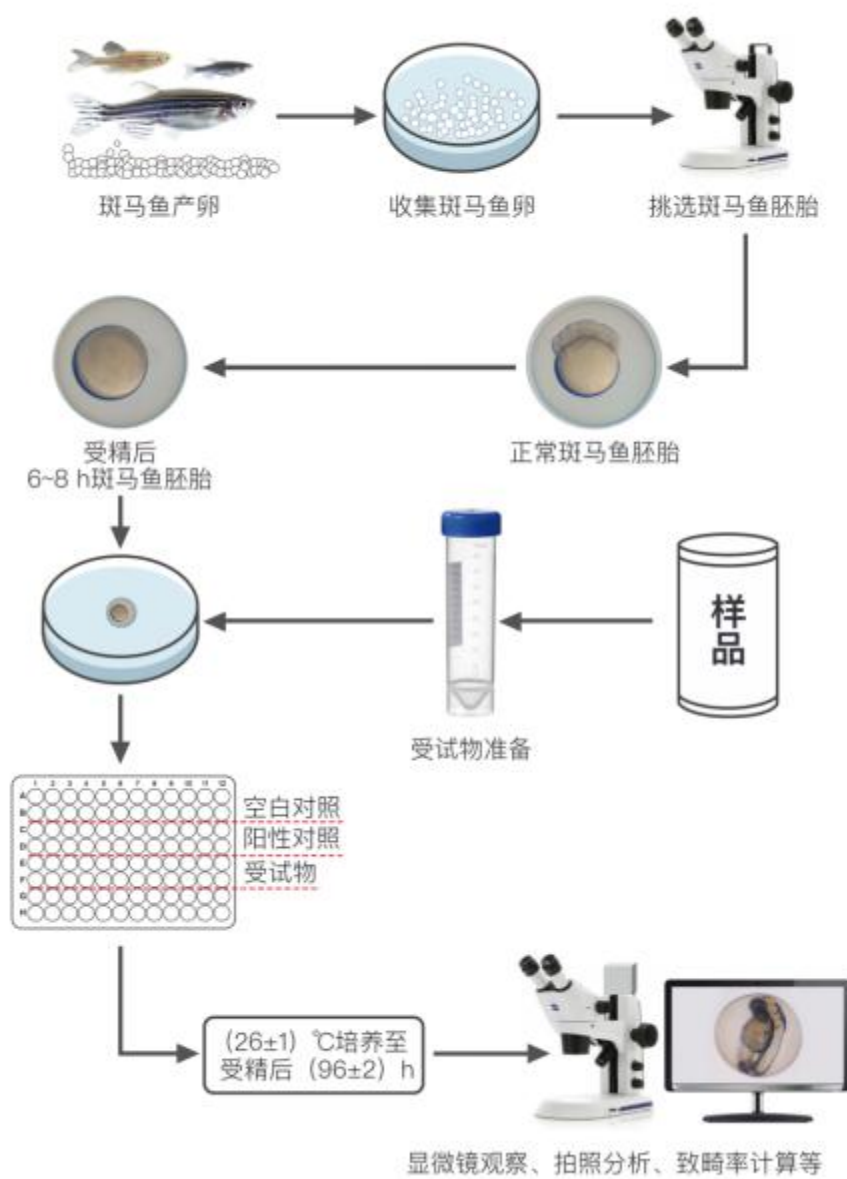
12 结果解释

解释致畸试验结果时，应注意种属的差异。试验结果从动物外推到人存在着一定的局限性。

附录 A
(资料性附录)
测试流程

A.1 斑马鱼胚胎致畸毒性测试流程

见图A.1。



图A.1 斑马鱼胚胎致畸毒性测试流程

附 录 B
(资料性附录)
各检查指标参考致畸特征

B.1 一般检查指标

B.1.1 死亡个数

每24 h统计一次各组死亡个数，死亡判定标准为心脏停止跳动。

B.1.2 畸形数量

每24 h统计一次各组畸形个数，畸形判定标准包括与对照组相比斑马鱼胚胎任何可能出现的形态、体色特征改变。

B.1.3 开始出膜时间

胚胎发育至24 h后，每24 h观察各组胚胎出膜情况，记录出膜时间。

B.1.4 出膜数量

胚胎发育至24 h后，每24 h统计一次各组胚胎出膜的个数。

B.1.5 出现其他异常行为实验鱼的数量

呼吸急促等。

B.2 器官检查指标

B.2.1 头部

典型致畸特征包括：头盖/鳃盖骨异常、小眼、眼球突出、无下颌、颌面畸形等。必要时利用阿利新蓝或茜素红对骨骼进行染色，进一步确认上述观察。

B.2.2 心脏

典型致畸特征包括：心包水肿、心率异常、窦房结-静脉窦距离异常等。

B.2.3 肝脏

典型致畸特征包括：肝脏缺失、变小、变形等。

B.2.4 肾脏

典型致畸特征包括：水肿、缺失、变形等。

B.2.5 卵黄囊

典型致畸特征包括：水肿或吸收延迟。

B. 2. 6 肠道

典型致畸特征包括：肠腔发育异常。

B. 2. 7 脊椎/体节

典型致畸特征包括：脊柱曲度异常等。必要时利用阿利新蓝或茜素红对骨骼进行染色，进一步确认上述观察。

B. 2. 8 肌肉

典型致畸特征包括：肌肉变性等。

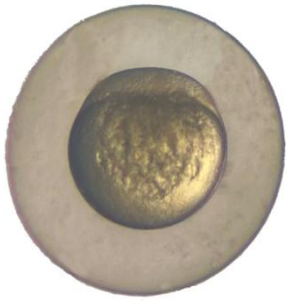
B. 2. 9 皮肤

典型致畸特征包括：体色异常等。

B. 2. 10 鳍条

典型致畸特征包括：胸鳍、尾鳍、腹鳍、臀鳍、背鳍等部位的鳍条是否完整等。必要时利用阿利新蓝或茜素红对骨骼进行染色，进一步确认上述观察。

附录 C
(资料性附录)
胚胎发育参考分期图



1 细胞期



2 细胞期



4 细胞期



8 细胞期



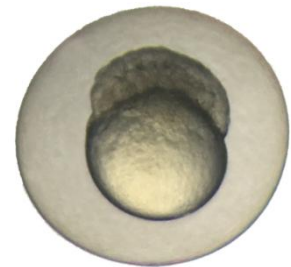
16 细胞期



32 细胞期



64 细胞期



128-256 细胞期



512 细胞期



1k 细胞期



高囊胚期



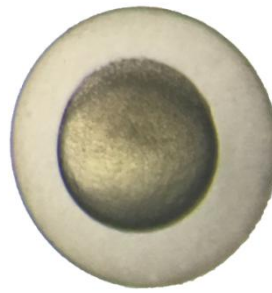
椭圆形



球形



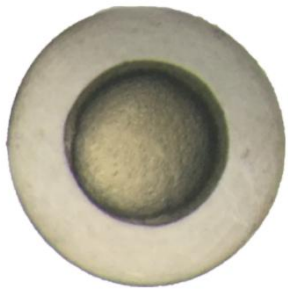
穹顶



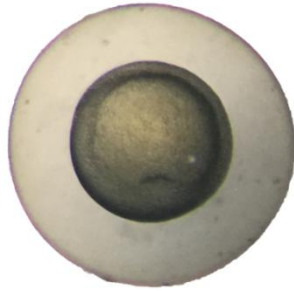
30%-外包



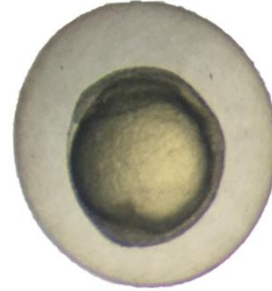
50%-外包



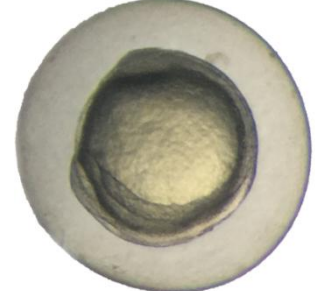
胚环



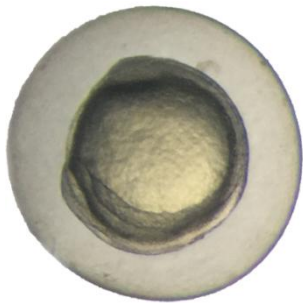
胚盾



90%-外包



尾芽



3-体节



6-体节



10-体节



14-体节



18-体节



21-体节



26-体节-原基 6 转化



原基-16



原基-22



高胸鳍



长胸鳍



胸鳍

附 录 D
(资料性附录)
致畸危害指数

D.1 致畸毒性评价

致畸危害指数=半致死浓度(LC₅₀) / 半数致畸效应浓度(EC₅₀) (1)

D.2 结果评价

致畸危害指数数值越小，致畸毒性风险越小、对人体越安全。当致畸危害指数≥3时，表示受试物对人致畸风险高，当致畸危害指数<3时，表示受试物对人致畸风险低。

选用其他致畸危害评估方法时，需提供其科学性依据。

参 考 文 献

- [1] T/GDST 1-2021 斑马鱼胚胎急性毒性测试 A 法和 B 法[S]。
- [2] DB 32/T 3979-2021 实验用 斑马鱼 饲养技术条件[S]。
- [3] Brannen KC, Panzica-Kelly JM, Danberry TL, et al. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model[J]. Birth Defects Research (Part B), 2010, 89: 66-77.
- [4] Panzica-Kelly JM, Zhang CX, Danberry TL, et al. Morphological score assignment guidelines for the dechlorinated zebrafish teratogenicity assay[J]. Birth Defects Research (Part B), 2010, 89: 382-395.
- [5] Halili JFA, Quilang JP. The zebrafish embryo toxicity and teratogenicity assay[J]. The Philippine Biota, 2011, XLIV: 63-71.
- [6] Ducharme NA, Peterson LE, Benfenati E, et al. Meta-analysis of toxicity and teratogenicity of 133 chemicals from zebrafish developmental toxicity studies[J]. Reproductive Toxicology, 2013, 41: 98-108.
- [7] Yamashita A, Inada H, Chihara K, et al. Improvement of the evaluation method for teratogenicity using zebrafish embryos[J]. The Journal of Toxicological Sciences, 2014, 39(3): 453-464.
- [8] Jarque S, Rubio-Brotons M, Ibarra J, et al. Morphometric analysis of developing zebrafish embryos allows predicting teratogenicity modes of action in higher vertebrates[J]. Reproductive Toxicology, 2020, 96: 337-348.
- [9] GB/T 4754—2017 国民经济行业分类[S]。
- [10] Jarque S, Rubio-Brotons M, Ibarra J, et al. Morphometric analysis of developing zebrafish embryos allows predicting teratogenicity modes of action in higher vertebrates[J]. Reproductive toxicology, 2020, 96: 337-348.
-