



中华人民共和国国家标准

GB/T 35517—2017

化学品 鱼类生殖毒性短期试验方法

Chemicals—Fish short term reproduction toxicity assay

2017-12-29 发布

2018-07-01 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

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 术语、定义和缩略语	1
3 方法概述	1
4 质量保证与质量控制	2
5 仪器设备	2
6 试验准备	2
6.1 试验用水	2
6.2 鱼的驯养	2
6.3 预暴露和鱼的选择	3
7 试验程序	3
7.1 一般说明	3
7.2 试验浓度的选择	3
8 试验过程	3
8.1 受试鱼的选择与称重	3
8.2 暴露条件	3
8.2.1 时间	3
8.2.2 驯养	3
8.2.3 灯光和温度	4
8.3 测试频率	4
8.4 观察	4
8.4.1 死亡率	4
8.4.2 行为和表观	4
8.4.3 生殖力	4
8.4.4 鱼的安乐死	4
8.4.5 第二性征的观察	4
8.4.6 卵黄蛋白原测定	5
8.4.7 性腺组织病理学评价	5
9 数据和报告	5
9.1 采用方差分析(ANOVA)对生物标志物响应进行评价	5
9.2 试验结果报告	5
附录 A (资料性附录) 进行卵黄蛋白原分析的样品收集推荐程序	7
附录 B (资料性附录) 检测特定内分泌活性物质对黑头呆鱼和青鳉的第二性征的评估	16
附录 C (资料性附录) 鱼类内分泌筛选试验的实验条件	21

附录 D (资料性附录) 斑马鱼和黑头呆鱼的产卵基板	23
附录 E (资料性附录) 可接受的稀释水的一些化学特性	25
附录 F (资料性附录) 卵黄蛋白原加标和批间标准品分析	26
附录 G (资料性附录) 统计分析流程	27
附录 H (规范性附录) 试验结果阐释和可接受性的标准	28
参考文献	29
图 A.1 用剪刀沿着胸鳍前剪开	8
图 A.2 用剪刀沿着腹部中线伸入腹部离肛门头部大约 2 mm 处	9
图 A.3 采用手术钳撑开腹壁,暴露肝脏以及其他内部器官(或者将腹壁横向固定)	9
图 A.4 采用手术钳缓慢分离和切除肝脏	10
图 A.5 采用手术钳缓慢摘取肠道	10
图 A.6 肠道以及任何肠系膜的附属物的终端采用剪刀切割	11
图 A.7 (雌鱼)对于雌鱼过程相同	11
图 A.8 完成整个过程	12
图 A.9 斑马鱼鱼头鱼尾的切分	15
图 B.1 黑头呆鱼珠星的数目和尺寸	17
图 B.2 臀鳍形状和尺寸的性别差异	19
图 B.3 臀鳍线的结合板上的突起过程	20
图 B.4 带有切割点的鱼身照片	20
图 D.1 斑马鱼产卵基板	23
图 D.2 黑头呆鱼产卵基板	24
图 G.1 统计分析流程图	27
表 B.1 黑头呆鱼珠星模板	18
表 C.1 鱼类内分泌筛选试验的实验条件	21
表 E.1 可接受的稀释水的一些化学特性	25

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准技术内容与经济合作与发展组织 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 测试导则 229(2012 年)《鱼类短期生殖毒性测试(2012)》(英文版)技术内容一致。

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。

本标准起草单位:中国检验检疫科学研究院、中国合格评定国家认可中心、宁波出入境检验检疫局、广东省微生物分析检测中心、中国化工经济技术发展中心、上海市检测中心。

本标准主要起草人:程艳、崔媛、唐伟、孙运、陈会明、李海山、谢文平、曹梦然、殷浩文、张京佶、曾国驱、梅承芳。

引 言

本试验方法描述了一种体内筛选试验方法,将性成熟的雄鱼和处于产卵期的雌鱼一起暴露于化学品中 21 d。在 21 d 暴露期结束时,对雄鱼和雌鱼的生物标志物终点进行测定,作为测试化学物质内分泌活性指标。这些测试终点包括卵黄蛋白原和第二性特征对黑头呆鱼、日本青鳉和斑马鱼可进行卵黄蛋白原测定,而第二性征只能在黑头呆鱼和日本青鳉上测定。在整个测试过程中每天都要监测繁殖力;保留性腺,可通过病理组织学来评估测试动物的生殖健康,也为其他测试终点提供更有力的证据。

卵黄蛋白原通常受循环的内源性雌激素的刺激,由雌性卵生脊椎动物的肝脏产生。卵黄蛋白原是卵黄蛋白的前体,一旦在肝脏中产生,由血流进入卵巢,被发育中的卵吸收并修饰。卵黄蛋白原在未成熟的雌鱼和雄鱼的血浆中几乎检测不到,因为它们缺乏足够的循环雌激素,但在受外源性的雌激素的刺激下,肝脏能够合成并分泌卵黄蛋白原。

卵黄蛋白原的测定能够检测不同雌激素作用模式的化学品,对雌激素类化学品的检测,有可能通过测量雄鱼的卵黄蛋白原的产生。在雌性体内的雌激素循环水平的降低,例如通过抑制转化内源性雄激素为天然雌激素 17 β -雌二醇的芳香酶,会引起卵黄蛋白原水平的降低,这一点被用来检测具有芳香酶抑制性质的化学品。

采用已建立标准化的常规检测方法。采用免疫化学的物种特异性的酶联免疫吸收分析(ELISA)方法,收集黑头呆鱼的血液、斑马鱼的血液或头/尾的匀浆以及青鳉的肝脏,作为 VTG 测定的样品。对于青鳉,在血液中测量的 VTG 与肝脏中所测具有良好的相关性。附录 A 提供了对于卵黄蛋白原分析的样品收集的推荐程序。卵黄蛋白原可采用不同的试验方法,但都得基于验证的物种特异性 ELISA 方法。

特定物种雄鱼的第二性征是可观察的,与内源性雄激素循环水平呈定量响应性,这些特性在黑头呆鱼和青鳉上能体现,但斑马鱼没有体现,因为斑马鱼不具备可定量的第二性征。

对于黑头呆鱼,外源受试物暴露的主要指标是位于雌鱼唇部珠星的数量。对于青鳉,乳突物的数目组成了雌鱼的外源性暴露于雄激素受试物的主要标志物。附录 B 分别说明了对于黑头呆鱼和青鳉的性特征评价的过程。

为期 21 d 的鱼类测试包括定量产卵量和性腺组织病理学检测。试验中可能会需要额外的终点对受试生物生殖健康进行更完整的评估,或者防止卵黄蛋白原和第二性征对化学品暴露没有响应。虽然某些终点是可得出明确结论(例如雄性诱导形成卵黄蛋白原、雌性诱导形成珠星),但并不是测试的所有终点(例如生殖力和性腺组织病理学)直接表明毒性作用机制。另外,对于某些终点,可通过内分泌干扰来推测。虽然不是特定的内分泌作用,但由于对内分泌干扰活性物质表现出敏感性,所以生殖力是可考虑的重要终点。因为当它和其他终点不受影响时,能够更加确定的是此化合物很可能不具有内分泌干扰活性。而当生殖力受到影响,会对推论提供强有力的证据。本测试提供了进一步进行数据结果解释和测试结果可接受性的指导。

化学品 鱼类生殖毒性短期试验方法

1 范围

本标准规定了化学品鱼类生殖毒性短期试验方法的方法概述、质量保证与质量控制、仪器设备、试验准备、试验程序、试验过程、数据和报告。

本标准适用于化学品鱼类生殖毒性试验。

2 术语、定义和缩略语

2.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1.1

承载率 loading rate

单位体积水中鱼的湿重。

2.1.2

承载密度 stocking density

单位体积水中鱼的数目。

2.1.3

卵黄蛋白原 vitellogenin; VTG

一种磷脂糖蛋白, 蛋黄蛋白的前体, 一般出现于所有卵生动物的性成熟雌性个体。

2.1.4

最大耐受浓度 maximum tolerated concentration; MTC

受试物引起小于 10% 死亡率的最高试验浓度。

2.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CV: 变异系数(coefficient of variation)

ELISA: 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay)

HPG 轴: 下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-gonadal axis)

3 方法概述

将处于繁殖期的雌鱼和雄鱼共同暴露于受试物中。根据所选受试鱼物种对其相关生物标志物终点指标进行测定。其中性特征可在解剖后目测确认, 其他生物测试指标参见附录 C。设置 3 个受试物浓度以及一个空白对照, 必要时可采用溶剂对照。对于青鳉和斑马鱼, 每个受试浓度至少有 2 个试验容器(每个试验容器中包括 5 尾雄鱼和 5 尾雌鱼); 对于黑头呆鱼, 每个受试浓度至少有 4 个试验容器(每个试验容器中包括 2 尾雄鱼和 4 尾雌鱼)。暴露进行 21 d, 在第 21 天暴露时对鱼进行取样。

在第 21 天取样时, 所有动物处以安乐死。对于黑头呆鱼和青鳉进行第二性征检测, 参见附录 B; 取斑马鱼和黑头呆鱼血液样本, 或者取斑马鱼的头/尾组织匀浆样本检测卵黄蛋白原, 参见附录 A; 对于青鳉, 收集肝脏检测卵黄蛋白原(参见附录 A), 解剖后将性腺整体固定用作病理学评估。