

附件

生殖发育毒性试验技术指导原则

（征求意见稿）

中国食品药品检定研究院

2023 年 9 月

目 录

一、概述.....	1
二、基本原则.....	1
(一) 一般原则.....	1
(二) 具体问题具体分析.....	1
(三) 试验研究策略.....	2
三、基本内容.....	2
(一) 受试物.....	2
(二) 暴露方式.....	2
(三) 实验动物.....	3
(四) 剂量设计与分组.....	3
(五) 试验设计.....	4
(六) 观察指标.....	5
四、结果分析与评价.....	7
五、参考文献.....	8
六、术语和释义.....	9
附录.....	11

一、概述

生殖发育毒性试验方法，是通过对动物以受试物暴露，考察其对雄性和雌性动物生育力及生殖系统的影响。若该暴露（直接或间接）持续至子代，则还可以继续考察受试物对子代发育，甚至子代生育力的影响。

本指导原则根据《化妆品安全技术规范》《化妆品注册和备案检验工作规范》《化妆品注册备案资料管理规定》《化妆品新原料注册备案资料管理规定》等相关要求，并参考国内外相关技术要求制定，适用于化妆品及新原料的生殖发育毒性研究。

本指导原则为化妆品及新原料生殖发育毒性毒理研究提供的研究方法包括扩展一代生殖发育毒性试验和两代生殖发育毒性试验，试验人员可根据不同的研究目的选择合适的试验方法。

二、基本原则

（一）一般原则

生殖毒性试验的设计，应遵循生物试验的基本原则，即随机、对照和重复。试验数据应真实、完整、准确、可追溯，试验结果统计分析应科学合理。

（二）具体问题具体分析

“具体问题具体分析”也是生殖发育毒性试验应遵循的重要原则。根据已有的受试物相关资料，如结构特点、理化

性质、药理毒理研究信息、可能的暴露途径等选择恰当的试验方法，合理的试验方案，并科学全面地分析评价受试物的生殖发育毒性。

（三）试验研究策略

生殖发育毒性试验应包括扩展一代生殖发育毒性试验和两代生殖发育毒性试验方法。研究者应选择合适的试验方法，以最大程度暴露受试物的生殖发育毒性。在选择扩展一代生殖发育毒性试验时，应注意由触发条件导致的研究策略改变。

三、基本内容

（一）受试物

受试物若需配制，所选择的溶媒通常包括水和玉米油，其它溶剂也可以选择，但应明确其本身的毒性及其是否改变受试物的化学特性。所配制的溶液也应当确保其稳定性。

（二）暴露方式

首先应考虑选择与人的可能暴露途径最接近的方式。也可根据受试物的物化特性选择合适的暴露途径。

化妆品原料一般采用经口、经皮或吸入方式给予受试物，溶媒对照应采用相同的给予途径。若设置阳性对照，其处理方式可以不同于受试物处理组。阳性对照物的选择因作用阶段不同可有多种选择，试验设计人员可根据受试物特征，选

择合适的阳性物（如环磷酰胺、维 A 酸、丙硫氧嘧啶等）以考察所关注的实验终点。

通过饲料或饮水给予受试物，在设置对照组时应对其处理方式的合理性加以考虑。经皮给予受试物时，应确保足够接触时长和接触面积。经口灌胃则需要考虑动物所能接受的最大生物限度。经吸入暴露需控制好氧气和二氧化碳浓度，并确保受试物浓度的持续稳定。

一般情况下，选择以上受试物暴露途径是合适的，若选择其它暴露途径应阐明选择理由。同时，不论剂量组或阳性对照组，采取腹腔注射的暴露方式是不可取的。

（三）实验动物

首选种属为大鼠，若选择其它种属动物应有合理理由，同时应避免选择生育力低且具有明显发育缺陷的动物种属。所选动物应健康且未经历任何试验，其中雌性动物应为未经产且未孕动物。在开始试验时，动物应已发育性成熟。

生殖发育毒性试验通常应确保至少有 20 只成功怀孕的雌性动物用于分析，但在某些情况下（如个别动物死亡或流产），未达到 20 只怀孕动物也可接受，但应遵循具体问题具体分析原则。

（四）剂量设计与分组

通常情况下，设置 3 个剂量组和 1 个溶媒对照组较为合适，但是根据剂量反应曲线特征也可增加或减少组别。高剂

量的选择可以参考受试物的毒代动力学试验数据或重复剂量毒性试验资料。若无相关资料，高剂量的选择应确保产生一定程度的全身毒性但不致死或造成动物严重的痛苦。低剂量应能够确定 NOAEL 或可以用于推导基准剂量（Bench mark dose, BMD）。

拟进行限制剂量试验时，应注意其前提条件为人的可能暴露水平低于 1000 mg/kg/day。

（五）试验设计

1. 扩展一代生殖发育毒性试验

从 F0 持续暴露至 F1 离乳，观察受试物对 F0 的生育力、生殖系统和 F1 的生殖（满足触发条件的情况下）和发育影响。

扩展一代生殖发育毒性试验增强了对 F1 代发育的评价功能。以亚组的形式分别评价 F1 的生殖和全身毒性，潜在的生殖毒性，潜在的神经发育毒性和潜在的发育免疫毒性。其中对后面三种潜在发育毒性的研究规定了触发条件，仅在满足相关实验终点判定依据（内部触发）或不具有相关毒理资料（外部触发）的情况下方开展进一步的潜在发育毒性研究。

2. 两代生殖发育毒性试验

从 F0 持续暴露至 F2 离乳，观察受试物对 F0 的生育力、生殖系统和 F1 的生殖和发育影响。

与扩展一代生殖发育毒性试验相比，两代生殖发育毒性周期较长，且缺少对 F1 免疫系统发育的关注。在开展试验前对受试物资料分析的过程中，若发现有免疫发育毒性提示，建议增加免疫系统（如胸腺、脾脏、骨髓、暴露途径相关淋巴结和远端淋巴结）的组织病理检查。

（六）观察指标

1. 临床观察

包括至少每天一次的一般临床观察和每天两次笼旁观察以及每周一次的全面的临床观察，通常可以在给动物称重时进行。

2. 体重、摄食及饮水

体重、摄食和饮水测定频率一般每周一次较为合适，但是哺乳期的幼仔生长速度较快，更高频率的测量较为合适。一些受试物暴露节点如首次给予受试物和解剖当日需要称重，此外，具有发育里程碑意义的时间点，如雄性包皮龟头分离、雌性阴道口张开当日也应称重。

需要注意的是，扩展一代生殖发育毒性试验中亲代体重测量的频率未对妊娠期做特殊要求，但也应建议选择 G0、G7、G14、G20/G21 这几个时间点。对于子一代的体重测量，两代生殖发育毒性试验中需要测量首次接触受试物当日的体重。

3. 动情周期

动情周期通过阴道涂片进行监测。实验室历史数据若显示大部分雌性不具有 4-5 天的动情周期，建议筛选具有正常动情周期的雌性动物纳入试验。需注意的是，在一些应激情况下，动情周期也可能发生改变，应与受试物导致的动情周期改变加以区分。

扩展一代生殖发育毒性试验中对动情周期的监测时长有明确要求，而两代生殖发育毒性试验中未予以明确，但是通常情况下连续两个动情周期的监测能够满足对动情周期的评估要求。

4.精子参数

精子参数的分析一般包括精子活力分析、精子计数、精子形态分析。对于来自于解剖时及时冻存的样本或固定后的涂片，或者直接采用精子分析仪等计算机辅助系统及时采集的样本图像，可仅对高剂量组和对照组进行分析，仅在受试物相关性时拓展至更低的剂量组。

5.血液学及血生化

扩展一代生殖发育毒性试验要求 F0 在解剖当天采集血样做血液学、血生化及甲状腺素/促甲状腺素（T4/TSH）分析。两代生殖发育毒性试验中此项研究不是必须，但若提示受试物有内分泌干扰作用，仍应分析 T4/TSH。

对激素的分析可不仅限于 T4/TSH，一些情况下，检测黄体生成素（LH）、卵泡刺激素（FSH）、孕酮、雌二醇及睾酮等也有助于对试验结果的解释。

6.尿液分析

扩展一代生殖发育毒性试验要求进行尿液分析，但是若在重复剂量毒性试验中明确受试物不改变尿液参数，那么该项研究无需开展。两代生殖发育毒性试验此项研究不是必须。

7.解剖与病理

所有亲代动物和选定的需要进行大体解剖的子代动物在安乐死后进行尸体解剖，也包括出生后死亡幼仔。需要称重的脏器应注意其完整性，避免其分泌液体的逸出（如避免剪破精囊腺）。做组织病理检查可以仅在高剂量组和对照组间先进行，在观察到受试物相关变化时，再将组织病理检查拓展至更低剂量组。

四、结果分析与评价

需要在报告中列出的试验数据及结果见附件中试验方法的相应部分。

数据和结果以表格形式进行总结，并采用合适的、可接受的统计方法进行评估，注意区分统计学意义和生物学意义。应能估计 NOAEL 剂量水平，并对受试物在生殖、分娩、哺乳及出生后发育(包括生长和性发育)的不利影响尽可能充分暴露。

五、参考文献

1. OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals: Two-Generation Reproduction Toxicity Study. 2001.1.
2. OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals: EXTENDED ONE-GENERATION REPRODUCTIVE TOXICITY STUDY. 2018.1.
3. OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test. 2016.1.
4. GUIDANCE DOCUMENT 117 ON THE CURRENT IMPLEMENTATION OF INTERNAL TRIGGERS IN TEST GUIDELINE 443 FOR AN EXTENDED ONE GENERATION REPRODUCTIVE TOXICITY STUDY, IN THE UNITED STATES AND CANADA No. 117, OECD. ENV/JM/MONO (2011).
5. United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva.
6. Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), “Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights”, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.
7. Nigel P. Moore, Manon Beekhuijzen, et al (2016), “Guidance on the selection of cohorts for the extended one-generation reproduction toxicity study (OECD test

guideline 443)”, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 80: 32-40.

8. GUIDANCE DOCUMENT SUPPORTING OECD TEST GUIDELINE 443 ON THE EXTENDED ONEGENERATION REPRODUCTIVE TOXICITY TEST NO.151, OECD. ENV/JM/MONO(2013).

9. 国家食品药品监督管理局，化妆品安全技术规范（2015 年版），2015.12

10. 国家食品药品监督管理局，化妆品安全评估技术导则（2021 年版），2021.4

六、术语和释义

生殖毒性（reproductive toxicity）：对后代产生有害作用，并损伤雄性和雌性的生殖功能和生殖能力。

发育毒性（developmental toxicity）：生殖毒性的表现，具体表现为后代在产前、围产期、产后发生的结构和功能紊乱。

神经发育毒性（developmental neurotoxicity）：个体在发育过程中暴露于受试物后引起的神经系统结构和功能的异常改变，这种改变可以发生在生命周期的任何阶段。

发育免疫毒性（developmental immunotoxicity）：个体在其生命早期发育过程中（尤其是出生前后）暴露于受试物后导致的免疫系统发育受到影响、功能出现障碍，而这些影响在成年个体暴露时未被发现或持续时间较短。

母体毒性 (maternal toxicity)：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、毒性反应、甚至死亡。

未观察到有害作用剂量 (no-observed-adverse effect level, NOAEL)：通过动物试验，以现有的技术手段和检测指标未观察到任何与受试物相关的毒性作用的最大剂量。

观察到有害作用的最低剂量 (lowest-observed-adverse effect level, LOAEL)：在规定的条件下，受试物引起实验动物组织形态、功能、生长发育等有害效应的最小作用剂量。

附录

扩展一代生殖发育毒性试验

1. 范围

本规范规定了扩展一代生殖发育毒性试验基本原则，试验方法和技术要求。
本规范用于检测化妆品原料的生殖发育毒性。

2. 试验目的

提供关于受试物产前、产后暴露对雌性、雄性动物生殖功能、生育力及子代发育影响的确切信息。

3. 定义

3.1 生殖毒性 (Reproduction Toxicity)

对后代产生有害作用，并损伤雄性和雌性的生殖功能和生殖能力。

3.2 发育毒性 (Developmental toxicity)

生殖毒性的表现，具体表现为后代在产前、围产期、产后发生的结构和功能紊乱。

3.3 神经发育毒性 (Developmental neurotoxicity)

个体在发育过程中暴露于受试物后引起的神经系统结构和功能的异常改变，这种改变可以发生在生命周期的任何阶段。

3.4 发育免疫毒性 (Developmental immunotoxicity)

个体在其生命早期发育过程中（尤其是出生前后）暴露于受试物后导致的免疫系统发育受到影响、功能出现障碍，而这些影响在成年个体暴露时未被发现或持续时间较短。

3.5 母体毒性 (Maternal toxicity)

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、毒性反应、甚至死亡。

3.6 未观察到有害作用剂量 (NOAEL)

通过动物试验，以现有的技术手段和检测指标未观察到任何与受试物相关的毒性作用的最大剂量。

3.7 观察到有害作用的最低剂量 (LOAEL)

在规定的条件下，受试物引起实验动物组织形态、功能、生长发育等有害效应的最小作用剂量。

4. 试验的基本原则

通过对实验动物以受试物暴露，考察其对雄性和雌性动物生殖功能、生育力及生殖系统形态的影响。若该暴露（直接或间接）持续至子代，则还可以继续考察受试物对子代发育，甚至子代生殖功能和生育力的影响。

5. 受试物配制

化妆品原料一般采用经口、经皮或吸入方式给予受试物，溶媒对照应采用相同的给予途径。若设置阳性对照，其处理方式可以不同于受试物处理组。

一般情况下首选水作为溶媒，可以是水溶液也可以是混悬液，其次可以选择玉米油作为溶媒配制成乳浊液，也可以将其与水混合配制成油溶液。使用水以外的其它溶媒，应阐明其毒性并保证所配制溶液的稳定性。

其它应纳入考虑的因素包括：溶媒是否影响受试物化学特征继而改变受试物毒性；溶媒是否影响受试物的吸收、代谢、分布和蓄积；溶媒是否影响动物食物和饮水摄入继而影响营养状况；溶媒本身是否有潜在毒性。

经口灌胃时，以大鼠为例，水溶性液体的灌胃体积一般不超过 10 mL/kg 体重，最大不超过 20 mL/kg 体重；油性液体的灌胃体积不超过 4 mL/kg 体重。

经饲料或饮水给予时，应充分考虑溶媒添加量和动物热量的摄入。若使用溶媒，那么对照组应按受试物组的最高使用量添加；若不使用溶媒，且受试物会造成摄食量或食物利用率的降低，那么可以通过将其饲喂未交配动物作为配对对照组，但是，如有资料表明食物消耗的降低并不影响生殖相关参数，可以不设置配对对照。

经皮给予受试物时，应考虑受试物浓度对皮肤的刺激性。若在既定剂量下的浓度产生较为严重的皮肤刺激性，应将浓度适当降低。当然，这种降低可能也伴随剂量的降低。如果因浓度过高，在早期就出现皮肤严重受损的情况下，应终止试验并选择合适的浓度重新开始。受试物皮肤暴露面积应达到动物全身皮肤的 10%，毒性过高的受试物也可以小于 10%。可以采用纱布和无刺激性胶带将受试物固定在皮肤表面，需要保证每天 6 小时的接触时长，同时也可以采用非保定方式（如防抓咬保护脖套）防止动物摄入受试物或弄掉封闭胶带。

经吸入给予受试物时，一般采用气体、蒸汽、气溶胶或以上混合形态进行受试物暴露。吸入受试物所采用的暴露物态应根据其理化性质、拟定浓度和/或其实际应用时的物态加以确定。不论采用头鼻暴露还是全身暴露，均需将气流中的氧气浓度控制在至少 19%，二氧化碳浓度控制在不高于 1%，同时确保受试物浓度稳定。

6. 实验动物和饲养环境

6.1 实验动物选择

首选种属为大鼠，若选择其它种属动物应有合理理由，同时应避免选择生育力低且具有明显发育缺陷的动物种属。所选动物应健康且未经历任何试验，其中雌性动物应为未经产或未孕动物。受试物处理前，动物体重应控制在同性别平均体重的 20% 范围内，若有必要还应基于发情周期筛选动物，将发情周期正常的雌性纳入试验。动物开始交配的周龄在 12-14 周龄较为合适。

6.2 动物数量

应保证每组至少有 20 只怀孕雌性动物，在极端情况下，未能产生足够的怀孕动物时，不表明研究数据无效，需个案分析。雄性动物数量推荐与雌性动物保持一致。

6.3 动物的准备和饲养

动物抵达实验设施后，应有不少于 5 天的环境适应期。饲养环境应符合国标相关要求。动物自由采食和饮水，但应注意饮食中植物雌激素的含量，避免影响某些生殖终点。所用批次饲料留样并适当保存至报告完成，以便在某些情况下进行回溯分析。

动物交配前可以多只动物饲养于一笼，雌性动物交配成功后（检查到阴栓或阴道涂片阳性）应单笼饲养于含垫料的笼具内，其所产 F1 代同笼饲养至离乳。离乳后的 F1 代应按组别、性别分笼饲养，如有合理理由亦可单笼饲养。

7. 暴露途径选择

应选择与人的可能暴露途径最接近的方式。可根据受试物的物化特性选择合适的暴露途径。

8. 受试物资料分析

在开始试验前，充分了解受试物的相关信息，如物化性质，毒代动力学（Toxicokinetics, TK, 包括物种特异性代谢）特征，毒性效应特征，结构-活性关系，体外代谢过程，已有毒性研究结果和结构类似物等，对于决定受试物的暴露途径、溶媒选择、实验动物种属选择、剂量选择等具有重要意义。

参考先前剂量探索研究中的 TK 数据对于选择剂量水平和解释结果非常有用。包括：

- （1） 已经明确的关于发育中胎儿和幼仔暴露于受试物或其相关代谢产物的资料；
- （2） 提供的体内剂量估计值；
- （3） 对潜在的剂量依赖性饱和和动力学过程的评估资料。

如果有其他的 TK 数据，如代谢物谱、浓度-时间曲线等，也应予以考虑。总的来说，对于设计扩展一代生殖发育毒性试验具有重要参考价值的 TK 数据来源如下：

- （1） 妊娠晚期（例如 GD20）母体和胎儿血样；
- （2） 哺乳中期（例如 PND10）母体和幼仔血样或乳汁；
- （3） 离乳早期（离乳 PND28）离乳血样。

参考 TK 数据时，应灵活分析。需注意数据是来自受试物原物还是代谢产物，基于多少个采样点得出，其暴露途径如何等。

9. 剂量和分组

9.1 常规剂量设计

通常情况下，设置 3 个剂量组和 1 个溶媒对照组较为合适。剂量水平的选择应参考已有毒理资料，如非妊娠动物的 TK 数据，受试物的血乳屏障透过率，人体暴露估计等。在有 TK 数据的情况下，若受试物具有剂量依赖性饱和特征且人的暴露量远低于此，那么所选高剂量应避免出现饱和，比较合适的高剂量应为向非线性转变的拐点。在缺乏 TK 数据支持的情况下，剂量水平的选择应基于受试物的毒性，如高剂量应产生一定程度的全身毒性，但不致死或造成动物严重的痛苦。

在高剂量以下按等比关系设置中低剂量，低剂量应能够确定 NOAEL 或可以用于推导基准剂量（Bench mark dose, BMD）。为避免 NOAELs 和 LOAELs 间距过宽，2-4 倍的剂量间距较为合适，不宜采用过大的间距，如拟设间距超过 10，则应采用增加剂量组的方法以降低间距。

若有溶媒对照，溶媒对照应采用受试物处理组用到的最大体积作为本组动物的给予体积。

9.2 限制剂量试验

人的可能暴露水平低于 1000 mg/kg 是开展限制剂量试验的前提条件。在重复剂量毒性试验中低于 1000 mg/kg 的情况下无毒性表征，或者无结构或代谢类似物的相关资料，那么仅设计 1000 mg/kg 的单剂量水平已足够。若在此剂量水平观察到生殖发育毒性，则需要更低剂量水平确定 NOAEL。

10. 试验内容

10.1 试验步骤

F0 的雌雄动物均应于交配前 2 周开始接受受试物处理，并一直持续至子一代（F1）离乳。其中，用于评价精子活力、睾丸和附睾组织病理变化的 F0 雄性动物应至少保证 10 周的暴露期。（流程见附图）

F1 代动物一般情况下在离乳时接受受试物处理，但是如果有资料显示受试物具有较差的血乳屏障透过率或不能明确受试物是否能透过血乳屏障，则应考虑在哺乳期直接对 F1 代动物进行受试物处理并一直持续至解剖。F1 代动物在离乳时（PND21）随机从每窝选取一雌一雄用于初步评估 F1 的生殖系统毒性和全身毒性（序列 1A）。在满足触发条件的情况下，需要额外选取 F1 开展其它子代潜在毒性测试，如：潜在生殖毒性的追加评价（1B）、潜在神经发育毒性（2A&2B）、潜在发育免疫毒性（3）。

序列 1A 用于初步评估 F1 生殖系统和全身毒性，每窝一雌一雄；

序列 1B 在需要开展进一步生殖毒性研究时，交配产生 F2 以在受试物具有疑似生殖或内分泌毒性的情况下，或当队列 1A 的结果不明确时，获得额外的组织病理学数据，每窝一雌一雄。

序列 2A 用于神经行为学及神经组织病理研究，每窝一雌一雄；

序列 2B 用于离乳时的神经组织病理研究，每窝一雌一雄；

序列 3 用于发育免疫毒性研究，每窝一雌一雄。

试验流程见附图。以上序列中 1A 为必选，其余序列均有对应的触发条件，具体见附表。

10.2 交配

同剂量组的雌雄大鼠按 1:1 进行交配，交配最多持续 2 周。通过在早晨检查阴栓或阴道涂片来确定交配成功与否，一旦确定交配成功的雌性应单独饲养，并把发现交配成功的当天定为妊娠第 0 天（G0）。如若交配不成功，应选择同组已成功交配的其他雄性继续交配，配对信息应准确记录。

在离乳动物中，从每窝选取至少一雌一雄在性成熟后进行交配且交配应在同组不同窝间开展。F1 的选取应遵循随机原则，但体重不应低于每窝平均体重两个标准差。

通常情况下不推荐进行二次交配，因为二次交配将丢失着床信息。但是，如出现受试物相关的窝产仔数变化或第一次交配中观察到可疑的结果，仍建议 F0 或 F1 再次交配。同时，也建议将未成功怀孕的雌性动物与能正常生育的雄性进行二次交配，以确证雌性生育力。二次交配的时间应选在最后一胎离乳后大约一周左右。

10.3 窝的标准化

在出生后第 4 天，通过随机选择调整窝的大小，尽可能达到每窝每性别 5 只，若难以达到，做部分调整也可接受（例如：4 只雌性和 6 只雄性）。窝的标准化应注意不以体重及肛殖距（AGD）为依据。

10.4 临床观察

每天至少 1 次临床观察，观察的时机应考虑与血浆峰浓度相关的毒性症状出现的时间，观察内容包括但不限于行为改变，难产或分娩时间过长，妊娠天数及其它毒性症状。离乳后，每周至少 1 次更为详细的临床观察可在称重时进行，观察内容包括但不限于：皮肤、毛发、眼睛、粘膜的变化，分泌、排泄的发生以及自主活动情况，步态、姿势、对外界刺激的反应，是否有痉挛、肌肉强直，刻板症等。每天至少 2 次的笼旁观察主要观察动物严重的毒性反应、患病和死亡。

出生当天，尽快进行检查幼仔的数量、性别、存活与否以及是否存在明显外观异常（包括腭裂、皮下出血、皮肤颜色或质地异常、脐带存在与否、腹部奶斑、是否存在干结分泌物）。此外，新生幼仔的初次临床检查应包括体温、活动状态和对刺激的反应。对死亡幼仔应检查可能存在的缺陷和死亡原因。

存活幼仔在 PND0 到 PND4 期间测量一次肛殖距 (AGD) 并定期测量体重, 至少应在 PND0 (PND1)、PND4、PND7、PND14、PND21 各测量 1 次。肛殖距的测量最好选在体重测量的同一天进行, 以减少对幼仔的影响, 同时用肛殖距除以体重立方根以标准化该数据。PND12 或 PND13 检查幼仔是否出现乳头或乳晕。

从 PND0 (PND1) 开始, 每天至少 1 次临床观察, 观察的时机应考虑与血药峰浓度相关的毒性症状出现的时间, 观察内容包括但不限于行为改变, 难产或分娩时间过长, 其它毒性症状。离乳后, 每周至少 1 次更为详细的临床观察可在称重时进行, 观察内容包括但不限于: 皮肤、毛发、眼睛、粘膜的变化, 分泌、排泄的发生以及自主活动情况, 步态、姿势、对外界刺激的反应, 是否有痉挛、肌肉强直, 刻板症等。每天至少 2 次的笼旁观察主要观察动物严重的毒性反应、患病和死亡。

所有选入序列的 F1 动物应观察其包皮龟头分离和阴道口张开的日期, 通过时间长短比较性成熟是否提前, 同时结合年龄和体重分析, 以反映 F1 身体发育与性成熟是否相称。动物成长过程中观察到的任何的生殖器官异常均应被记录。

10.5 体重、摄食及饮水测量

首次给予受试物当天和最终解剖前应称重一次, 试验期间每周称重一次。需注意的是, 哺乳期的雌性动物称重应与子代称重安排在同一天, 其中 PND4 亲代可以不称重。试验期间, 每周称重当天测量食物消耗, 若通过饮水给予受试物则还应测量饮水消耗, 但动物合笼期间可以不测量。

离乳当天称重 (PND21) 所有存活 F1, 之后分别在 PND4、PND7、PND14、PND21 称重, 其中几个重要节点均需称重, 包括雄性包皮龟头分离、雌性阴道口张开及解剖当日。试验期间, 每周称重当天测量食物消耗。若通过饮水给予受试物则还应测量饮水消耗, 但动物合笼期间可以不测量。

10.6 动情周期

动情周期通过阴道涂片反映。若在接受受试物处理前经过动情周期的筛查, 则从接受受试物处理开始直至确认交配成功或交配期结束每日检查阴道涂片, 但是, 如果可能存在非特异性影响 (如急性应激或摄食减少), 则可将首次受试物处理前移 2 周。需要注意的是, 若雌性首次受试物处理前移 2 周, 则雄性也相应的需要前移 2 周。

1A 序列的雌性动物从阴道口张开后开始观察阴道涂片, 直至阴道涂片中观察到角化上皮为止, 以记录整个时间段长度。另外, 为监测动情周期, 从 PND 75 左右开始进行为期两周的阴道涂片观察。1B 序列的雌性动物在需要交配以产生 F2 的情况下, 从交配期开始, 直到发现交配成功或 2 周的交配期结束为止也需要持续观察阴道涂片以监测动情周期。

10.7 血液学及血生化

解剖前 1 天开始禁食，至解剖时禁食约 16 hr。推荐采用麻醉后放血的安乐死方法，以便采集血样检测相关指标。动物麻醉后从腹主动脉进针采血，各组至少随机选取 10 份（雌雄各半）血样分别用于血液学（至少包括：红细胞压积，血红蛋白浓度，红细胞计数，总白细胞计数和白细胞分类计数，血小板计数和凝血时间/趋势）、血生化（至少应包括：葡萄糖、总胆固醇、尿素、肌酐、总蛋白、白蛋白和至少两种肝功能酶（如丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、谷氨酰转肽酶和山梨醇脱氢酶）及甲状腺素/促甲状腺素（T4/TSH）分析，剩余血样经适当的处理后可予以保存，以便在需要对相关结果进行确证时可以再次检测。若已知受试物能诱导血液其它相关改变，也可以增加考察内容。若需要进行第二次交配，血样采集应安排在交配前进行。

10.8 尿液分析

在解剖前收集尿液或在解剖时从膀胱收集尿液分析，具体参数包括：尿量、颜色、透明度、渗透性、比重、pH 值、蛋白质、葡萄糖、隐血、血细胞、细胞碎片。除检测以上参数外，收集的尿液也可用于分析受试物的代谢和排泄。若重复毒性研究中已明确受试物不改变尿液参数，则可以不分析尿液。

10.9 精子参数

所有雄性均应检测精子参数，但是有 90 天的研究资料表明受试物对精子参数无影响，则可以免除检测。解剖时，将附睾称重后，一侧附睾留作组织病理检查，从另一侧附睾的尾部取精子样本用于精子计数、精子活力及形态分析。其中，用于精子形态分析的样本可以是湿样本，也可以是固定样本。精子形态分析应至少观察 200 个精子，将其分为正常（头、颈、尾均正常）和异常（头部融合、断头、头部异形、尾部异形）。

所有 1A 序列的雄性 F1 均应检测精子参数。解剖时，附睾称重后，一侧附睾留作组织病理检查，从另一侧附睾的尾部取精子样本用于精子计数、精子活力及形态分析。其中，用于精子形态分析的样本可以是湿样本，也可以是固定样本。精子形态分析应至少观察 200 个精子，将其分为正常（头、颈、尾均正常）和异常（头部融合、断头、头部异形、尾部异形）。

若拟分析精子样本来自于解剖时及时冻存的样本或固定后的涂片，抑或直接采用精子分析仪等计算机辅助系统及时采集样本图像分析，那么精子参数的分析可仅限于高剂量组和对照组，仅在受试物相关性时拓展至更低的剂量组。

10.10 解剖及病理

F0 称重并安乐死后，摘取以下脏器并称重：

子宫（含输卵管和子宫颈）、卵巢；

睾丸、附睾（整个）；

前列腺（包含背外侧、复侧部）；

精囊腺和凝固腺；

跟给药途径相关淋巴结和远端淋巴结；

脑、肝、肾、心、脾、胸腺、垂体、甲状腺（固定后）、肾上腺及其它已知毒性靶器官或组织。

此外，不需称重但需要保存的组织脏器包括：外周神经、肌肉、脊髓、眼及视神经、胃肠道、膀胱、肺、气管（含甲状腺和甲状旁腺）、骨髓、输精管、乳腺（雌雄均需保存）、阴道。

高剂量组和对照组动物以上所列组织脏器应开展的完整组织病理学检查。当观察到受试物相关变化时，应将组织病理检查拓展至更低剂量组。此外，在试验中交配不成功，未孕，后代异常，动情周期异常，精子计数、活力或形态异常动物的生殖器官均需进行组织病理学检查。

序列 1A 动物应在性成熟后解剖。解剖前，安乐死并称重所有动物，摘取以下脏器并称重：

子宫（含输卵管和子宫颈）、卵巢；

睾丸、附睾（整个）；

前列腺（包含背外侧、复侧部）；

精囊腺和凝固腺；

跟给药途径相关淋巴结和远端淋巴结；

脑、肝、肾、心、脾、胸腺、垂体、甲状腺（固定后）、肾上腺及其它已知毒性靶器官或组织。

此外，不需称重但需要保存的组织脏器包括：外周神经、肌肉、脊髓、眼及视神经、胃肠道、膀胱、肺、气管（含甲状腺和甲状旁腺）、骨髓、输精管、乳腺（雌雄均需保存）、阴道。

以上所列所有 1A 组织脏器均需做组织病理检查。

对照组和各剂量组的淋巴结、骨髓、胸腺、脾脏（一半用以组织病理，一半用于淋巴细胞亚群分析，包括 CD4+/CD8+T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、自然杀伤细胞）、肾上腺，雄性的睾丸、附睾（至少一侧）和雌性的卵巢均需做组织病理学检查，除此之外的其它脏器和组织仅需在高剂量和对照组做组织病理学检查。对于有受试物相关改变或肉眼可见损伤的组织/脏器应在中、低剂量中继续观察，以确定 NOAEL。F1 雌性卵巢的组织病理评价应包含对原始卵泡、生长卵泡和黄体的定量分析，并且应先在对照组和高剂量进行，如果高剂量组表现出不良反应则应继续观察中低剂量组。F1 雄性睾丸的组织病理学检查应包含对睾丸分化、发育和精子发生的评价。可能的情况下，可以检查睾丸网，附睾头、体、尾及输精管的发育及亲代雄性检查中包含的其它参数。

序列 1B 动物的以下脏器应称重，并制成蜡块：

阴道（不称重）；

子宫带子宫颈；

卵巢；
睾丸（至少一侧制成蜡块）；
附睾；
精囊腺和凝固腺；
前列腺；
垂体；
已明确的其它靶器官。

当序列 1A 结果可疑或怀疑有生殖或内分泌毒性时，以上蜡块应制成切片并开展组织病理评价。

10.11 潜在生殖毒性的追加评价

当序列 1B 满足触发条件后，需交配以产生 F2。序列 1B 动物持续处理至 PND 90 以后，可以选择同一剂量组不同窝的雌雄动物合笼 2 周以产生 F2 代。合笼时间应在从 PND90 开始，最迟不晚于 PND120，合笼程序与 F0 相似。所产生的 F2 在 PND4 终止已足够用以分析潜在的生殖毒性，而不一定非得持续至离乳或离乳后。

10.12 潜在的神经发育毒性

当序列 2A 和 2B 被触发后，可在离乳后至成年前分阶段开展以下试验内容。

在 PND24 天左右（±1 天），2A 序列所有动物进行听觉惊吓试验。测试期间，保证测试条件稳定，并将受试物组和对照组交叉进行。所有检测动物均需测试 50 次，10 次测试为一组数据，每只动物共 5 组数据，记录每组测试动物平均反应振幅。

在 PND63 至 PND75 期间，2A 序列所有动物进行功能组合测试，观察内容如下表：

表 1 功能组合测试内容

观察项目	检测指标
笼内或开放场地 观察	姿势、阵挛、强直、眼睑闭合、竖毛、流涎、流泪、发声、犬坐、步态异常、唤醒反射、刻板症、特异行为、被毛污秽、呼吸异常。
自主控制	易于挣脱、易于保定、肌张力、趋向反射、触感反射、听觉反射、夹尾反射、反正反射、着地姿势、前肢握力、后肢握力。
生理指标	体温、体重、瞳孔反射、瞳孔大小。

可以采用自动生理遥测系统对动物的运动活动进行测试，但需要注意选择好基线值以准确区分活动度增加或降低。

2A 和 2B 在完成行为学评价之后（PND75 之后不超过 PND90）和 PND21（或 PND22），解剖后取脑和疑似靶器官，其中脑需称重。所有的对照组和高剂量组的上述组织应开展完全的组织病理检查，当在高剂量组发现有受试物相关改变时，应继续检查中低剂量组。脑组织的

检查应包含嗅球、大脑皮层、海马、基底神经节、丘脑、下丘脑、中脑(顶盖、被盖和大脑脚)、脑干和小脑,序列 2A 还应检查眼(视网膜和视神经)、周围神经、肌肉和脊髓。推荐以上每个脑区至少准备 3 个连续切面并从中选出最同源的进行评价,最好能做定量分析,如用立体定位分析特定脑区的体积或细胞数量。序列 2A 动物脑组织要求灌注固定,2B 动物则可选择灌注固定,且序列 2 动物数量不足时应优先保证 2A。虽然要求每组全部动物脑组织均需取材进行组织病理评价,不过数量偏少也可接受,但最少不应低于 6 只/性别/组。

未纳入序列的动物如无进一步研究需求,在 PND22 天全部解剖,经大体观察后按序列 1A 要求称重及保存相关组织脏器。尽可能从较多的窝中选出至少 10 只/性别/窝的幼仔,称重脑、脾、胸腺后固定保存。观察到大体异常的组织或脏器、靶组织以及乳腺应保存并进行组织病理检查。

10.13 潜在发育免疫毒性评价

当序列 3 被触发后,在 PND56 (± 3) 天时,将动物用于 T 细胞依赖性抗原(可以选择绵羊红细胞或钥孔戚血蓝蛋白)抗体反应(TDAR)检测。具体可采用抗体生成细胞检测或 IgM 抗体检测,具体方法如下:

抗体生成细胞检测:通过腹腔注射绵羊红细胞(SRBC),于 4 天后取脾脏制成细胞悬液与一定量的 SRBC 混合,在补体的参与下,使分泌抗体的脾细胞周围的 SRBC 溶解,形成肉眼可见的空斑,该空斑可以反映抗体生成细胞数。通过按时间变量设置亚组的方式可以更容易检测到峰值,但需保证同一亚组内包含不同组别相同数量的雄性和雌性动物,且日龄一致。

特异性 IgM 抗体检测:腹腔注射 SRBC 或钥孔戚血蓝蛋白(KLH)5 天后,用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测血清中的特异性 IgM 抗体效价。

11. 数据处理、统计方法及结果评定

11.1 应获得的试验结果

食物消耗,饮水消耗(如有),食物利用率(每克食物增重,合笼和哺乳期除外),通过饲料和饮水给予受试物的还需要计算受试物的摄入;

吸收数据(如有);

F0 动物的体重数据;

所选 F1 仔鼠离乳后体重数据;

试验期间动物死亡时间或动物是否存活至试验结束;

临床症状的性质、严重程度和持续时间(是否可逆);

血液学、尿液和临床生化数据,包括 TSH 和 T4;

脾细胞(T、B、NK 细胞)表型分析;

骨髓细胞;

毒性反应数据;

动情周期正常或异常的 F0、F1 雌鼠数量及周期持续时间；

交配时间（即从开始合笼配对到交配完成的天数）；

生殖方面的毒性或其它效应，包括完成交配、妊娠、分娩和哺乳的动物数量和百分比，如与成功怀孕雌性配对的雄性数量及其百分比，难产、分娩延长或分娩困难的雌性数量及其百分比；

妊娠周期，如有条件也可记录分娩时长；

着床数、窝大小和雄性幼仔百分比；

胚胎着床后丢失、活产和死产的数量和百分比；

窝重（包括窝雄性体重、窝雌性体重及全窝重）和幼仔体重数据，经确认为矮小的幼仔数量；

有明显大体观察异常的幼仔数量；

对子代的毒性或其它效应，包括对产后的生长发育、存活的影响；

幼仔发育里程碑的相关数据及其它产后发育数据；

F1 代动物性成熟数据；

幼仔和成年动物的功能观察数据（如适用）；

安乐死解剖时的体重，F0 和成年 F1 的脏器绝对和相对重量数据；

大体解剖观察结果；

详细描述所有组织病理学发现；

F0 和 F1 附睾尾精子总数，前进运动精子百分比，形态正常和异常精子百分比；

F1 的男性；

F0 和 F1 雌性卵泡数量及其成熟阶段（如适用）；

F1 雌鼠卵巢中黄体计数；

对试验结果进行合适的统计分析。

序列 2 应获得以下试验结果：

所使用的评分观察系统，应详细描述该标准化观察的程序以及操作性定义；

采用的试验方法清单及其使用理由；

详细描述所使用的行为/功能、神经病理学和形态学测量方法，包括自动化设备的相关信息；

需详细描述所用行为学测试仪器的校准方法及如何确保组间和组内测试条件的一致性；

简洁介绍任何涉及专业判断的理由；

详细描述所有行为/功能、神经病理和形态学测量结果，按性别和剂量分组，包括与对照组相比增加还是减少；

脑重；

任何被认为源于神经系统的症状和损伤，包括自发或条件致病；

观察到异常的标本的图像资料；

在组织形态学检查中用于评估切面同源性的低倍图片；
结果的统计分析，包括统计方法以及结果，无论结果是否显著；
按性别和剂量组分析任何其他毒性作用与受试物的神经毒性具有的潜在关系；
任何毒代动力学信息对结论的影响；
试验方法可靠性和灵敏度的支持数据（例如：阳性及历史对照数据）；
神经病理和功能效应之间的关系（如有）；
按性别和剂量组分别确定母体动物和子代的 NOAEL 和基准剂量；
对试验结果的总体解释加以讨论，包括明确受试物是否引起神经发育毒性并给出相应的 NOAEL。

序列 3 应获得以下试验结果：

血清 IgM 抗体滴度（对 SRBC 或 KLH 的致敏性），或脾 IgM 抗体滴度和空斑形成细胞（PFC）计数（对 SRBC 致敏性）；

TDAR 试验应在试验前进行方法验证，首次开展该项试验应设置阳性对照组，若两次试验间隔超过一年应设置阳性对照组，若两次试验间隔不足一年则无需设置阳性对照；

对试验结果的总体解释加以讨论，包括受试物是否引起发育免疫毒性并给出相应的 NOAEL。

11.2 数据的总结和评定

数据以报告附件的形式用表格汇总。报告中应包含以下内容：

试验开始时的动物数量；

试验中发现死亡或因人道原因处死的动物数量、时间；

可生育的动物数量；

怀孕的雌性动物数量；

分娩雌性动物数量；

出现毒性反应动物数量；

毒性反应的描述、发病时间、持续时间和严重程度。

数据应采用合适的、可接受的统计方法进行评估。应适当处理非正态数据（如计数数据）、删失数据（如有限的观察时间）、非独立性数据（如窝效应和重复测量）和方差不齐。报告中应包含具体的统计分析方法和用于统计分析的软件信息。

根据试验中观察到的结果（包括大体观察结果和显微镜检查结果）评价受试物的生殖发育毒性效应。包括是否存在剂量相关的异常、病变发生率和严重程度变化。此外，还包括靶器官、生育力、临床异常、生殖和产仔性能、体重变化、死亡率以及其他任何毒性和发育影响。需特别注意性别特异性变化。为了准确评价受试物的影响，也可以结合受试物的理化性质，以及 TK 数据（包括胎盘透过和乳汁排泄）进行分析。

12. 结果解释

扩展一代生殖发育毒性研究资料可以提供受试物在生殖周期所有阶段重复暴露的影响。尤其是提供了有关生殖系统以及子代最长至 PND90 的生长发育、存活情况及功能终点的信息。该研究的结果应结合受试物相关资料分析，包括物化特性、TK 和毒性效应特征，其它相关信息，如结构类似物毒性资料，该受试物已有的毒理研究资料（例如急性毒性、重复剂量毒性、毒理机制研究以及关于种属特异性的定量及定性体内外代谢特征研究）。

大体解剖和脏器重量结果可以与其他重复剂量毒性研究结果相结合进行评估。子代生长的迟缓可能与受试物对乳汁成分影响有关。

对序列 2 的解释：

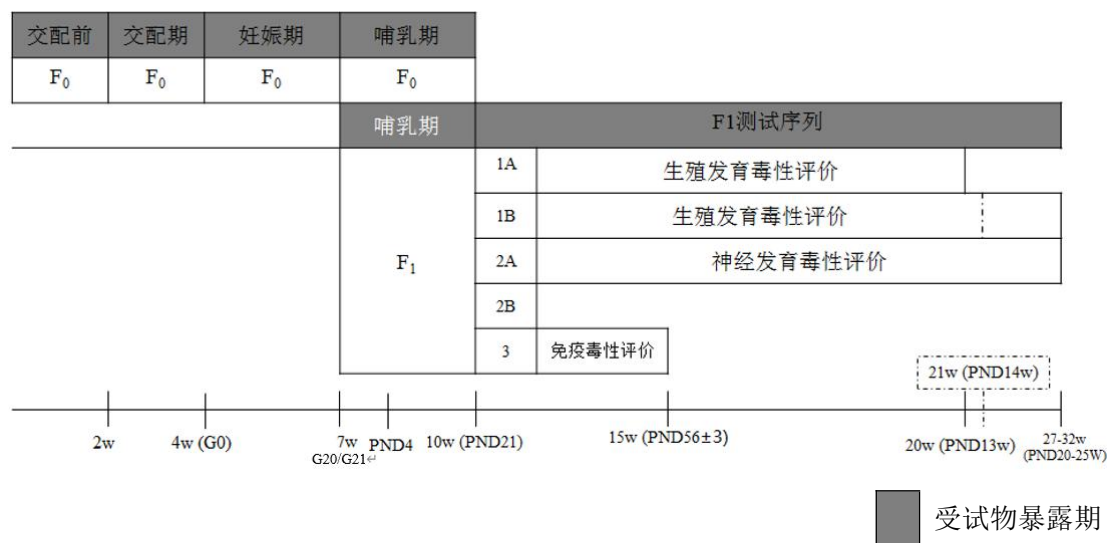
神经行为和神经病理学结果应放在整个研究中解释，使用证据权重法有利于做出更专业的判断。若发现行为模式或形态学改变，应在剂量-反应关系中探讨。对神经发育毒性的评估，可以援引包括人类流行病学研究或病例报告，以及实验动物研究资料（如毒代动力学数据，结构-活性信息，其他毒性研究的数据）加以解释。对数据的评价应包括对生物学和统计学意义的讨论。若观察到神经病理改变和行为模式改变，那么应讨论二者之间的关系。

对序列 3 的解释：

通过 TDAR 评估免疫功能的抑制或增强应放在整个研究中解释。TDAR 结果的显著性可以通过其它免疫相关指标予以支持（例如，骨髓细胞，淋巴组织重量及组织病理形态，淋巴细胞亚群分布）。

若其它毒性仅在更低剂量水平观察到，那么 TDAR 产生的效应可能意义不大。

附图



扩展的一代生殖发育毒性试验流程图

附表

序列编号	触发指标	触发条件
序列 1B ^a	亲代生育力改变 (着床数、妊娠率、 妊娠期长短)	生殖系统的组织病理学结果并未出现生物学相关 或剂量相关的改变。
	F ₁ 动情周期改变	虽然出现生物学相关或剂量相关的动情周期改变 但未见严重的母体毒性。 ^b
	F ₁ 窝大小的降低	在缺乏母体毒性或母体致死的情况下，出现了生物 学相关或剂量相关的窝大小降低。 ^b
	F ₁ 发育节点的改变 (AGD、乳头数目、 进入青春期、PPS、 VO)	在无体重变化介导的情况下，左侧参数出现生物学 相关或剂量相关效应。
	产后 F ₁ 幼仔存活 率降低	在缺乏严重母体毒性的情况下，出现左侧参数的变 化。 ^b
	F ₁ 幼仔出现畸形	在缺乏严重母体毒性的情况下，出现左侧参数的变 化。 ^b
	F ₁ 幼仔出生存活率 降低	在缺乏严重母体毒性的情况下，出现左侧参数的变 化。 ^b

序列编号	触发指标	触发条件
	F ₁ 幼仔体重降低	幼仔出现生物学相关或剂量相关的体重降低并不伴有母体动物体重的持续递减。
序列 2A&2B ^c		经确证具有干扰内分泌机制的活性
		构效关系分析或化学分类上具有神经毒性
		经确证具有干扰内分泌机制的活性
		经确证具有神经行为毒性
		在成年动物或人具有功能或形态上的神经毒性
	翻正反射	可致翻正反射降低
	甲状腺脏器重量和病理	可致甲状腺重量降低或出现相关的病理改变
序列 3 ^c		构效关系分析或化学分类上具有免疫毒性
		经确证具有干扰内分泌机制的活性
		淋巴器官出现脏器重量或病理变化。
		骨髓、脾脏、胸腺、淋巴结细胞成分改变
		白细胞分类计数改变
		在成年动物或人具有功能性免疫毒

a, 所列指标均有充裕时间留给研究人员以判断是否需要进行 F1 代交配, 触发结果为是否产生 F2。

b, 需要考虑母体毒性的类型、发生率及严重程度。

c, 触发结果为是否开展该序列研究。

AGD: 肛殖距; PPS: 包皮龟头分离; VO: 阴道张开。

“■”标示的触发条件为外部因素, 即该类数据非来自本次试验, 可源于各种可信资料。

两代生殖发育毒性试验

1. 范围

本规范规定了两代生殖发育毒性试验基本原则，试验方法和技术要求。

本规范用于检测化妆品原料的生殖发育毒性。

2. 试验目的

提供关于受试物产前、产后暴露对雌性、雄性动物生殖功能、生育力及子代发育影响的确切信息。

3. 定义

3.1 生殖毒性（Reproduction toxicity）

对后代产生有害作用，并损伤雄性和雌性的生殖功能和生殖能力。

3.2 发育毒性（Developmental toxicity）

生殖毒性的表现，具体表现为后代在产前、围产期、产后发生的结构和功能紊乱。

3.3 母体毒性（Maternal toxicity）

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、毒性反应、甚至死亡。

3.4 未观察到有害作用剂量（NOAEL）

通过动物试验，以现有的技术手段和检测指标未观察到任何与受试物相关的毒性作用的最大剂量。

3.5 观察到有害作用的最低剂量（LOAEL）

在规定的条件下，受试物引起实验动物组织形态、功能、生长发育等有害效应的最小作用剂量。

4. 试验的基本原则

通过对实验动物以受试物暴露，考察其对雄性和雌性动物生殖功能、生育力及生殖系统形态的影响。若该暴露（直接或间接）持续至子代，则还可以继续考察受试物对子代发育，甚至子代生殖功能和生育力的影响。

5. 受试物配制

化妆品原料一般采用经口、经皮或吸入方式给予受试物，溶媒对照应采用相同的给予途径。若设置阳性对照，其处理方式可以不同于受试物处理组。

一般情况下首选水作为溶媒，可以是水溶液也可以是混悬液，其次可以选择玉米油作为溶媒配制成乳浊液，也可以将其与水混合配制成油溶液。使用水以外的其它溶媒，应阐明其毒性并保证所配制溶液的稳定性。

其它应纳入考虑的因素包括：溶媒是否影响受试物化学特征继而改变受试物毒性；溶媒是否影响受试物的吸收、代谢、分布和蓄积；溶媒是否影响动物食物和饮水摄入继而影响营养状况；溶媒本身是否有潜在毒性。

经口灌胃时，以大鼠为例，水溶性液体的灌胃体积一般不超过 10 mL/kg 体重，最大不超过 20 mL/kg 体重；油溶性液体的灌胃体积不超过 4 mL/kg 体重。

经饲料或饮水给予时，应充分考虑溶媒添加量和动物热量的摄入。若使用溶媒，那么对照组应按受试物组的最高使用量添加；若不使用溶媒，且受试物会造成摄食量或食物利用率的降低，那么可以通过将其饲喂未交配动物作为配对对照组，但是，如有资料表明食物消耗的降低并不影响生殖相关参数，可以不设置配对对照。

经皮给予受试物时，应考虑受试物浓度对皮肤的刺激性。若在既定剂量下的浓度产生较为严重的皮肤刺激性，应将浓度适当降低。当然，这种降低可能也伴随剂量的降低。如果因浓度过高，在早期就出现皮肤严重受损的情况下，应终止试验并选择合适的浓度重新开始。受试物皮肤暴露面积应达到动物全身皮肤的 10%，毒性过高的受试物也可以小于 10%。可以采用纱布和无刺激性胶带将受试物固定在皮肤表面，需要保证每天 6 小时的接触时长，同时也可以采用非保定方式防止动物摄入受试物或弄掉封闭胶带。

经吸入给予受试物时，一般采用气体、蒸汽、气溶胶或以上混合形态进行受试物暴露。吸入受试物所采用的暴露物态应根据其理化性质、拟定浓度和/或其实际应用时的物态加以确定。不论采用头鼻暴露还是全身暴露，均需将气流中的氧气浓度控制在至少 19%，二氧化碳浓度控制在不高于 1%，同时确保受试物浓度稳定。

6. 实验动物和饲养环境

6.1 实验动物选择

首选种属为大鼠，若选择其它种属动物应有合理理由，同时应避免选择生育力低且具有明显发育缺陷的动物种属。所选动物应健康且未经历任何试验，其中雌性动物应为未经产或未孕动物。受试物处理前，动物体重应控制在同性别平均体重的 20% 范围内，若有必要还应基于发情周期筛选动物，将发情周期正常的雌性纳入试验。动物开始交配的周龄在 12-14 周龄较为合适。

6.2 动物数量

应保证每组至少有 20 只怀孕雌性动物，在极端情况下，未能产生足够的怀孕动物时，不表明研究数据无效，需个案分析。雄性动物数量推荐与雌性动物保持一致。

6.3 动物的准备和饲养

动物抵达实验设施后，应有不少于 5 天的环境适应期。饲养环境应符合国标相关要求。动物自由采食和饮水，但应注意饮食中植物雌激素的含量，避免影响某些生殖终点。所用批次饲料留样并适当保存至报告完成，以便在某些情况下进行回溯分析。

动物交配前可以多只动物饲养于一笼，雌性动物交配成功后（检查到阴栓或阴道涂片阳性）应单笼饲养于含垫料的笼具内，其所产 F1 代同笼饲养至离乳。离乳后的 F1 代应按组别、性别分笼饲养，如有合理理由亦可单笼饲养。

7. 暴露途径的选择

推荐采用经口方式（包括饲料、饮水和灌胃），除非其它暴露途径（经皮或吸入）更为合适。

8. 剂量和分组

8.1 常规剂量设计

通常情况下，设置 3 个剂量组和 1 个溶媒对照组。在有毒代动力学（Toxicokinetics, TK）数据的情况下，若受试物具有剂量依赖性饱和特征且人的暴露量远低于此，那么所选高剂量应避免出现饱和，比较合适的高剂量应为向非线性转变的拐点。在缺乏 TK 数据支持的情况下，剂量水平的选择应基于受试物的毒性，如高剂量应产生一定程度的全身毒性，但不致死或造成动物严重的痛苦。通常高剂量组亲代死亡率低于 10% 可以接受。

在高剂量以下按等比关系设置中低剂量，低剂量应能够确定 NOAEL 或可以用于推导基准剂量（Bench mark dose, BMD）。通常 2-4 倍的剂量间距较为合适，不宜采用过大的间距，如拟设间距超过 10，则应采用增加剂量组的方法以降低间距。若通过饲料给予受试物，则剂量间距不应超过 3 倍。

若有溶媒对照，溶媒对照应采用受试物处理组用到的最大体积作为本组动物的给予体积。

8.2 限制剂量试验

人的可能暴露水平低于 1000 mg/kg，是开展限制剂量试验的前提条件。在重复剂量毒性试验中低于 1000 mg/kg 的情况下无毒性表征，或者无结构或代谢类似物的相关资料，那么仅设计 1000 mg/kg 的单剂量水平已足够。若在此剂量水平观察到生殖发育毒性，则需要更低剂量水平确定 NOAEL。

9. 试验内容

9.1 试验步骤

F0 大鼠从 5 到 9 周龄开始连续给予受试物。雌性通常持续暴露至 F1 代离乳，雄性在无需进行其它生殖效应评价后可以人道处死，但是，所有 F0 代动物均应保证交配前共计 10 周，交配期共计 2 周的受试物暴露期。（流程见附图）

F1 离乳时，从每窝选择一雌一雄用于交配，自离乳开始每日给予受试物，若暴露途径为饮水或食物，则其实际暴露可能始于哺乳期。交配期前连续暴露至少 10 周，并在交配期仍持续暴露 2 周，一直持续至 F2 代离乳（流程见附图）。不用于交配的 F1 和所有 F2 均于离乳时人道处死，并从每窝分别选取一雌一雄用于大体解剖观察。

9.2 交配

同剂量组的雌雄大鼠按 1:1 进行交配，交配最多持续 2 周。通过在早晨检查阴栓或阴道涂片来确定交配成功与否，一旦确定交配成功的雌性应单独饲养，并把发现交配成功的当天定为妊娠第 0 天（G0）。如若交配不成功，应选择同组已成功交配的其他雄性继续交配，配对信息应准确记录。

在离乳动物中，从每窝选取至少一雌一雄在性成熟后进行交配且交配应在同组不同窝间开展。F1 的选取应遵循随机原则，但体重不应低于每窝平均体重两个标准差。

通常情况下不推荐进行二次交配，因为二次交配将不得不失去着床信息。但是，如出现受试物相关的窝产仔数变化或第一次交配中观察到可疑的结果，仍建议 F0 或 F1 再次交配。同时，也建议将未成功怀孕的雌性动物与能正常生育的雄性进行二次交配，以确证雌性生育力。二次交配的时间应选在最后一胎离乳后大约一周左右。

9.3 窝的标准化

在出生后第 4 天，通过随机选择调整窝的大小，尽可能达到每窝每性别 5 只，若难以达到，做部分调整也可接受（例如：4 只雌性和 6 只雄性）。窝的标准化不宜以体重及肛殖距（AGD）为依据。

9.4 临床观察

每天应进行一般临床观察，在灌胃给药的情况下，其观察时间点应考虑到给药后预期的毒性效应高峰时期。观察并记录行为改变、难产或长时间分娩以及所有毒性症状。更详细的临床观察至少每周一次，可以在给动物称重时进行。每天两次笼旁观察，观察内容包括严重的毒性反应、发病率和死亡率。

每天应进行一般临床观察，在灌胃给药的情况下，其观察时间点应考虑到给药后预期的效果高峰时期，观察 F1 和 F2 是否有行为改变，是否有外观异常，是否出现毒性症状。此外，F1 还应观察是否难产或长时间分娩。更详细的临床观察至少每周一次，可以在给动物称重时进行。每天两次笼旁观察，观察内容包括严重的毒性反应、发病率和死亡率。

在分娩后（LD0）应尽快检查每窝幼仔，以确定幼仔的数量和性别、存活与否以及是否存在明显外观异常。在第 0 天发现死亡的幼仔，如果不是浸软胎，建议检查可能存在缺陷和

/或死亡原因，并将其保存。子代其它额外的发育信息，如睁眼，耳廓分离，萌牙，出毛的发生时间可以结合性成熟数据分析，如阴道口张开及包皮龟头分离时的日龄和体重。如果没有单独的功能观察组合试验，那么在 F1（非交配用）离乳前后可以观察运动能力，感觉功能，个体反射（出现明显的发育异常时可以不开展功能观察组合试验）。若 F1 的性别比或性成熟时间出现受试物相关改变后，则需在 PND0 测量 F2 的肛殖距。

9.5 体重、摄食及饮水

亲代动物（F0 和 F1）受试物处理第一天应称体重，此后至少每周称一次。其中，雌性应在妊娠第 0 天、第 7 天、第 14 天和第 20 天（或第 21 天），以及解剖当天称重，哺乳期与幼仔同一天称量，但哺乳期第 4 天可以不称重。

子代在哺乳期第 0 天、第 4 天、第 7 天、第 14 天和第 21 天及解剖当天称重。

交配前和妊娠期间，每周至少测量一次食物消耗量。如果受试物经饮水给予，则至少每周测量一次饮水。

9.6 动情周期

交配前和交配期间通过阴道涂片进行雌性动情周期的评估，直到确认交配成功。在制作阴道涂片时，应注意避免过度刺激粘膜从而诱导假孕。

9.7 精子参数

解剖时，称重睾丸和附睾，至少保留一侧用于组织病理学检查。每组至少 10 只雄性的睾丸和附睾分别用于超声匀浆耐受精子细胞头部计数和附睾尾精子计数。用于精子计数的附睾，还可以用于评估精子活力和精子形态，也可另外从输精管采集精子用于以上分析。其中，用于精子形态分析的样本可以是湿样本，也可以是固定样本。精子形态分析应至少观察 200 个精子，异常精子形态包括头部融合、断头、头部异形、尾部异形。

若拟分析精子样本来自于解剖时及时冻存的样本或固定后的涂片，抑或直接采用精子分析仪等计算机辅助系统及时采集样本图像分析，那么精子参数的分析可仅限于高剂量组和对照组，在有受试物相关性时需扩展至更低的剂量组。

9.8 解剖与病理

F0 在解剖当日早上完成体重测量后，制作雌鼠阴道涂片以确定动情周期，便于结合卵巢的组织病理结果分析。解剖时大体观察所有组织脏器，尤其应重点关注生殖系统，并记录所有大体观察异常情况和子宫着床痕数量。以下脏器在完成肉眼观察后应称重，成对的脏器需单独称重。

子宫、卵巢；

睾丸、附睾（整体和尾部）；

前列腺；

精囊腺、凝固腺及其分泌物（整体称重）；

脑、肝、肾、脾、垂体、甲状腺和肾上腺及已知靶器官。

所保存的脏器中，需要开展组织病理检查的脏器包括：

阴道、子宫（含宫颈）、卵巢；

睾丸、附睾、前列腺、精囊腺、凝固腺；

已明确的靶器官；

通常先在对照组和高剂量组开展组织病理检查，若发现受试物相关改变可继续检查其它剂量组。此外，疑似生育力降低的情况（未交配成功、未孕、未正常分娩、产生非健康后代、动情周期异常、精子参数改变等）需要对生殖系统进行组织病理检查，大体解剖肉眼观察异常的组织脏器也应进行组织病理检查。

睾丸的组织病理检查建议关注是否有精子滞留，上皮形态及细胞层数是否改变，是否有多个核巨细胞的形成，管腔内是否有脱落上皮。附睾的检查应包含完整的头、体、尾纵切面。建议关注是否有白细胞浸润，管腔内是否有异常形态的精子细胞，是否发生巨噬细胞的吞噬现象。

卵巢的组织病理检查则主要采用定量的方法以检测原始卵泡是否减少，也可以结合初级卵泡进行比较。定量分析时，应保证每组至少 10 只动物，同时还要考虑连续切片抽取间距及切片厚度等因素。

需要解剖并大体观察的子代包括：

F2 离乳时每窝随机挑选的一雌一雄及其亲代 F1；

F1 离乳时每窝随机挑选的非交配用一雌一雄；

所有临床观察异常或外观异常的子代；

濒死状态人道处死的幼仔；

死产幼仔（非浸软胎）。

其中，在濒死状态人道处死的幼仔和死亡幼仔，应检查可能的缺陷和/或死亡原因，并保存。初产雌性子宫应在计数着床痕后固定保存。

需要称重的组织脏器包括：

交配用 F1 子宫、卵巢；

交配用 F1 睾丸、附睾（整体和尾部）；

交配用 F1 前列腺；

交配用 F1 精囊腺、凝固腺及其分泌物（整体称重）；

交配用 F1 脑、肝、肾、脾、垂体、甲状腺和肾上腺及已知靶器官。

此外，离乳时每窝随机选取用于大体解剖观察的一雌一雄仅需称重脑、胸腺和脾脏。

需要做组织病理的子代动物有：

大体解剖观察到异常的动物；

临床观察出现毒性反应的动物；

离乳时每窝随机选取的一雌一雄 F1 和 F2

外观异常的动物；

交配用 F1；

需要做组织病理检查的组织脏器包括：

阴道、子宫（含宫颈）、卵巢；

睾丸、附睾、前列腺、精囊腺、凝固腺；

大体解剖观察到异常的组织脏器；

已明确的靶器官。

通常先在对照组和高剂量组开展组织病理检查，若发现受试物相关改变可继续检查其它剂量组。此外，疑似生育力降低的情况（未交配成功、未孕、未正常分娩、产生非健康后代、动情周期异常、精子参数改变等）需要对生殖系统进行组织病理检查，大体解剖肉眼观察异常的组织脏器也应进行组织病理检查。

睾丸的组织病理检查建议关注是否有精子滞留，上皮形态及细胞层数是否改变，是否有多核巨细胞的形成，管腔内是否有脱落上皮。附睾的检查应包含完整的头、体、尾纵切面。建议关注是否有白细胞浸润，管腔内是否有异常形态的精子细胞，是否发生巨噬细胞的吞噬现象。

卵巢的组织病理检查主要关注原始卵泡是否减少，并计数原始卵泡数量，计数必须紧密结合切面的数量、切面间距及受检动物总数。

10. 数据处理、统计方法及结果评定

10.1 应获得的试验结果

食物消耗，饮水消耗（如有），食物利用率（每克食物增重，合笼和哺乳期后期至少三分之一除外），通过饲料和饮水给予受试物的还需要计算受试物的摄入；

吸收数据（如有）；

用于交配的 F0 和 F1 动物的体重数据；

窝体重和幼仔个体体重数据；

安乐死解剖时 F0 的体重、脏器绝对和相对重量数据；

临床症状的性质、严重程度和持续时间（是否可逆）；

试验期间动物死亡时间或动物是否存活至试验结束；

按性别和剂量组别分析毒性反应数据，包括交配、生育、妊娠、出生，存活、哺乳，且报告中体现用于分析的样本量；

在生殖、子代及出生后生长发育等方面有毒性效应或其他效应；

大体解剖观察结果；

详细描述所有组织病理学发现；

F0 和 F1 雌性具有正常动情周期的动物数量及动情周期长度；
F0 和 F1 附睾尾精子总数，前进运动精子百分比，形态正常和异常精子百分比；
交配时间（即从开始合笼配对到交配完成的天数）
妊娠天数；
着床数、黄体数、窝的大小；
活产数和着床后丢失数；
有明显大体观察异常的幼仔数量，经确认为矮小幼仔的动物数量；
幼仔发育里程碑的相关数据及其它产后发育数据，用于评估的发育里程碑事件应合理；
幼仔和成年动物的功能观察数据（如适用）；
对试验结果进行合适的统计分析。

10.2 数据的总结和评定

数据以报告附件的形式用表格汇总。报告中应包含以下内容：

试验开始时的动物数量；
试验中发现死亡或因人道原因处死的动物数量、时间；
可生育的动物数量；
怀孕的雌性动物数量；
分娩雌性动物数量；
出现毒性反应动物数量；
毒性反应的描症状、发病时间、持续时间和严重程度。

数据应采用合适的、可接受的统计方法进行评估。应适当处理非正态数据（如计数数据）、截尾数据（如有限的观察时间）、非独立性数据（如窝效应和重复测量）和不等方差。报告中应包含具体的统计分析方法和用于统计分析的软件信息。

根据试验中观察到的结果（包括大体观察结果和显微镜检查结果）评价受试物的生殖发育毒性效应。包括是否存在剂量相关的异常、病变发生率和严重程度变化。此外，还包括靶器官、生育力、临床异常、生殖和产仔性能、体重变化、死亡率以及其他任何毒性和发育影响。需特别注意性别特异性变化。为了准确评价受试物的影响，也可以结合受试物的理化性质，以及 TK 数据(包括胎盘透过和乳汁排泄)进行分析。

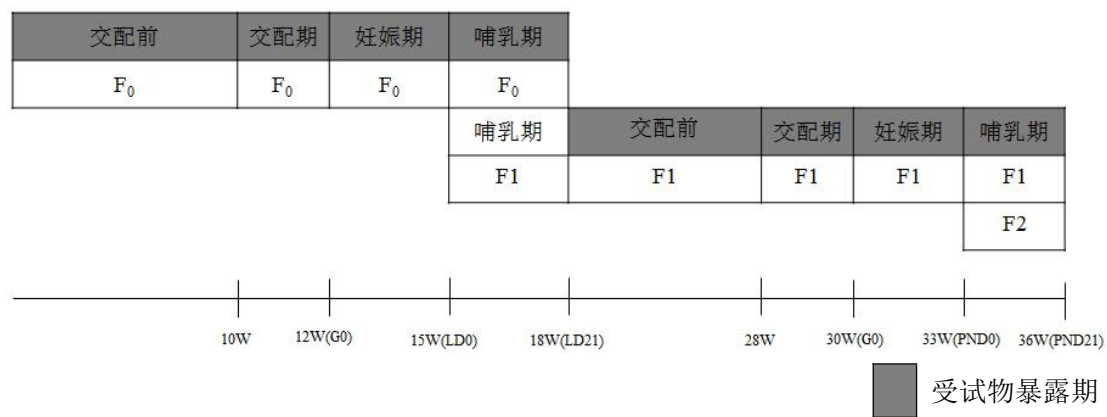
设计合理的生殖毒性试验应能估计 NOAEL 剂量水平，并对受试物在生殖、分娩、哺乳及出生后发育(包括生长和性发育)的不利影响尽可能充分暴露。

11. 结果解释

两代生殖发育毒性研究资料可以提供受试物在生殖周期所有阶段重复暴露的影响。尤其是提供了有关生殖功能及生育力相关参数以及关于后代生长发育和存活情况的信息。该研究的结果应结合亚慢性毒性、产前发育、毒性动力学以及其他现有研究的结果来解释。其结果

有助于评估是否有必要将受试物推进到下一个研究节点。同时，该结果在一定程度上外推至人是有效的，可以用于提供 NOAEL 及人体暴露风险信息。

附图



两代生殖发育毒性试验流程

附件 2

《生殖发育毒性试验技术指导原则 (征求意见稿)》起草说明

为规范开展化妆品和新原料的安全评价工作，根据《化妆品监督管理条例》《化妆品注册备案管理办法》《化妆品注册备案资料管理规定》《化妆品新原料注册备案资料管理规定》及相关法律法规、强制性国家标准和技术规范的要求，中国食品药品检定研究院（以下简称中检院）起草了《生殖发育毒性试验技术指导原则（征求意见稿）》（以下简称《技术指导原则（征求意见稿）》）。现将起草的有关情况说明如下：

一、起草的必要性

2021 年 5 月 1 日，《化妆品监督管理条例》和相关配套法规已正式施行。根据《化妆品新原料注册备案资料管理规定》（此后简称规定）的要求，化妆品新原料注册应提交“新原料安全评估资料”，其中包括毒理学安全性评价资料。同时，《化妆品安全评估技术导则（2021 年版）》中对毒理学资料的要求包含了“生殖发育毒性试验”。由于目前尚未发布《生殖发育毒性试验指导原则》及其试验方法的技术规范，所以，本指导原则及其技术规范起草对于完善毒理学安全性评价资料的相关要求具有积极意义。

二、制定原则

（一）依法依规原则。《技术指导原则（征求意见稿）》遵循依法依规原则，贯彻落实《化妆品监督管理条例》及配套法规文件中关于化妆品和新原料的法规要求，研究生殖发育毒性试验的具体要求，切实为化妆品和新原料的安全评价提供技术指导，也为技术审评以及监管提供依据。

（二）公开透明原则。《技术指导原则（征求意见稿）》起草过程中，坚持“公开透明、广泛参与”原则，充分参考国内外相关法规和技术标准，积极征求监管部门、专家、行业协会意见，同时根据意见反馈情况科学合理地进行修改完善。

三、主要内容

《技术指导原则（征求意见稿）》提供了在做生殖发育毒性试验前需要考虑因素，如受试物的配制，暴露方式，实验动物的选取。在剂量设计方面，也给出了可以参考的已有资料，及如何借用已有资料帮助研究人员设计合适的剂量。本指导原则含有两种目前常用的生殖发育毒性试验研究方法：扩展一代生殖发育毒性试验方法、两代生殖发育毒性试验方法。两种试验方法实验周期不同、所用动物数量不同，需要检测的指标也不尽相同，需要研究人员根据受试物特征、已有的既往资料选择合适的试验方法。

四、需要说明的问题

研究人员应根据受试物具体情况考虑检测指标的合理性。选择扩展一代生殖发育毒性试验时，需要根据内部触发因素及时果断的判断试验的走向，避免犹豫不决导致后续数据的接连丢失。