**扩展一代生殖发育毒性试验**

Extended one-generation reproductive toxicity study

**（征求意见稿）**

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。

1. 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。

1. 定义
	1. 生殖毒性

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。

* 1. 发育毒性

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。

* 1. 神经发育毒性

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。

* 1. 发育免疫毒性

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。

* 1. 母体毒性

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。

* 1. 未见毒性反应剂量（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。

* 1. 最低毒性反应剂量（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。

1. 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。

1. 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。

1. 实验动物和饲养环境
	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。

* 1. 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。

* 1. 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。

1. 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。

1. 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. 已经明确了的关于发育中胎儿和幼崽暴露于受试物及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动饱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。需注意数据是来自前药还是代谢产物，基于多少个采样点得出，其暴露途径如何等。

1. 剂量和分组
	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。

* 1. 限制剂量试验

当人的可能暴露水平低于1000 mg/kg时，可以考虑进行限制剂量试验。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，则需要在更低剂量水平确定NOAEL。

1. 试验内容
	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。

* 1. 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它雄性继续交配，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。

* 1. 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。

* 1. 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、PNF14、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。

* 1. 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。

* 1. 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，直至在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。IB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。

* 1. 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。

* 1. 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。

* 1. 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）。

若分析所用精子样本来自于解剖时及时冻存、固定涂片或精子分析仪等计算机辅助系统及时的图像采集，那么精子参数的分析可仅限于高剂量组和对照组，仅在有受试物相关性时拓展至更低的剂量组。

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，仅在有受试物相关性时拓展至更低的剂量组。

* 1. 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。

* 1. 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。

* 1. 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，称重它们的脑、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。

* 1. 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。

1. 数据处理、统计方法及结果评定

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被杀的动物数量、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）、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。

1. 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**



|  |  |
| --- | --- |
|  | 受试物暴露期 |

图1. 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1Ba | 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。 |
| F1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 |
| F1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 |
| F1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F1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 |
| F1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 |
| F1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 |
| F1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。 |
|  | 经确证具有干扰内分泌机制的活性\* |
| 序列2A&2Bc |  | 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3c |  | 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。

**扩展一代生殖发育毒性试验**

**起草说明**

为加强化妆品的监督管理，进一步提高化妆品使用安全性，中国食品药品检定研究院组织开展了《化妆品生殖发育毒性试验指导原则》方法的研究制定工作。现就工作有关情况说明如下：

1. 起草原则

本指导原则旨在通过合理的实验设计评估化妆品原料的生殖发育毒性。化妆品原料对人的暴露特征为低剂量长期暴露，在设计实验时应考虑该暴露特征，尽可能充分评估生殖发育毒性各试验终点并将各终点的关联性统一在模型中反应出来。基于此，单一全程设计适合用于化妆品生殖发育毒性评估。

1. 起草过程

在本次起草过程中，我们了解了各国（地区）化学品及化妆品原料监管方式，以及安全性评价相关资料的提交要求。我们也学习了各种生殖发育毒性试验方法的应用范围，优点和缺陷。在此基础上，结合我国的化妆品原料监管特征，选择了合适的生殖发育毒性研究方法，形成了目前的《化妆品生殖发育毒性试验指导原则》。

1. 与我国已有相关标准的关系

目前，我国化学品、食品、兽药、农药及医疗器械均参考了OECD系列生殖发育毒性试验指导原则，但各个领域适用情况参差不齐。其中，农药采用两代繁殖毒性试验，兽药采用传统繁殖毒性试验，尚未见扩展一代生殖发育毒性试验。化学品的注册管理方式遵循OECD要求采用分级注册，具体涉及筛选试验、两代生殖发育毒性，并在《常规申报毒理学最低数据要求》中明确可用扩展一代生殖发育毒性试验替代两代生殖发育毒性试验。医疗器械领域则直接引用OECD421、OECD 414、OECD415、OECD416。食品则在保留传统繁殖毒性试验的基础上增加了扩展一代生殖毒性试验和两代生殖毒性试验，略显繁杂。

由此可见，扩展一代生殖发育毒性试验已被广泛应用于各个领域的生殖发育毒性研究，将其用于全面评估化妆品原料的生殖发育毒性具有合理性。

1. 与《规范》中原方法的对比情况

《规范》中尚无该方法相关内容，该部分属于新增内容。

1. 国际相关标准情况

国际上关于生殖发育毒性的研究方法包括药品常用的三段生殖发育毒性研究方法和化学品领域常用的N代生殖发育毒性研究方法。

三段生殖毒性试验方法由FDA于1966针对沙利度胺事件推出，而后经ICH进一步发展已成为世界范围普遍接受用于药品生殖发育毒性研究的方法，但囿于其有限的暴露周期仅适用于关注特定方面的生殖发育终点，例如子代生殖系统的发育毒性就无法被覆盖。

对化学品的生殖发育评估方法最初也是借鉴FDA对药品的试验设计，但其暴露周期过短，试验终点评估不足，因此后来将其暴露周期延长至子代，并根据其研究代数不同，分为一代生殖发育毒性试验方法和两代生殖发育毒性试验方法。由于两代生殖发育毒性试验方法耗费动物数量巨大，且试验周期长，研究工作繁重，因此OECD在2011年出版了扩展一代生殖发育毒性试验方法，该方法在保证提供足够生殖发育毒性资料的同时减少了动物使用的数量。2017年欧盟委员会做出执行决定，同意了欧洲化学品管理局（ECHA）提出的在REACH法规 EC 1907/2006中用扩展一代生殖毒性试验替代两代生殖毒性试验的建议。

目前，欧盟消费者安全科学委员会（Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS）、日本化妆品学会（Japanese Cosmetic Science Society, JCSS）及美国个人护理产品委员会（Personal Care Products Council, PCPC）关于化妆品生殖发育毒性研究方法均推荐OECD系列试验方法，但日本化妆品学会还推荐了ICH试验方法。由此也可以看出化学品生殖发育毒性试验方法的适用并不完全统一。

OECD系列生殖发育毒性试验主要包括如下几个研究方法：筛选试验（OECD TG 421）；一代生殖发育毒性试验（OECD TG415）；两代生殖发育毒性试验（OECD TG 443）；扩展一代生殖发育毒性试验（OECD TG416）。

其中，筛选试验属于筛选信息数据集的组成部分，是OECD对成员国注册高产量化学品安全性评估资料的要求。一代生殖发育毒性试验因其局限性而较少被推荐采用。两代生殖发育毒性试验虽能较为全面的评估生殖发育毒性，但是大量的实验动物耗费面临巨大的动物福利压力。扩展的一代生殖发育毒性试验虽然具有一些优势，但其部分内容尚待完善，且各监管机构对于其替代两代生殖发育毒性试验方法的态度尚不明朗，因此两代生殖发育毒性试验仍是一种主要的可全面评估生殖发育毒性的研究方法。

1. 实验室验证情况

本指导原则属研究性质非检测类，不涉及实验室验证。

1. 其它需说明问题

无。