

YY

中 华 人 民 共 和 国 医 药 行 业 标 准

YY/T 1292.5—XXXX

医疗器械生殖和发育毒性试验

第5部分：扩展的一代生殖毒性试验

Test for reproductive and developmental toxicity of medical devices—
Part 5: Extended one-generation reproductive toxicity study

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家药品监督管理局 发 布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是YY/T 1292《医疗器械生殖和发育毒性试验》的第5部分。YY/T 1292已经发布了以下部分：

- 第1部分：筛选试验；
- 第2部分：胚胎发育毒性试验；
- 第3部分：一代生殖毒性试验；
- 第4部分：两代生殖毒性试验；
- 第5部分：扩展的一代生殖毒性试验。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会（SAC/TC248）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

GB/T 16886.3中给出的检测潜在生殖和发育毒性物质的试验方法均为经济合作与发展组织(OECD)《化学品测试指南》中规定的方法,但这些方法是针对化学品的特性制定而成,同时未给出详细的试验步骤,因此不适宜直接用于医疗器械/材料的检测。

医疗器械/材料的生殖和发育毒性潜能对人类健康有十分重要的影响。特别是针对可吸收性医疗器械或含可沥滤物的医疗器械。GB/T16886.3中推荐下列医疗器械/材料,在缺乏排除生殖和发育毒性风险证据的情况下,应考虑进行生殖和发育毒性试验。

a) 具有可能与生殖系统或胚胎(胎儿)直接长期或永久接触的器械、可吸收或可沥滤物质(如硅胶乳房植入物);

b) 储能医疗器械。

扩展一代生殖毒性试验主要目的是评价特殊生命阶段(其他毒性研究中未包含这一阶段)以及测试出生前后医疗器械/材料暴露可能产生的影响以及妊娠哺乳期雌性及其子代年轻和成年时的全面的系统毒性。

本文件从队列1的生殖发育毒性试验、队列2的神经发育毒性试验、队列3的免疫发育毒性试验详细说明了扩展一代生殖毒性研究的具体实施情况

由于受到试验样品制备以及试验方法确认等方面局限性的影响,在确定进行本试验之前充分考虑GB/T 16886.1的要求。在评价医疗器械使用中引发扩展一代生殖毒性风险的基础上,对进行试验的决定予以论证。

对可吸收性或含可沥滤物质的医疗器械,如果在吸收、代谢和分布研究方面有充分可靠的数据,或者医疗器械浸提液中鉴别出的所有成分均无扩展一代生殖毒性时,对医疗器械进行可接受的生物学风险评估后,如扩展一代生殖毒性的风险已被排除,则无需再进行试验。

医疗器械生殖和发育毒性试验 第5部分：扩展的一代生殖毒性试验

1 范围

本文件给出了医疗器械/材料扩展的一代生殖毒性试验方法。
本文件适用于医疗器械/材料扩展的一代生殖和发育毒性评价。

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/T 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分：动物福利要求

GB/T 16886.3 医疗器械生物学评价 第3部分：遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照样品

3 术语和定义

GB/T 16886.3界定的术语和定义适用于本文件。

4 试验原理

扩展一代生殖毒性试验评价医疗器械/材料对出生前后发育的影响, 以及妊娠哺乳期雌性及其子代年轻和成年时的全面的系统毒性。详细检查重要的发育终点, 比如子代生存力、新生仔鼠健康、出生时发育状态、成年之前的身体和功能发育等有利于确定子代的特定的靶器官。特异的指标如下: 性腺功能, 发情周期, 附睾精子成熟, 交配行为, 受孕, 妊娠, 分娩以及哺乳, 但不局限以上指标, 同时从神经发育毒性和免疫发育毒性评价中获得的信息可评价试验样品对该类系统潜在影响的特征。

5 主要设备

实验室常用设备、生物显微镜、体视显微镜、游标卡尺、动物精子分析仪、多功能酶标仪、血液生化仪器、病理检查仪器

6 试验动物

6.1 总体要求

所有的动物试验均应在经国家认可机构认可的实验室内进行, 并应遵守与试验动物福利有关的全部适用法规, 以符合GB/T 16886.2的要求。这些研究应在良好实验室质量管理规范或其他经批准的质量保证体系的控制下进行。

6.2 动物选择

本文件推荐使用健康、性成熟大鼠。如果使用了其他种属, 宜进行活当的论证。不宜使用低繁育力的种属。宜使用未经试验的健康动物并记录下试验动物的种属、品系, 性别、体重和周龄。

每一试验组和对照组宜包含足够数量的动物以得到20只左右的妊娠动物, 以得出足够数量的妊娠动物和子代, 其目的是保证对试验样品影响亲代(P代)生育、妊娠和母鼠行为以及子一代(F1代)从受孕到成熟期间的生长和发育情况做出有意义的评价。

注: 对于导致不育的试验样品, 这种要求可能不适用。

试验动物的饲养环境温度宜为20℃~26℃,相对湿度为40%~70%,当采用人工照明时,宜按照12 h 照明和12 h 黑暗进行循环。动物可使用常规饲料饲养,不限制饮水。妊娠离性宜单笼饲养并提供舒适的垫料。

7 样品制备

根据 GB/T16886.12 的原则,制备试验样品,只要可能,医疗器械都应在“备用”状态下进行试验。对于储能医疗器械,应以动物全身接触为宜,使用剂量应为与人体生殖器官接触所预期剂量的倍数。

8 试验步骤

8.1 总体要求

应参考现有的毒理数据以及关于试验样品或相关物质的毒代动力学方面的所有信息来选择相应的剂量范围以免造成过度的母体毒性反应。这些信息也可有助于确定剂量的频次。

8.2 最大剂量的确定

以最大耐受剂量或动物模型的生理限量作为动物接触的最大剂量,该剂量应为估计的人体最大接触剂量(以克每千克或平方厘米每千克表示)的倍数。

注:与典型的化学物生殖和发育毒性试验不同,多数材料可能得不出明显的剂量效应关系,对于这些材料,可以考虑采用接触的最大剂量试验来判定是否存在毒性危害,但应对试验所采用的剂量范围提供相应的支持性数据。

8.3 剂量水平的选择

动物按体重随机分组,至少设三个试验组和一个对照组。除非受到理化特性和生物效应的限制,所选的最高剂量应使P代和F1代动物出现明显的毒性反应,但不引起动物死亡;中间剂量可引起轻微的毒性反应;低剂量应不引起任何毒性反应。为了避免未观察到有害作用剂量(NOAE)和最小观察到有害作用剂量(LOAE)之间跨度过大,剂量组间距以2倍或4倍为最佳。如果要设置第4个剂量组,该剂量组的组距则可以很大(如超过10倍)。如果使用介质辅助给予试验样品,对照组应给予最高剂量的该介质。对照组动物除不给予试验样品外,应与试验组动物处理方式相同。

8.4 动物处理

P代雄性(5周龄~9周龄)在适应环境至少5d后每日给予试验样品。大鼠在合笼前持续给予试验样品10周(小鼠为8周)。雄性宜在合笼结束时处死并检查,或继续给予试验样品直到可能的第二次交配并在试验结束前某一时间处死动物。

对于P代雌性动物,在适应环境至少5d后开始给予试验样品并在合笼前持续给予至少2周。宜在3周的合笼期,妊娠期直至F1代断奶期间持续给予试验样品。F1代断乳后,可对P代雌、雄性大鼠进行大体解剖和生殖指标等检测,但需要保证P代雄鼠解剖前试验样品暴露给予时间应不少于10周(至少一个完整的生精过程)。各组断乳后的F1代雌、雄仔鼠,根据检测目的随机分配至该组各评价队列中,并给予试验样品直到相应队列指标完成检测。各评价队列的测定指标的检测时间、使用动物的数量及检测内容等见表1和2。

表 1 扩展的一代生殖毒性试验程序

试验周期	P代（P）	子一代（F1）					子二代（F2） 必要时
试验开始前3～5d	环境适应和检疫观察	—					—
第1～第2周末	给予试验样品	—					—
第3～第4周末	交配（给予试验样品）	—					—
第5～第7周末	妊娠期给予试验样品	—					—
第8～第10周末	哺乳期给予试验样品， 哺乳结束后，如无需其他处理，可处死雌鼠； 雄鼠给予试验样品满足 不少于10周，可处死	出生后4天，每窝调整为10只仔鼠，进行仔鼠生理发育观察。出生后第21天，选定一定数量仔鼠随机分配至各评价队列中，进行生殖毒性、神经毒性和免疫发育毒性等指标检测					—
第11～第20周末	—	1A组	2A组	2B组	3组	1B组	—
		给予试验样品，进行生殖发育毒性评价	给予试验样品，进行神经发育毒性评价；结束后处死，并进行组织病理学检查	出生后第21或22天，处死，并进行神经组织病理学检查	给予试验样品，进行免疫发育毒性评价	给予试验样品，如1A组发现生殖毒性作用，1B组（14周龄）可行剖检验证，或到达90日龄（不超120日龄）后继续交配进行验证	
第21～第22周末 （必要时）	—	—	—	—	—	交配（给予试验样品）	
第23～第25周末 （必要时）	—	—	—	—	—	妊娠期给予试验样品	
第26周～试验结束 （必要时）	—	—	—	—	—	哺乳期给予试验样品，哺乳期第4天结束试验，处死雌、雄鼠	出生后4天，完成相关升值发育指标检测后，处死仔鼠

表 2 扩展一代生殖毒性试验 F1 代各队列试验动物使用情况

各队列中从每窝选用仔鼠数目（只）		各剂量组中评价队列	各队列的试验目的	各项指标使用动物数量（只）		是否性成熟	各队列指标检测结束时F1代仔鼠剖检时间（周龄）
雄	雌			雄	雌		
1	1	1A	生殖毒性	20	20	是	13
1	1	1B		20	20	是	如1A组发现可能地对生殖的毒性影响，1B 组（14 周龄）进行剖检给予验证；或 1B 组到达90日龄（不超120 日龄）后继续交配，通过繁殖 F2代进一步开展生殖毒性观察；试验可于F2代大鼠出生后4 天时结束（即 20～24周龄左右）
1	1	2A	神经发育毒性	10	10	是	9
		2B		10	10	否	3
0.5	0.5	3	免疫发育毒性	10	10	是	8
—	—	剩余	备用	—	—	—	—

8.5 动物交配

使用1:1(一只雄性配对一只雌性)或1:2(一只雄性配对两只雌性)的比例合笼。按1:1的比例合笼，一只雌性与同一雄性合笼直至受孕或持续三周时间。每日早晨宜检查精子或阴栓,并将检查到精子或阴栓的当天规定为妊娠的第0天。对没有配对成功的动物进行评价以确定导致不育的原因。评价可能包括将其与其他已成功交配的雄性或雌性进行再交配的机会、生殖器官的镜检以及发情周期或精子生成的检查。

一般不建议P代动物二次交配,因为这样会丢失第一次交配中着床位点数量的重要信息(并因此丢失着床后和围产期数据，失去可能的潜在致畸性的信息)。将研究扩展到F1代交配期能更好地确定和阐明对雌性动物暴露后的影响。然而P代雄性和未染毒雌性二次交配通常可用于阐明可疑的发现或者进一步描述第一次交配中观察到的生育力影响。

8.6 子代数量

F1代出生后第4天将子代尽量随机调整到每窝5雄和5雌。如按照体重，选择性的剔除发育不良的幼鼠是不恰当。如果每窝得不到5雌和5雄，则进行不均等调整(如6雄和4雌)。

9 观察指标

9.1 临床观察

对于P代和选定的F1代动物，试验期间一般每天在相同时间进行一般临床观察一次，如出现相关的动物毒性反应、发病、死亡以及行为变化如中毒、难产或延期分娩等症状需记录。此外，所有的P代和F1代动物（断乳后）每周需进行一次详细观察并记录，观察的症状应包括皮肤、被毛、眼睛、黏膜、分泌物和排泄物的产生和植物神经活动的变化（如流泪、毛发直立、瞳孔大小、不寻常的呼吸模式）等，以及步态、姿势的变化，对触摸的反应；另外，如发现阵挛或强直动作，机械性重复行为（如过度理毛、重复转圈）或怪异行为（如自残、倒退）等也需要记录。

9.2 体重和食物耗料量

P代和F1代大鼠体重称量的频次和相关要求见表3。

表 3 各代大鼠体重称量频次和相关要求

动物	性别	试验阶段			
		交配前	孕期	哺乳期	断乳后
P代	雄鼠	给予试验样品的第一天称重，并在之后每周至少称重一次，直至试验样品 给予 不少于 10 周结束。			
	雌鼠	给予试验样品的第一天称重， 并在之 后每周至少称重一次		于分娩后第0（或 1）、4、7、14和 21天称重	—
F1代	雄、雌鼠	—	—	于仔鼠出生后第 0（或 1）、4、7、 14天时称窝重，至 第 21天断乳时按 只称重	每周至少称重 一 次，直至相应 试 验结束

需要指出，各代所有大鼠完成相关试验指标测定后处死时都需要称重。此外，实验中P代和F1代1A组动物在进行体重称量的同时需记录饲料消耗量（交配和哺乳期间除外）。

9.3 血液、生化和尿液检测

9.3.1 样本采集

P代大鼠相关试验结束时，每个剂量组分别随机选择雄鼠和雌鼠各10只，按程序采集血液样本后 可进行血液学、血液生化、血清中甲状腺素（T4）、促甲状腺激素（TSH）、性激素等检测或由试验样品 已知作用特性提示的其他检测。如果P代动物需要保留进行第二次交配，为了不影响交配血液样本的采 集需提前进行。

F1代大鼠队列1相关试验结束时，每个剂量组分别随机选择1A组的雄鼠和雌鼠各10只，按程序采集 血液样本后可进行血液学、血液生化、T4、TSH、性激素检测或由试验样品已知作用特性提示的其他检 测，并开展尿液检测。

9.3.2 血液学检测指标

包括血细胞比容、血红蛋白浓度、红细胞计数、白细胞总数和分类计数、血小板计数和凝血时间/ 潜在凝血时间等检测。

9.3.3 血液生化检测指标

包括血糖、总胆固醇、尿素、肌酐、总蛋白、白蛋白和至少有两个表示肝细胞损伤的酶（如丙氨酸 氨基转移酶、天门冬氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、γ 谷氨酰转和山梨醇脱氢酶）等。必要时，可进行T4、 TSH和性激素水平等的检测。

9.3.4 尿液检测指标

包括外观、体积、渗透压或比重、pH、蛋白质、尿糖、血细胞、细胞碎片等检测。

9.4 精子检测

9.4.1 样品采集

所有P代和 F1代1A队列中的雄性大鼠在所对应的试验结束时，摘取附睾尾（或输精管）收集精子，进行精子活力和形态等参数的检测。需要注意的是精子指标的检测需在大鼠处死后立即进行，且收集过程应尽量减少精子损失。

9.4.2 精子检测指标

精子形态的评价，每只动物至少检查200个精子，从而区分精子形态为正常（头部和中段尾均正常）或者异常（精子形态异常包括精子头的融合、分离，精子头和（或）尾的异常）。另外，进行性运动精子的百分比等可通过仪器辅助分析。

9.5 发情周期

P代雌性大鼠在开始给予试验样品后即可对其进行发情周期的评价（阴道细胞学检查），可持续到确认交配成功或2周的交配期结束。如果P代雌性大鼠在开始给予试验样品后出现一些与生殖毒性无关的效应（如摄食量明显减少等），那么可以考虑将交配前试验样品给予时间延长2周（即交配前给予试验样品4周），以便雌性大鼠更好地适应试验样品，同时对应的P代雄性大鼠交配前试验样品给予时间也做相应的延长（但P代雄鼠处死前试验样品给予总的时间不变，仍为不少于10周即可）。

F1代发情周期的评价主要通过队列1的检查完成。1A组的雌性大鼠，首先可在确定阴道开放日期后，每天对其进行阴道涂片检查，记录第一次发现典型角质化上皮细胞的时间，进而获得相应的间隔日期；其后，自出生后75天左右开始，还可以再次对其进行发情周期的检查和记录，检查为期2周。另外，如果1B组大鼠需要进行交配以获得F2代，对其发情周期也需进行检查，时间从配对开始到确认交配成功即可。

9.6 子代参数

分娩后（出生后第0或1天）应该尽快地检查每窝仔鼠，以记录仔鼠的数量、性别、死胎数、活胎数，以及出现的外观异常（外部可见的畸形，包括腭裂、皮下出血、异常皮肤颜色或纹理、有脐带、有干性分泌物），其中死亡的仔鼠需检查并记录可能存在的缺陷或死亡的原因。

仔鼠体重称量和临床观察可同时开展，分别在出生后第 0（或 1）、4、7、14和21天进行，如有特殊情况可增加临床观察的频次。临床观察内容包括外部结构异常，皮肤、被毛、眼睛、黏膜的改变、分泌物和排泄物的出现和自主活动的改变，另外如发现步态、姿势、对触摸的反应发生改变，以及出现阵挛或强直动作、刻板或怪异的行为也需记录。

以窝为单位，检查并记录F1代各剂量组仔鼠生理发育指标。生理发育指标包括：耳廓分离、睁眼、张耳、出毛、门齿萌出时间等；雌性阴道张开和雄性睾丸下降的时间；出生后第4天，测量肛门与生殖器的距离（AGD）；出生后第12或13天，所有雄性仔鼠检查乳头/乳晕。

如果性成熟发生的早，在预计的包皮分离或阴道开口出现之前，所有被选择的F1代雌雄动物应该每日评价这些终点。应注意任何生殖器官异常，如持续阴道口开放，尿道下裂或阴茎裂开。通过检测包皮分离或阴道开口时鼠龄和体重，比较性成熟 F1代动物的生理发育情况。

9.7 评价子代的神经发育毒性(队列 2A 和 2B)

9.7.1 神经发育毒性检查

各剂量组队列2的大鼠用于神经发育毒性评价，其中2A队列大鼠（10只雄鼠和10只雌鼠）开展听觉惊吓、功能观察、活动度测试和神经病理学检查，2B队列大鼠（10只雄鼠和10只雌鼠）在出生后第21（或22）天处死后进行神经病理学检查。

9.7.2 听觉惊吓检测

在出生后第24±1天时，对2A队列的大鼠进行听觉惊吓测试。在进行听觉惊吓测试时，需使实验条件优化到每次测试条件较为稳定。试验样品组和对照组交叉进行测试，所有检测的动物均需测试50次，10次为一组，共5组，记录每组测试动物的平均反应振幅。

9.7.3 神经系统功能观察组合检测

出生后第63至75天间适当的时间，2A队列大鼠进行神经系统功能观察组合检测。功能观察组合包括试验对象外观的详细的描述、行为和功能的协调性，具体观察项目和指标见表4。上述观察可在自由移动的活动场所（开阔场地）或居住的笼内进行，试验动物按照最少互动到最多互动的顺序来进行。

表 4 神经系统功能观察组合的项目及指标

观察项目	检测指标
笼内一般状况观察	动物进食、饮水、睡觉、无运动活动/清醒、绕笼内运动、竖毛、攻击同笼动物、发声、理毛
觉醒	唤醒反应、手指逼近、头部触摸、僵住症、异常行为、视觉位置感、被动体位反应
情绪	畏惧，理毛行为、攻击性/应激性，易怒、异常发声
运动活动/共济失调	体态、自主活动、共济失调步态、直立
中枢兴奋	抽搐、癫痫、震颤、惊恐反应、对挟按尾部的敏感性
肌张力	低肌张力步态、握力、身体张力、腹部张力、肢体张力
反射	睑闭反射、耳廓反射、后肢反射、地面翻正反射、空中翻正反射
心血管/呼吸系统	呼吸、心率、皮肤颜色、发绀
自主体征	扭体症状、尾巴体位、竖毛、流泪、血泪、流涎、眼睛张开、突眼、瞳孔、排尿、排便、粪便黏稠度、尿液颜色、动物死亡

9.7.4 神经行为指标检测

可根据文献报道和前期的研究结果，有针对性地选择相关学习和记忆的测试方法对2A队列大鼠学习记忆能力进行检测。如果无上述信息的提供，推荐使用主动回避试验、被动回避试验等作为试验方法进行。

9.8 评价潜在的免疫发育毒性(队列 3)

在出生后第56(±3), 队列3中每个染毒组的10雄10雌(每窝1雄或1雌；所有的窝至少随机选择1个子代)用于测血清中的IgG\IgM\C3抗体水平。

9.9 潜在繁殖毒性后续评价(队列 1B)

如F1代1A组大鼠的试验结果提示试验样品可能存在生殖毒性作用时，各剂量组1B队列的雄雌大鼠（13周龄）除可以通过处死后进行病理检查给予证明外，还可以通过持续给予试验样品至少到出生后第90天（但不超过120天），再进行雌雄交配（避免同窝的雌雄大鼠进行交配）以获得F2代动物的方式对潜在的生殖毒性作用进行评价，处理方式与P代动物相同。在F2代仔鼠到达出生后第4天时，如获得的试验数据能够说明问题时即可结束实验，而无需继续喂养至断乳或更久。

10 病理学检查

10.1 大体解剖

在试验终止时或试验期间出现死亡时，所有的 P 代和 F1 代动物都要进行大体解剖，观察分析任何结构异常情况或病理性改变，其中应特别关注生殖系统器官是否存在异常。已死亡的或濒死情况下处死的仔鼠，应进行大体解剖并分析可能的缺陷和（或）死亡的原因，并放入固定液保存。

对于成年 P 代和 F1 代雌性大鼠进行大体解剖时，一方面，解剖当天可进行阴道涂片来确定发情周期的情况，并与其生殖器官组织病理学检查结果结合考虑；另一方面，还可通过硫化铵染色等方法检查所有 P 代雌鼠（如果 F1 代 1B 组需继续交配，则也需检查）子宫着床点是否存在并计数。

10.2 器官摘取、称重及保存

10.2.1 所有 P 代和 F1 代相关队列中成年雌雄大鼠相应试验终止时，解剖后根据试验需要可考虑摘取下列脏器，称重（除非有特殊要求，成对脏器可以单独或合并称重）后选取合适固定液进行保存。组织或器官的摘取及称重的内容和要求见表 5。

表 5 组织或器官摘取和称重的内容及要求

项目类别		指标
组织病理学检查的脏器组织	需称重并计算脏器系数的器官	脑、肝脏、肾脏、心脏、脾脏、胸腺、垂体、甲状腺（含甲状旁腺）、肾上腺、子宫（包括输卵管和子宫颈）、睾丸、附睾（用于精子计数的尾部和整体）。
	需进行组织病理学检查的组织或器官	脑、肝脏、肾脏、心脏、脾脏、胸腺、垂体、甲状腺（含甲状旁腺）、肾上腺、子宫（包括输卵管和子宫颈）、睾丸、附睾（用于精子计数的尾部和整体）卵巢、前列腺（结合背侧和腹侧部分）、带有凝固腺体的精囊和其中的液体（作为一个整体）、淋巴结（一个与给药途径相关，另一个在较远距离）。
	必要时，需进行组织病理学检查的组织或器官	末梢神经、肌肉、脊髓、眼球及视神经、胃肠道、膀胱、肺、气管（带有甲状腺和附属的甲状旁腺）、骨髓、输精管（雄性）、乳腺（雄性和雌性）以及阴道。

- 10.2.2 必要时，F1 代大鼠队列 1A 相关试验结束时，可从每个剂量组分别随机选择雄鼠和雌鼠各 10 只，进行出生前或出生后暴露导致的免疫效应评价，包括对暴露途经相关和距离较远的淋巴结进行称重，对脾脏细胞进行表型分析（T 细胞、B 细胞、NK 细胞）。
- 10.2.3 F1 代 2A 组的大鼠在行为测试结束后处死，需进行灌注固定后再摘取脑，称重后开展神经组织病理学检查；F1 代 2B 组大鼠在出生后第 21（或 22）天处死，在摘取脑时灌注固定可选择性开展，称量后进行神经组织病理学检查。
- 10.2.4 F1 代未入选相应队列剩余的仔鼠，可在出生后第 22 天（断乳后）处死，除非试验结果表明需利用这部分动物开展进一步的评价。上述处死的仔鼠均需进行大体解剖，并对生殖器官进行评价。另外，从尽可能多的窝中得到每组每个性别 10 只仔鼠，对其脑、脾脏和胸腺称重并保存。

10.3 组织病理学检查

10.3.1 P 代

P 代大鼠试验结束时所摘取器官应进行组织病理学检查，可先进行高剂量组和对照组检查，如发现与试验样品有关的有意义的组织病理学改变时，需进一步检查所有较低的剂量组的动物。此外，对出现未能成功进行交配、受孕、射精，发情周期、精子数量、活动度或形态受到影响，相应子代大鼠出现一定发育毒性表现的 P 代大鼠，需对其生殖器官进行全面组织病理学的评价。

10.3.2 F1 代

1A 队列全部高剂量组和对照组成年动物的器官需进行组织病理学检查，每窝至少有 1 只仔鼠。如发现脏器出现与试验样品有关的有意义的病理改变后，需进一步检查所有中、低剂量组的动物，以确定 NOAEL。另外，如果从 1A 队列动物得到的结果仍存在可疑，需进行 1B 队列动物的组织学检查加以验证。

在完成神经行为测试之后（在出生 75 天后，但不超过 90 天），2A 队列全部高剂量组和对照组大鼠摘取脑等组织后进行神经组织病理学检查。在出生后第 21（或 22）天，2B 队列全部高剂量组和对照组的大鼠摘取脑等组织后进行脑组织病理学检查。如发现脏器出现与试验样品有关的有意义的病理改变后，需进一步检查所有中、低剂量组的动物，以确定 NOAEL。

对于 2A 和 2B 队列的大鼠，通过脑多切面的方式，可全面检查大脑嗅球、大脑皮层、海马体、基底神经节、丘脑、下丘脑、中脑（被囊、被盖和大脑脚）、脑干和小脑。另外，在上述检查基础上，2A 队列大鼠可增加眼（视网膜和视神经）和周围神经标本、肌肉和脊髓检查。

11 试验报告

11.1 数据处理

将所有的数据和结果以表格形式进行总结，数据可以用表格进行统计，表中应显示每组的试验动物数、交配的雄性动物数、受孕的雌性动物数、各种毒性反应及其出现动物百分数。生殖、生理发育指标数据，应以窝为单位统计。神经发育毒性以及病理检查等结果应以适当的方法进行统计学分析。计量资料采用方差分析，进行多个试验组与对照组之间均数比较，分类资料采用 Fisher 精确分布检验、卡方检验、秩和检验，等级资料采用 Ridit 分析、秩和检验等。

11.2 结果评价

比较试验样品组动物与对照组动物观察指标和病理学检查结果是否有显著性差异及剂量反应关系，以评定试验样品有无生殖发育毒性，进而确定其生殖发育毒性作用的 NOAEL 和 LOAEL。同时还可根据出现统计学差异的指标（如体重、生理发育指标、神经功能观察、神经发育毒性、发育免疫毒性、大体解剖和病理组织学检查结果等），进一步估计生殖发育毒性的作用特点。

11.3 试验报告

试验报告宜包括以下内容：

- 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。
- 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) 试验样品：名称、批号、剂型、状态（包括感官、性状、包装完整性、标识）、数量、前处理方法、溶媒。
- f) 试验动物：物种、品系、级别、数量、体重、性别、来源（供应商名称、试验动物生产许可证号），动物检疫、适应情况，饲养环境（温度、相对湿度、试验动物设施使用许可证号），饲料来源（供应商名称、试验动物饲料生产许可证号）。
- g) 试验方法：试验分组、每组动物数、剂量选择依据、试验样品给予途径及期限、观察指标、统计学方法。
- h) 试验结果
 - 1) 生殖毒性检测结果
 - 试验动物的体重，摄食量，食物利用率（除了交配和哺乳期间）；
 - 所选择断乳后 F1 代动物的体重；
 - 在研究过程中死亡的时间或者是否在试验结束有存活的动物；GB XXXX—XXXX
 - 临床观察症状的性质、严重程度和持续时间（是否是可逆的）；
 - 血液、生化（包括 TSH 和 T4、性激素）和尿液分析的结果；
 - 脾脏细胞的表型分析结果（T 细胞、B 细胞、NK 细胞）；
 - 正常或异常发情周期的 P 代和 F1 代雌性动物的数目；
 - 交配的时间（开始交配至交配成功的天数）；
 - 对生殖的毒性或其他影响，包括完成交配、妊娠、分娩和哺乳的动物数目以及百分比，成功；
 - 交配的雄性的数目和百分比，有难产/延长或难分娩症状的雌性数目和百分比；
 - 孕期、分娩期（可以记录的话）的时长；
 - 着床数量、窝大小和仔鼠性别比；
 - 着床后流产的数量，活胎和死胎的数目和百分比；
 - 仔鼠窝重量；
 - 肉眼观察明显的异常幼仔的数量；
 - 仔鼠生理发育指标结果；
 - F1 代大鼠动物性成熟指标的数据；
 - P 代和 F1 代大鼠宰杀时的体重、绝对和相对器官重量数据；

- 大体解剖和组织病理学检查结果；

- P 代和 F1 代雄性附睾尾部精子活性和形态分析结果；

必要时，可提供 P 代和 F1 代雌性的卵巢中包含的卵泡的数目和成熟阶段，以及 F1 代雌性卵巢中黄体的数量。

- 2) 神经发育毒性检测结果

- 听觉惊吓测试的分析结果；

- 神经系统功能观察组合指标，以及对结果评分操作的说明；

- 神经行为发育指标测试分析的结果；

- 神经病理大体解剖和组织病理学检查结果。

- 3) 发育免疫毒性检测结果

- 4) 试验结果统计分析的结果。

11.4 试验结论

试验结论应包括P代和子代各种效应的NOAEL，并提供对解释结果有用的其他信息(如任何已知神经毒物类似的效应)。

11.5 试验的解释

11.5.1 暴露效应信息

扩展的一代生殖毒性研究可提供所有生殖周期不同阶段试验样品重复暴露效应的信息。尤其应提供试验样品对子代(一直到出生后 90 天)生殖系统、发育、生长、生存及功能等终点影响的信息。

11.5.2 试验样品相关信息

解释结果需要考虑试验样品所有的可用信息，包括物理化学性质，毒物动力学和毒作用性质，结构类似物可用的相关信息，试验样品以往研究的结果(如急性毒性，重复剂量毒性研究，代谢研究，评估体内体外试验样品代谢特征种属差异的定性定量研究)。应该把本试验大体解剖和器官质量的结果与其他重复剂量染毒研究的观察结果相比较。子代生长减缓可考虑可能与试验样品影响母乳构成有关系。

11.5.3 队列 2(神经发育毒性)

根据所有的发现并运用专家判断证据权重的方法进行神经行为和神经病理学结果解释。如果存在行为模式或形态学的发现，同样应讨论剂量-反应的证据。神经发育毒性的评价应包括人类流行病学研究或病理报告，试验动物研究(如毒物动力学数据，结构活性信息，其他毒性研究的数据)。评价还应包括神经病理学与行为改变之间的关系。

11.5.4 队列 3(免疫发育毒性)

通过 IgM/IgG/C3 抗体反应评估免疫功能的抑制或增强应在所有观察的背景下进行评估。

参考文献

- [1] OECD (2018) Extended one-generation reproductive toxicity study, OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS No. 443.
- [2] GB/T 15193.29-2020 食品安全国家标准 扩展一代生殖毒性试验
- [3] GB/T 35525-2017 化学品 扩展的一代繁殖毒性试验