



中华人民共和国国家标准

GB 15193.29—2020

食品安全国家标准 扩展一代生殖毒性试验

2020-09-11 发布

2021-03-11 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国 家 市 场 监 督 管 理 总 局 发 布

食品安全国家标准

扩展一代生殖毒性试验

1 范围

本标准规定了扩展一代生殖毒性的基本试验方法和技术要求。

本标准适用于评价受试物的生殖发育毒性作用。

2 术语和定义

2.1 生殖毒性

对雄性和雌性生殖功能或能力的损害和对后代的有害影响。生殖毒性既可发生于雌性妊娠期,也可发生于妊娠前期和哺乳期。表现为外源化学物对生殖过程的影响,如生殖器官及内分泌系统的变化,对性周期和性行为的影响,以及对生育力和妊娠结局的影响等。

2.2 发育毒性

个体在出生前暴露于受试物、发育成为成体之前(包括胚胎期、胎期以及出生后)出现的有害效应,表现为发育生物体的结构异常、生长改变、功能缺陷和死亡。

2.3 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。

2.4 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。

2.5 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、中毒体征,甚至死亡等。

2.6 未观察到有害作用剂量

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有关的毒性作用的最大剂量。

2.7 最小观察到有害作用剂量

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。

3 试验目的

本试验用于评价受试物对亲代(F0代)及子代(F1代等)实验动物生殖和发育的影响。提供关于受

试物对亲代雄、雌性动物生殖系统完整性和功能,如性腺功能、发情周期、附睾精子成熟、交配行为、受孕、妊娠、分娩和哺乳等影响的信息,同时获得受试物对子代动物的生长、发育,包括性成熟、生殖器官完整性和功能,神经发育以及免疫发育等作用的资料。

4 试验方法

4.1 受试物

受试物应首先考虑使用原始样品,若不能使用原始样品,应按照受试物处理原则对受试物进行适当处理。将受试物掺入饲料、饮用水或灌胃给予。

4.2 实验动物

4.2.1 动物选择

实验动物的选择应符合 GB 14922.1 和 GB 14922.2 的有关规定。选择已有资料证明对受试物敏感的动物物种和品系,一般啮齿类动物首选大鼠,避免选用生殖率低或发育缺陷发生率高的品系。本标准中的原则和建议均是以大鼠为基础的。为了正确地评价受试物对动物生殖和发育能力的影响,两种性别的动物均应使用。所选动物应注明物种、品系、性别、体重和周龄。同性别实验动物个体间体重相差不超过平均体重的±20%。选用的亲代实验动物试验开始时需性成熟,至交配时需日龄相近(大鼠至少为 13 周龄),而且其中雌性动物应为非经产、非孕动物。

4.2.2 实验动物数量

为了获得具有统计学要求的基本试验数据,正确地评价受试物对动物生殖和发育过程(包括 F0 代动物生殖、妊娠和哺育的过程,F1 代动物从出生到成熟过程中的生长发育情况)的毒性作用,需保证受试物每个剂量组和对照组均至少获得 20 只孕鼠。一般在试验开始时,建议每组两种性别亲代(F0 代)大鼠各准备 30 只左右。

4.2.3 动物准备

试验前动物在实验动物房至少应进行 3 d~5 d 的环境适应和检疫观察。

4.2.4 动物饲养环境

实验动物饲养条件、饮用水、饲料应符合 GB 14925、GB 5749、GB 14924 的有关规定。实验动物单笼或按性别分笼饲养,自由饮食、饮水。孕鼠临近分娩时,应单独饲养在分娩笼中,需要时笼中放置合适的造窝垫料。

4.3 剂量及分组

动物按体重随机分组,至少设 3 个受试物剂量组和 1 个对照组。如果受试物使用溶剂,对照组应给予溶剂的最大使用量。某些受试物的高剂量受试物组设计应考虑其对营养素平衡的影响,对于非营养成分受试物剂量不应超过饲料的 5%。

在受试物理化和生物特性允许的条件下,最高剂量应使 F0 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。剂量组间距以 2 倍或 4 倍为最佳。

4.4 受试物给予

4.4.1 根据受试物的特性或试验目的,可将受试物掺入饲料、饮水或灌胃给予实验动物。首选掺入饲

料,若受试物加入饲料或饮水中影响动物的适口性,则考虑选择灌胃给予。

4.4.2 试验期间,所有动物应采用相同的方式给予受试物;如受试物经灌胃给予,每天一次。各代大鼠给予的受试物剂量、饲料和饮水相同。

4.4.3 受试物掺入饲料或饮水给予,要将受试物与饲料(或饮水)充分混匀并保证该受试物配制的稳定性和均一性,以不影响动物摄食、营养平衡和饮水量为原则,受试物掺入饲料比例一般小于质量分数5%,若超过5%(最大不应超过10%),调整对照组饲料营养素水平,若受试物无热量或营养成分,且添加比例大于5%时,对照组饲料应填充甲基纤维素等,掺入量等同高剂量,使其与剂量组饲料营养素水平保持一致;亦可视受试物热量或营养成分的状况调整剂量组饲料营养素水平,使其与对照组饲料营养素水平保持一致。受试物剂量单位是每千克体重所摄入受试物的毫克(或克)数,即mg/kg体重(或g/kg体重),当受试物掺入饲料,其剂量单位亦可表示为mg/kg(或g/kg)饲料,掺入饮水则表示为mg/mL水。受试物掺入饲料时,需将受试物剂量(mg/kg体重)按动物每100 g体重的摄食量折算为受试物饲料含量(mg/kg饲料)。扩展一代生殖毒性试验大鼠每日摄食量一般可按体重的8%折算。

4.4.4 受试物选择灌胃方式给予时,要将受试物溶解或悬浮于合适的溶媒中,建议优先考虑使用水溶液或悬浮液,其次考虑使用植物油(如橄榄油、玉米油等)溶液或悬浮液,不溶于水或油的受试物亦可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液或糊状物等。溶媒或其他的添加剂增强受试物溶解性应考虑以下特点:是否影响受试物的吸收、分布、代谢和蓄留;是否影响受试物的化学特性,以致改变其毒性特征;是否影响动物食物和水的消耗量并影响动物的营养水平。另外,除水外必须清楚溶剂的毒性特征,避免使用原本具有潜在毒性的溶剂(如丙酮、二甲基亚砜)。受试物应现用现配,有资料表明其溶液或混悬液储存稳定者除外。

4.4.5 受试物以灌胃方式给予,如溶媒为水溶液时,灌胃体积一般不超过10 mL/kg体重,最大灌胃体积不超过20 mL/kg体重;如为油性液体,灌胃体积应不超过4 mL/kg体重;各组灌胃体积均应一致。应每日在同一时间灌胃1次,每周至少称体重2次,根据体重调整灌胃体积。在分娩当天建议不对母鼠进行灌胃或采取其他处理措施。

4.5 试验方法

推荐选用10周龄以上的雌、雄性大鼠作为F0代,至少适应3 d~5 d后开始给予受试物。各组F0代雌、雄性大鼠采用的处理方式均应相同,每天给予受试物,期限从交配前2周开始并涵盖交配期、妊娠期直到F1代断乳的整个试验期间。F1代断乳后,可对F0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F0代雄鼠解剖前受试物暴露给予时间应不少于10周(至少1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,并给予受试物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和表2。

表 1 扩展一代生殖毒性试验程序

试验周期	亲代(F0代)	子一代(F1代)			子二代(F2代) (必要时)	
		环境适应和检疫观察	给予受试物	—		
试验开始前 3天～5天	环境适应和检疫观察	—	—	—	—	
第1周～第2周末	给予受试物	—	—	—	—	
第3周～第4周末	交配(给予受试物)	—	—	—	—	
第5周～第7周末	妊娠期给予受试物	—	—	—	—	
第8周～第10周末	哺乳期给予受试物， 其他处理,可处死雌 鼠;雄鼠给予受试物 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、神经发育毒性和发育免疫毒性等指标检测	—	—	—	
第11周～第20周末	—	1A组	2A组	2B组	3组	
		给予受试物,进行神 经发育毒性评价;结 束后处死,记录脑重 并行神经组织病理 学检查	给予受试物,进行神 经发育毒性评价;结 束后处死,记录脑重 并行神经组织病理 学检查	出生后第21天或第 22天,处死,记录脑 重并行神经组织病 理学检查	给予受试物,进行发 育免疫毒性评价	给予受试物,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周～第22周末 (必要时)	—	—	—	—	—	交配(给予受试物) —
第23周～第25周末 (必要时)	—	—	—	—	—	妊娠期给予受试物 —
第26周～试验结束 (必要时)	—	—	—	—	—	哺乳期给予受试物, 哺乳期第4天结束 试验,处死雌、雄鼠 出生后4天,完成相 关生殖发育指标检 测后,处死仔鼠

表 2 扩展一代生殖毒性试验 F1 代各队列实验动物使用情况

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			20	20	是	如 1A 组发现可能的对生殖的毒性影响,1B 组(14 周龄)行剖检给予验证;或 1B 组到达 90 日龄(不超过 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 周~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	发育免疫毒性	10	10	是	8
—	—	剩余	备用	—	—	—	—

4.6 交配

4.6.1 采用 1:1(1 雄:1 雌)方式交配。

4.6.2 交配时,在同一剂量组中随机选择雌雄大鼠各 1 只合笼,合笼的雌、雄性大鼠均应作标记。所有雌性大鼠在交配期应每天检查阴栓或精子,直到证明已交配为止,并在证明已交配后尽快将雌性动物分开。查到精子或阴栓的当天为受孕 0 d。

4.6.3 如经过 3 个发情期或 2 周仍未交配成功,可终止合笼,并尽快对上述雌、雄大鼠进行相应检查以分析原因,并在必要时进行生殖器官的病理组织学、发情周期的检查。另外,也可将未成功交配的动物与证实过生育功能正常的动物重新配对,并在需要时进行生殖器官的病理组织学、发情周期的检查。

4.6.4 F0 代大鼠不推荐进行第二次交配,因为这样会失去重要生殖毒性信息(如着床点数目等),建议可以通过 F1 代的继续交配来观察受试物对雌性动物产生的影响。尽管如此,如果已在 F0 代第一次交配中发现受试物对生殖产生影响或存在可疑结果,仍可通过选择将 F0 代大鼠进行第二次交配加以证实。第二次交配时,推荐使用未交配的雌(雄)性动物与已交配过的雄(雌)性动物进行,一般在第一次交配所产子代动物断乳后 1 周进行。

4.7 每窝仔鼠数量的标准化

F1 代动物在出生后第 4 天时,采用随机的方式(而不是以体重为依据)将每窝子代大鼠数目进行调整,剔除多余的动物,达到每窝性别和数目的统一。每窝尽可能选 5 只雌性大鼠和 5 只雄性大鼠,也可根据实际情况进行调整(如 6 雄 4 雌)。

5 观察指标

5.1 临床观察

对于 F0 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 F0 代和 F1 代动物(断乳后)每周需进行一次详细观察并记录,观察的体征应包括皮肤、被毛、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、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。

5.2 体重和进食量

F0 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
F0 代	雄鼠	给予受试物的第一天称重,并在之后每周至少称重 1 次, 直至受试物给予不少于 10 周结束			
	雌鼠	给予受试物的第一天称重, 并在之后每周至少称重 1 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 1 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 F0 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)。

5.3 血液、生化和尿液检测

5.3.1 样本采集

F0 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)、性激素等检测或由受试物已知作用特性提示的其他检测。如果 F0 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、性激素检测或由受试物已知作用特性提示的其他检测,并开展尿液检测。

5.3.2 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。

5.3.3 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谷氨酰转氨酶和山梨醇脱氢酶)等。必要时,可进行T4、TSH和性激素水平等的检测。

5.3.4 尿液检测指标

包括外观、体积、渗透压或比重、pH、蛋白质、尿糖、血细胞等检测。

5.4 精子检测

5.4.1 样品采集

所有F0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。

5.4.2 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。

5.5 发情周期检查

F0代雌性大鼠在开始给予受试物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F0代雌性大鼠在开始给予受试物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受试物给予时间延长2周(即交配前给予受试物4周),以便雌性大鼠更好地适应受试物,同时对应的F0代雄性大鼠交配前受试物给予时间也做相应的延长(但F0代雄鼠处死前受试物给予总的时间不变,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组大鼠需要继续进行交配以获得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。

5.6 子代发育毒性指标检测

5.6.1 分娩后(出生后第0天或第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。

5.6.2 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。

5.6.3 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天或第13天,所有雄性仔鼠检查乳头/乳晕。

5.7 子代神经发育毒性指标检测

5.7.1 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 天(或第 22 天)处死后进行神经病理学检查。

5.7.2 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。受试物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。

5.7.3 神经系统功能观察组合检测

出生后第 63 天至第 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,实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、排尿、排便、粪便黏稠度、尿液颜色、动物死亡

5.7.4 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、被动回避试验或 Morris 水迷宫试验等作为试验方法进行检测。

5.8 子代发育免疫毒性指标检测

5.8.1 各剂量组队列 3 的大鼠(10 只雄性和 10 只雌性动物),在出生后第 56±3 天时进行对 T 细胞依赖抗原[如绵羊红细胞(SRBC)或钥孔戚血蓝蛋白(KLH)]的主要 IgM 抗体反应(TDAR)的检测。

5.8.2 TDAR 可采用抗体生成细胞检测或特异性 IgM 抗体检测的方法进行。

5.8.2.1 抗体生成细胞检测

空斑形成细胞(PFC)计数检测是通过腹腔注射免疫 SRBC 4 天后,将大鼠脾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,溶血空斑数可以反映抗体生成细胞数。PFC 检测可以分亚组在不同日期进行检测,但需要满足下列条件:

- a) 确定亚组动物的免疫和处死时间,以保证检测时达到了反应峰值;
- b) 每个亚组包含了不同组别间数量相同的雄性和雌性动物;
- c) 亚组动物处死时日龄应相同。

5.8.2.2 特异性 IgM 抗体检测

腹腔注射 SRBC 或 KLH 5 天后,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法测定血清中的特异性 IgM 抗体效价。

5.9 潜在生殖毒性的继续评价

如果 F1 代 1A 组大鼠的试验结果提示受试物可能存在生殖毒性作用,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受试物至少到出生后第 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 F0 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。

6 病理学检查

6.1 大体解剖

在试验终止时或试验期间出现死亡时,所有的 F0 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 F0 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 F0 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。

6.2 器官摘取、称重及保存

6.2.1 所有 F0 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、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、精囊、淋巴结
	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、垂体、甲状腺(含甲状旁腺)、气管、骨髓、输精管、乳腺(雄性和雌性)以及阴道

6.2.2 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)。

6.2.3 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 天(或第 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。

6.2.4 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。

6.3 组织病理学检查

6.3.1 F0 代

F0 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,如发现与受试物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,相应子代大鼠出现一定发育毒性表现的 F0 代大鼠,需对其生殖器官进行全面组织病理学的评价。

6.3.2 F1 代

6.3.2.1 队列 1

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。如发现脏器出现与受试物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。

6.3.2.2 队列 2

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 天(或第 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。当发现脏器出现与受试物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。

7 数据处理和结果评价

7.1 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,表中应显示每组的实验动物数、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。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。

7.2 结果评价

比较受试物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,以评定受试物有无生殖发育毒性,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。

8 试验报告

- 8.1 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号。
- 8.2 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期。
- 8.3 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。
- 8.4 试验摘要。
- 8.5 受试物: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。
- 8.6 实验动物:物种、品系、级别、数量、体重、性别、来源(供应商名称、实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、实验动物设施使用许可证号)、饲料来源(供应商名称、实验动物饲料生产许可证号)。
- 8.7 试验方法:试验分组、每组动物数、剂量选择依据、受试物给予途径及期限、观察指标、统计学方法。

8.8 试验结果

8.8.1 生殖毒性检测结果:

- a) 实验动物的体重、摄食量、食物利用率(除了交配和哺乳期间);
- b) 所选择断乳后 F1 代动物的体重;
- c) 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;
- d) 临床观察症状的性质、严重程度和持续时间(是否是可逆的);
- e) 血液、生化(包括 TSH 和 T4、性激素)和尿液分析的结果;
- f) 脾脏细胞的表型分析结果(T 细胞、B 细胞、NK 细胞);
- g) 正常或异常发情周期的 F0 代和 F1 代雌性动物的数目;
- h) 交配的时间(开始交配至交配成功的天数);
- i) 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;
- j) 孕期、分娩期(可以记录的话)的时长;
- k) 着床数量、窝大小和仔鼠性别比;
- l) 着床后流产的数量,活胎和死胎的数目和百分比;
- m) 仔鼠窝重量;
- n) 肉眼观察明显的异常幼仔的数量;
- o) 仔鼠生理发育指标结果;
- p) F1 代大鼠动物性成熟指标的数据;
- q) F0 代和 F1 代大鼠宰杀时的体重、绝对和相对器官重量数据;
- r) 大体解剖和组织病理学检查结果;
- s) F0 代和 F1 代雄性附睾尾部精子活性和形态分析结果。

8.8.2 神经发育毒性检测结果:

- a) 听觉惊吓测试的分析结果;

- b) 神经系统功能观察组合指标,以及对结果评分操作的说明;
- c) 神经行为发育指标测试分析的结果;
- d) 神经病理大体解剖和组织病理学检查结果。

8.8.3 发育免疫毒性检测结果:

- a) 血清 IgM 抗体滴度(绵羊红细胞或匙孔戚血蓝蛋白的致敏作用),或脾脏空斑形成细胞计数(绵羊红细胞的致敏作用)结果;
- b) 如开展相关试验,也可提供 TDAR 试验阳性验证实验结果。

8.8.4 试验结果统计分析的结果。

8.9 试验结论

对试验结果进行讨论时,需综合考虑关于受试物所有有用的信息,包括物理化学、毒物动力学特性,结构类似物毒性的相关信息,以及受试物之前所进行的毒性评价的结果(如急性、亚急性、亚慢性和慢性毒性等);另外,在利用已有的受试物毒性机制研究和评价数据时,还需考虑由于种属差异而导致的体内外代谢的不同。根据上述受试物毒性作用的特点,剂量-反应关系,进而获得受试物经口生殖发育毒性的 NOAEL 和(或)LOAEL 结论等。

9 试验的解释

扩展一代生殖毒性试验能够评价在整个生殖周期的所有阶段经口反复暴露受试物对实验动物产生的影响,特别是能够提供关于对亲代生殖系统和子代直到 90 天的生长、发育、功能形成的影响等信息,并从剂量-效应和剂量-反应关系的资料,得出经口生殖发育毒性作用的 NOAEL 和 LOAEL。由于动物和人存在物种差异,故试验结果外推到人存在一定的局限性,但也能为初步确定人群的允许接触水平提供有价值的信息。
