附件4

**化妆品生殖发育毒性试验研究**

**技术指导原则**

中国食品药品检定研究院

**目 录**

[一、概述 1](#_Toc150500927)

[二、基本原则 1](#_Toc150500928)

[（一）一般原则 2](#_Toc150500929)

[（二）试验研究策略 2](#_Toc150500930)

[三、基本内容 3](#_Toc150500931)

[（一）受试物 3](#_Toc150500932)

[（二）暴露方式 3](#_Toc150500933)

[（三）实验动物 4](#_Toc150500934)

[（四）剂量设计与分组 4](#_Toc150500935)

[（五）试验设计 5](#_Toc150500936)

[（六）观察指标 6](#_Toc150500937)

[四、结果分析与评价 8](#_Toc150500938)

[五、参考文献 8](#_Toc150500939)

[六、术语和释义 10](#_Toc150500940)

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。

目前《化妆品安全技术规范》针对生殖发育毒性试验的研究方法仅收录了致畸试验，该方法不足以全面评价生殖发育的不良影响。本指导原则参照《OECD化学品测试指南第 443号：扩展一代生殖发育毒性试验》《OECD 化学品测试指南第416号：两代生殖发育毒性试验》《OECD 化学品测试指南第421号：生殖发育毒性筛选试验》等相关内容提供了扩展一代生殖发育毒性试验和两代生殖发育毒性试验，其中扩展一代涉及神经毒的方法和指标还参考了《OECD 化学品测试指南第424号：啮齿动物类的神经毒性试验》《OECD化学品测试指南第426号：发育神经毒性试验》，旨在为化妆品和原料的生殖发育毒性评价补充研究方法，为研究方法的选择提供参考，并为实验设计提供技术指导。本指导原则适用于可能对亲代生殖系统以及子代发育产生不良影响的化妆品和原料的生殖发育毒性评价。本指导原则是在现行法规和标准以及当前科学认知水平下制定的，随着法规和标准的更新完善，以及科学技术的发展，将适时进行调整。

二、基本原则

生殖毒性试验的一般原理为，通过将受试物持续暴露于亲代及其子代，观察受试物对亲代生育力及子代发育的影响。应按照所用方法的程序和要求开展研究，并遵循以下原则。

**（一）一般原则**

生殖发育毒性试验的设计，应遵循生物试验的基本原则，即随机、对照和重复，同时也要 “具体问题具体分析”。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。

**（二）试验研究策略**

致畸试验主要针对胚胎-胎仔发育毒性的评价；而扩展一代生殖发育毒性试验和两代生殖发育毒性试验均主要考察亲代生殖系统以及子代的发育毒性。

扩展一代生殖发育毒性试验和两代生殖发育毒性试验选择其中一种即可。两种方法各有优缺点，其中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，但是面临大量的实验动物耗费。而扩展一代生殖发育毒性试验虽然减少了动物使用数量并对产后发育进行了较为全面的检测，但该方法需要试验人员对触发条件有准确果断的判断。因此，试验人员可根据不同的研究目的和自身情况选择合适的试验方法。

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。

化妆品和原料可能暴露风险途径一般有经口、经皮或吸入，生殖发育毒性试验一般选择经口暴露方式，除非经皮或经吸入暴露方式更合适，溶媒对照应采用相同的暴露途径。若设置阳性对照，其处理方式可以不同于受试物处理组。一般首次开展生殖发育毒性试验需要设置阳性对照。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（如环磷酰胺可引起生育力降低、胎仔发育缺陷，维A酸引起神经系统、骨骼和心血管系统缺陷，丙硫氧嘧啶可致甲状腺肿等）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，仅在有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 Test No. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Paris: OECD Publishing; 2001.

2. OECD. Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Paris: OECD Publishing;2018.

3. OECD. Test No. 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, Paris: OECD Publishing;1995.

4. OECD. Guidance Document 117 on the Current Implementation of Internal Triggers in Test Guidance 443 for an Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, In the United States and Canada No. 117, ENV/JM/MONO;2011.

5. OECD.Test No. 424: Neurotoxicity Study in Rodents, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Paris: OECD Publishing;1997.

6. OECD. Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Paris: OECD Publishing; 2007.

7. United Nations. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva.

8. Gallavan RH, Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reproductive toxicology (Elmsford, NY). 1999;13(5):383–90.9. Moore NP, Beekhuijzen M, Boogaard PJ, Foreman JE, North CM, Palermo C, et al. Guidance on the selection of cohorts for the extended one-generation reproduction toxicity study (OECD test guideline 443). Regulatory toxicology and pharmacology. 2016;80:32–40.

10. OECD.Guidance Document Supporting OECD Test Guideline 443 on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Test No. 151. ENV/JM/MONO;2013.

11. 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.

12. 国家药品监督管理局，化妆品安全评估技术导则（2021年版），2021.04.

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（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。