

附件三

药物生殖毒性研究技术指导原则

药物生殖毒性研究技术指导原则

一、概述

生殖毒性研究 (Reproductive toxicity study) 是药物非临床安全性评价的重要内容, 它与急性毒性、长期毒性、遗传毒性等毒理学研究有着密切的联系, 是药物进入临床研究及上市的重要环节。拟用于人体的药物, 应根据受试物拟用适应症和作用特点等因素考虑进行生殖毒性试验。

在药物开发的过程中, 生殖毒性研究的目的是通过动物试验反映受试物对哺乳动物生殖功能和发育过程的影响, 预测其可能产生的对生殖细胞、受孕、妊娠、分娩、哺乳等亲代生殖机能的不良影响, 以及对子代胚胎-胎儿发育、出生后发育的不良影响。生殖毒性研究在限定临床研究受试者范围、降低临床研究受试者和药品上市后使用人群的用药风险方面发挥重要作用。

本指导原则适用于中药、天然药物和化学药物的生殖毒性研究。

本指导原则重点阐述动物生殖毒性试验中动物、给药剂量、给药方法、试验方案选择的基本原则, 并介绍一些常用的试验方案; 对所获得数据进行分析及评价要求; 以及所涉及的科学原理与背景。

二、基本原则

(一) 实验管理

药物的生殖毒性试验属于非临床安全性评价研究, 根据《中华人民共和国药品管理法》的规定, 必须执行《药物非临床研究质量管理规范》。

(二) 具体问题具体分析

生殖毒性试验的设计, 应在对受试物认知的基础上, 遵循“具

体问题具体分析”的原则。应根据受试物的结构特点、理化性质、已有的药理毒理研究信息、适应症和适用人群特点、临床用药方案等选择合理的试验方法，设计适宜的试验方案，并综合上述信息对试验结果进行全面分析评价。

(三) 随机、对照、重复

生殖毒性试验应符合一般动物试验的基本原则，即随机、对照和重复。

三、基本内容

(一) 总体考虑

1、受试物

1.1 中药及天然药物

生殖毒性试验的受试物应能充分代表临床研究受试物或上市药品，因此受试物应采用制备工艺稳定、符合临床研究质量标准规定的样品，一般用中试样品，并注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等。如不采用中试样品，应有充分的理由。如果由于给药容量或给药方法限制，可采用原料药进行试验。试验中所用溶媒和/或辅料应标明批号、规格及生产厂家。

1.2 化学药物

生殖毒性试验的受试物应采用制备工艺稳定、符合临床研究用质量标准规定的样品，并注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等，并附有研制单位的自检报告。所用辅料、溶媒等应标明批号、规格和生产厂家，并符合试验要求。

2、受试物药代动力学研究

在开始生殖毒性试验前，掌握一些受试物药代动力学方面的信

息，对于是否应进行动物种属选择、试验设计与给药方案的调整等有重要提示作用。这些药代动力学信息可能来源于非妊娠或非哺乳期动物。在进行结果评价时，可能有必要进一步研究妊娠或哺乳期动物的药代动力学情况。（**注释 1**）

3、试验系统

3.1 实验动物

应采用哺乳动物进行生殖毒性试验。在选择动物种属和品系时，应考虑动物的背景资料、实用性、与人的相关性等。应从受试物、采用的试验方案和阐明试验结果的角度考虑所选择动物种属和品系的优缺点（**注释 2**）。

通常应采用与其他毒理学试验相同的动物种属和品系，这样与其他毒理学试验结果具有可比性，并可能避免进行过多的预试验。大鼠实用性好、与其他试验结果的可比性高并已积累了大量的背景资料，因此可作为生殖毒性试验首选的啮齿类动物。

在胚胎-胎仔发育毒性研究中，一般还需要采用第二种哺乳动物，其中家兔已积累了丰富的背景资料，且容易获得和实用，因此家兔为优先选用的非啮齿类动物。家兔不适合时，可根据具体情况，选择另一种可替代的非啮齿类动物或第二种啮齿类动物。

通常选用年轻、性成熟的成年动物，雌性动物未经产。个体动物初始体重不应超出平均体重 $\pm 20\%$ 。

动物应符合国家有关规定的等级要求，来源、品系、遗传背景清楚，并具有实验动物质量合格证。

3.2 其他试验系统

其他试验系统指哺乳动物或非哺乳动物的细胞、组织、器官，体外或体内培养体。这些系统的试验结果有助于作用机理的分析，

但它们缺乏发育过程的复杂性以及母体与生长机体（胚胎）间动态的相互变化。这些系统不能明确排除某一作用，也不能对其危险性/暴露情况进行推测。这些试验系统尚不能替代目前生殖毒性试验常用的整体动物（**注释 3**）。

4、给药

4.1 剂量选择

4.1.1 中药及天然药物

可根据已有的研究资料（药理、急性毒性和长期毒性、药代动力学研究）或预试验以及受试物的理化性质和给药途径来进行剂量设计。为观察量效关系，至少应设三个剂量组，必要时可增加剂量组。高剂量应出现一些轻微的母体毒性反应，或为最大给药量/最大耐受量。低剂量应为生殖毒性方面的“未观察到不良反应的剂量水平（NOAEL）”。

4.1.2 化学药物

可根据已有的研究资料（药理、急性毒性和长期毒性、药代动力学研究）或预试验以及受试物的理化性质和给药途径来选择高剂量，高剂量范围内应该出现一些轻微的母体毒性反应，在大多数情况下，1g/kg/天为最大给药限量。低剂量应为生殖毒性方面的NOAEL。高剂量与低剂量间根据具体情况可设计1~2个剂量，以观察可能的剂量反应关系。（**注释 4**）

4.2 给药途径

一般情况下，给药途径应与临床拟用途径一致。如果拟用途径有多种，若研究提示不同给药途径的药代动力学特点（包括分布）类似，建议采用暴露量较高的给药途径。此外，腹腔注射时可能会对子宫或胎仔产生直接作用，故采用妊娠动物进行试验时，一般不

用该途径。（**注释 5**）

4.3 给药频率

通常每天给药 1 次。但应参考药代动力学参数、预期临床给药情况增加或减少给药次数。

4.4 对照组

应设赋形剂对照组，其给药途径、频率应与受试物组相同。当赋形剂可能产生作用或影响受试物的作用时，应另设空白对照组。

此外，根据具体情况考虑是否设阳性对照组，如新的动物系统、较长时间未进行过试验、新的试验设施等。

（二）试验方案

1、试验方案选择的一般考虑

在选择试验方案时，应借鉴受试物已有的或同类药物的药理、毒理和药代动力学资料，特别是在生殖毒性方面的信息。建议优先考虑采用较为成熟的试验设计方案。对大多数药物而言，三段试验方案（常用的试验方案）通常比较合适，能够识别有可能发生损害的生殖发育阶段。但根据具体药物情况的不同，也可选择其他能充分反映受试物生殖毒性的试验方案（**注释 6**），如单一试验设计或两段试验设计等。无论采用哪种试验方案，各段试验之间（给药处理）不应留有间隔，并可对生殖过程的各阶段进行直接或间接评价。应说明所选择试验方案的合理性。

当观察到某一作用时，应根据具体情况进行进一步的后续试验，以明确其毒性的性质、范围和原因等，包括判断其剂量-反应关系，以有助于风险评估，并有助于区分给药所致影响与偶发情况（**注释 7**）。

联合进行多项生殖毒性试验时，应注意在动物成年期和从受孕

到幼仔性成熟的发育各阶段给药。为发现给药所致的速发和迟发效应，试验观察应持续一个完整的生命周期，即从某一代受孕到其下一代受孕间的时间周期。为方便试验，可将一个完整生命周期过程分成以下几个阶段（**注释 8**）：

A. 从交配前到受孕（成年雄性和雌性生殖功能、配子的发育和成熟、交配行为、受精）。

B. 从受孕到着床（成年雌性生殖功能、着床前发育、着床）。

C. 从着床到硬腭闭合（成年雌性生殖功能、胚胎发育、主要器官形成）。

D. 从硬腭闭合到妊娠终止（成年雌性生殖功能、胎仔发育和生长、器官发育和生长）。

E. 从出生到离乳（成年雌性生殖功能、幼仔对宫外生活的适应性、离乳前发育和生长）。

F. 从离乳到性成熟（离乳后发育和生长、独立生活的适应能力、达到性成熟的情况）。

2、常用的试验方案

常用的试验方案相当于对下述各阶段影响的联合研究：生育力和早期胚胎发育、胚胎-胎仔发育、围产期发育（包括母体功能）。

2.1 生育力与早期胚胎发育毒性试验（I 段）

2.1.1 试验目的

包括上述生命周期的 A 阶段和 B 阶段，对雌雄动物由交配前到交配期直至胚胎着床给药，以评价受试物对动物生殖的毒性或干扰作用。评价内容包括配子成熟度、交配行为、生育力、胚胎着床前阶段和着床等。对于雌性动物，应对动情周期、受精卵输卵管转运（tubal transport）、着床及胚胎着床前发育的影响进行检查。对于雄

性动物，应观察生殖器官组织学检查方法可能检测不出的功能性影响(如性欲、附睾精子成熟度等)。

2.1.2 动物选择

至少采用一种动物，推荐用大鼠。动物数应满足数据分析的需要，通常大鼠不少于 20 只/性别/组 (**注释 9**)。

2.1.3 给药期

一般情况下，交配前给药期可定为雄性动物 4~10 周，雌性动物 2 周；雄性动物给药期应持续整个交配期直至被处死，雌性动物至少应持续至胚胎着床(妊娠第 6~7 天)。应对交配前给药期长短的选择进行说明并提供依据 (**注释 10**)。

2.1.4 动物处理

建议雌雄动物按 1:1 交配。一般情况下，雌性动物在妊娠第 13~15 天处死，雄性动物在交配成功后处死 (**注释 11**)。

2.1.5 观察指标

试验期间：

- 体征和死亡情况，至少 1 次/天
- 体重和体重变化，至少 2 次/周(**注释 12**)
- 摄食量，至少 1 次/周(交配期除外)
- 交配期间至少每日进行阴道涂片检查，以检查是否对交配或交配前时间有影响
- 其他毒性研究中已证明有意义的指标

终末检查：

- 剖检所有亲代动物
- 保存肉眼观察出现异常的器官，必要时进行组织学检查，

同时保留足够的对照组动物的相应器官以便比较

- 保存所有动物的睾丸、附睾或卵巢、子宫，必要时进行组织学检查，根据具体情况进行评价
- 建议计数附睾中的精子数并进行精子活力检查
- 计数黄体数，活胎、死胎、吸收胎并计算着床数(**注释 12**)

2.2 胚胎-胎仔发育毒性试验 (II 段)

2.2.1 试验目的

包括上述生命周期的 C 阶段至 D 阶段，妊娠动物自胚胎着床至硬腭闭合给药，评价药物对妊娠动物、胚胎及胎仔发育的影响。

评价内容包括妊娠动物较非妊娠雌性动物增强的毒性、胚胎胎仔死亡、生长改变和结构变化等。

2.2.2 动物选择

试验通常采用两种动物：一种为啮齿类动物，推荐用大鼠；另一种为非啮齿类动物，推荐用家兔。应说明动物选择的合理性。

(**注释 13**)

妊娠动物数应满足数据分析的需要，通常大鼠不少于 20 只/组，家兔不少于 12 只/组 (**注释 9**)。

2.2.3 给药期

由胚胎着床到硬腭闭合(即到 C 阶段末)给药。通常，大鼠为妊娠第 6~15 天给药，家兔为妊娠第 6~18 天给药。

2.2.4 动物处理

在大约分娩前处死并检查雌性动物，正常情况下，大鼠约为妊娠第 20/21 天，家兔约为妊娠第 28/29 天。检查所有胎仔的存活和畸形情况。

当所用技术方法要求分别检查软组织和骨骼改变时，最好是每窝分配 50%的胎仔进行骨骼检查。不管使用何种方法，至少应对 50%的大鼠胎仔进行内脏检查。对于家兔，检测软组织改变，采用新鲜显微解剖技术较适合，此时，100%的家兔胎仔需进行软组织和骨骼检查。

在评价胎仔的内脏和骨骼异常情况时，若高剂量组与对照组无显著性差异，一般不需要对中、低剂量组动物进行检查。但建议保存固定的标本以备检查。

2.2.5 观察指标

试验期间：

- 体征和死亡情况，至少 1 次/天
- 体重和体重变化，至少 2 次/周(**注释 12**)
- 摄食量，至少 1 次/周
- 其他毒性研究中已证明有意义的指标

终末检查：

- 剖检所有成年动物
- 保存肉眼观察出现异常的器官，必要时进行组织学检查，同时保留足够的对照组动物相应器官以便比较
- 计数黄体数，活胎、死胎、吸收胎并计算着床数(**注释 12**)
- 胎仔体重，胎仔顶臀长
- 胎仔异常（包括外观、内脏、骨骼）
- 胎盘肉眼观察

2.3 围产期毒性试验 (III 段)

2.3.1 试验目的

包括上述生命周期中的 C 阶段至 F 阶段, 检测从胚胎着床到幼仔离乳给药对妊娠/哺乳的雌性动物以及胚胎和子代发育的不良影响; 由于对此段所造成的影响可能延迟, 试验应持续观察至子代性成熟阶段。

评价内容包括妊娠动物较非妊娠雌性动物增强的毒性、出生前和出生后子代死亡情况、生长发育的改变以及子代的功能缺陷, 包括 F₁ 代的行为、性成熟和生殖功能。

2.3.2 动物选择

至少采用一种动物, 推荐用大鼠。妊娠动物数应满足数据分析的需要, 通常大鼠不少于 20 只/组 (**注释 9**)。

2.3.3 给药期

雌性动物给药期应从胚胎硬腭闭合至哺乳结束(即上述生命周期中的 C 阶段至 E 阶段), 通常, 大鼠为妊娠第 15 天至离乳 (出生后第 21 天)。

该段试验并不完全包括由离乳期至青春期阶段给药, 也不研究育龄期缩短的可能性。为了检测可能用于婴幼儿和儿童期药物的不良影响, 应考虑具体情况, 选择特定年龄段子代直接给药, 进行相关试验研究。

2.3.4 动物处理

雌性动物分娩并饲养其子代至离乳, 每窝选择雌、雄子代各 1 只, 饲养至成年, 然后进行交配检测其生殖能力。

2.3.5 观察指标

试验期间(母体动物):

- 体征和死亡情况，至少 1 次/天
- 体重及体重变化，分娩前至少 2 次/周 (**注释 12**)
- 摄食量，分娩前至少 1 次/周
- 其他毒理研究中已证明有意义的指标
- 妊娠期
- 分娩

终末检查 (用于母体，可行时也用于子代):

- 剖检所有成年动物
- 保存肉眼观察出现异常的器官，必要时进行组织学检查，同时保留足够的对照组动物相应器官以便比较
- 着床(**注释 12**)
- 畸形
- 出生时存活的子代
- 出生时死亡的子代
- 子代出生时体重
- 离乳前后的存活率和生长/体重，性成熟程度和生育力，应说明是否进行了窝仔动物剔除
- 体格发育(**注释 14**)
- 感觉功能和反射(**注释 14**)
- 行为(**注释 14**)

3、其他试验方案

可根据受试物、拟用适应症及临床用药等特点，综合考虑其他试验方案，以全面、合理地反映受试物的生殖毒性特点 (**注释 6**)。以下为可采用的其他试验方案的两个例子。此外，能全面、合理地反映受试物生殖毒性特点的试验方案也是可以接受的。

3.1 单一（全程）试验设计（啮齿类动物）

如果将生育力和围产期试验连贯在一起全程给药，则可对生殖过程从 A 到 F 各阶段的情况进行评价。假如该试验中包括了对胎仔的检查，且在足够高的给药剂量下得出了明确的阴性结果，可不再进行进一步的啮齿类动物生殖毒性试验。

胎仔结构异常检查也可在附加的一项（或多项）胚胎-胎仔发育试验中进行，而成为两段试验。

此外，还应进行第二种动物胚胎-胎仔发育影响试验。推荐采用家兔。

3.2 两段试验设计（啮齿类动物）

如果其中包括对胎仔的检查，最简单的两段试验设计为生育力试验和围产期试验。目前研究认为，如果受试物在动物中的暴露量达到人体暴露量以上的足够范围时，围产期试验中并未发现其对产前发育有影响，那么在大多数情况下，再进行胎仔检查也不能显著改变其危险性评价的结果。

生育力试验中雌性动物给药期可持续至胚胎硬腭闭合，并参照胚胎-胎仔发育试验中的方法对胎仔进行检查。这种与围产期试验联合考虑的两段试验设计，可进行“常用的试验方案”中要求的所有检查。

此外，还应进行第二种动物胚胎-胎仔发育影响试验。推荐采用家兔。

（三）毒代动力学

本指导原则中的毒代动力学，系指结合生殖毒性试验进行的考察药物系统暴露的代谢动力学研究。毒代动力学可以描述实验动物的系统暴露与暴露剂量、暴露时间和毒理学结果之间的关系。本指

导原则中毒代动力学研究的主要目的在于分析生殖毒性试验的结果，并利于不同的毒理学试验结果间进行科学合理的比较，为临床用药的风险评估提供参考。

毒代动力学试验应选择合适的时间点采样测定，从而获得药时曲线下面积（AUC）、峰浓度（ C_{max} ）、达峰时间（ T_{max} ）等参数。某些药物应结合药物血浆蛋白结合率来评价系统暴露量。毒代动力学数据可以来自生殖毒性试验的全部动物，也可以来自部分动物。毒代动力学数据应包括胎仔/幼仔数据，以评价药物和/或代谢产物能否通过胎盘屏障、能否通过乳汁分泌。此部分动物可以包括低、中、高剂量组的动物，以便估算高剂量药物在动物体内的动力学过程是否属非线性动力学过程。

建议创新性药物进行毒代动力学研究。

四、结果分析与评价

动物生殖毒性试验的最终目的在于预测人体可能出现的生殖、发育相关的毒性反应。试验结果的分析 and 评价是试验的必要组成部分，应对研究结果进行科学和全面的分析和评价。

（一）统计分析

选用合适的统计方法，对数据进行分析。应说明所选用统计学方法的合理性。

“显著性”检验可帮助分析试验结果。结果解释本身必须以生物学的合理性为依据。仅仅因为没有“统计学意义”而认为与对照组结果的差别并非生物学因素所致的推论可能是错误的。从某种程度上讲，认为有“统计学意义”的差别一定与生物性因素有关也可能是错误的。特别是对那些呈偏态分布的低发生率的异常表现（例如，

胚胎死亡、畸胎)，相关各变量的可信区间可提示可能的作用大小。应用统计学程序时，应考虑组间比较所采用的指标单位：通常用窝而不是胎仔个体为单位，若亲代两种性别动物均给药，则用交配对（也即两代试验研究中亲代的配对）为单位。

(二) 数据报告

建议将试验数据制成表格，以说明每只动物的试验结果。试验组总体数据的表达形式从生物学角度看是合理的（即避免不真实的精确度），并反映变量的分布情况。各试验数据（如体重、摄食量、每窝的相应数据）制成的附录或表格应尽可能简明，用绝对值而不是计算值来表示各数据；应避免不必要的重复。

对低发生率的观察结果（如体征、尸解发现、畸形等）制表时，建议将阳性的几个试验数据一同列表。尤其是针对结构改变（胎仔畸形）的数据，应该在表格中清楚地标明出现异常胎仔的窝号和各窝受影响的胎仔（号），并写明受影响各胎仔被观察到的全部改变。如果必要，可根据异常改变的类型从原始表中总结出其他派生的表格。

(三) 结果分析

通常情况下，应对受试物在动物中表现出来的生殖和发育两方面的毒性进行分析评价。如果出现阳性的生殖毒性或发育毒性结果，应评估人体中出现生殖毒性和发育毒性风险的可能性，这些阳性的毒性结果可能是在生殖毒性或一般毒性试验中出现的，也可能是在人体研究中出现的。以下为常规需要分析评价的毒性：

1、生殖毒性

生殖毒性为可能影响 F_0 代生殖能力的结构和功能性改变，包括对生育力、分娩和哺乳的毒性影响等。

生育力 与给药相关的雄性生殖毒性可表现为生殖器官的退变或坏死、精子计数减少、精子活力或形态学改变、交配行为异常、不能交配、内分泌功能改变或总体生育力降低。与给药相关的雌性生殖毒性可表现为生殖器官损伤、配子成熟和释放相关的内分泌调节改变、交配行为异常、不能交配或总体生育力降低。

分娩 对动物产程和分娩的影响可表现为分娩起始和持续时间的改变。分娩持续时间通常报告为平均每胎耗时，或总分娩时间。

哺乳 哺乳期给药后，可能对幼仔产生暴露，也可能改变母鼠的哺乳过程（乳汁质量和数量）或改变母鼠的哺乳行为。

2、发育毒性

发育毒性为对 F₁ 代的毒性影响，包括死亡、畸形（结构异常）、生长异常和功能性毒性等。

死亡 由于发育毒性导致的死亡可能发生于自妊娠早期到离乳后的任何时间（“胚胎-胎仔死亡”仅是发育毒性所致死亡的一种）中。阳性结果可能表现为着床前或着床后丢失、早期或晚期吸收、流产、死产、新生仔死亡或离乳后死亡。

畸形 即通常所指的结构异常，表现为子代骨骼或软组织畸形或变异。

生长异常 通常表现为生长迟滞，有时生长过快或早熟也被认为是生长异常。评估生长速率的最常用指标为体重，同时也可测定顶臀长、肛门与生殖器间距离等。

功能性毒性 包括任何正常生理或生化功能的持续改变，但通常仅测定神经行为和生殖功能。常规测定指标包括自主活动、学习记忆、反射、性成熟时间、交配行为和生育力。

3、其他

很多情况下，亲代和子代所表现出来的生殖毒性可能是母体毒性所继发的。应结合相关毒性研究结果，如长期毒性研究等，判断表现出来的生殖毒性是否为母体毒性的继发结果。

(四) 综合评价

生殖毒性研究是药物安全性评价与药物整体开发进程的一个有机组成部分。生殖毒性研究不能与药效学、药代动力学和其他毒理学研究割裂，试验结果应力求与其他药理毒理试验结果互为印证、说明和补充。

在对生殖毒性试验结果进行评价时，应结合以下信息进行综合分析：（1）受试物的药学特点；（2）药效学、药代动力学和其他毒理学研究的结果，特别是长期毒性试验和遗传毒性试验结果；（3）临床研究受试者人群特征以及已取得的临床研究的结果。中药、天然药物还应结合处方组成特点、方中药味毒性情况、临床应用背景情况等进行分析。

试验结果的评价最终应落实到临床研究受试者范围限定、风险效益评估以及必要防治措施的制定和应用上。

五、生殖毒性研究的阶段性

1、化学药物

根据受试物、拟用适应症特点，特别是临床研究受试人群的特点，可分阶段提供生殖毒性研究资料支持不同阶段的临床研究。通常情况下，应在临床研究开始前提供完整的生育力与早期胚胎发育毒性试验、胚胎-胎仔发育毒性试验资料，围产期毒性试验资料可在上市申请时提供。

但是，在一些特殊情况下，可能会需要提前提供相关生殖毒性

研究资料，例如用于育龄人群并可能对生殖系统产生影响的新药（如避孕药、性激素、治疗性功能障碍、促精子生成药以及致突变试验阳性或有细胞毒作用等的新药）；而在另外一些情况下可能会适当延迟提交相关生殖毒性研究资料的时间，例如用于晚期恶性肿瘤或艾滋病的药物等。上述特殊情况下需要进行的生殖毒性试验内容也需要根据具体情况来确定。（**注释 15**）

2、中药及天然药物

新的有效成分及其制剂、新的中药材及其制剂，可参考化学药物要求分阶段提供生殖毒性研究资料支持不同阶段的临床研究。

对于其他需进行生殖毒性研究的中药、天然药物，如用于育龄人群并可能对生殖系统产生影响的新药（如避孕药、性激素、治疗性功能障碍、促精子生成药、保胎药以及致突变试验阳性或有细胞毒作用等的药物），应根据具体情况提供相应的生殖毒性研究资料，这时需根据具体情况来确定生殖毒性试验内容及进行的时间。

在一些情况下可能会适当延迟提交相关生殖毒性研究资料的时间，例如用于晚期恶性肿瘤或艾滋病的治疗药物等。

六、参考文献

1、生殖毒性试验。见：新药（西药）临床前研究指导原则汇编（药理学、毒理学）。中华人民共和国卫生部药政局，1993:216-217

2、生殖毒性和发育毒性。见：周宗灿主编，毒理学基础，第二版。北京医科大学出版社。北京，2000: 128-143

3、ICH Steering Committee. Harmonised Tripartite Guideline S5A: Detection of toxicity to reproduction for medicinal products.

4、ICH Steering Committee. Harmonised Tripartite Guideline S5B: Maintenance of the ICH guideline on toxicity to male fertility.

5、ICH Steering Committee. Harmonised Tripartite Guideline M3: Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals.

6、生殖发生毒性试验。见：日本临床前研究指导原则解说。药事日报社，2002：49-62

7、Omori Y. Principles and guidelines a review of recommendations (on detection of toxicity) in the three regions. In: P.F. D' Arcy and D.W.G. Harron edited, Proceedings of the First International Conference on Harmonization. Brussels 1991: 256-266

8、EEC guidelines: Detection of toxicity to reproduction for medicinal products including toxicity to male fertility.

9、FDA. Reviewer guidance: Integration of study results to assess concerns about human reproductive and developmental toxicities.

七、著者

《药物生殖毒性研究技术指导原则》课题研究组。

八、相关注释

注释 1：妊娠动物的药代动力学

由于妊娠和哺乳期动物存在生理方面的迅速变化，其药代动力学可能出现改变，最好采用分段（分二段或三段）的研究方法。在制定试验研究计划的过程中，药代动力学资料（常来源于非妊娠动物），可为判断动物种属的总体适用性提供信息，也可有助于研究

方案的确立和剂量的设定。在试验过程中，药代动力学研究可以为设定给药剂量提供参考，也可提示其与预期结果是否存在明显偏差。

注释 2：动物选择

应注意选用与人类相关的动物。如果已有的药代动力学、药理毒理研究信息能显示某种属与人类相关，则可仅采用此一种动物进行试验。如果某一种属动物未表现出（与第一种动物相同的）与人类的相似性，则将其选作第二种动物的价值很小。

所有的动物种属都有其优点，例如，大鼠，其次是小鼠，都可用作进行生殖毒性研究通用的较佳动物种属。家兔作为非啮齿类动物用于胚胎毒性研究，也可用于生育力研究。家兔和犬的精液样品可不借助于痛苦性的技术（如电刺激采精）而获得，可用于精液分析研究。

其他大多数动物种属通常不适合用于生殖毒性研究，这些动物可能仅仅适合用于进行某些特定的试验研究。

所有动物种属都有其不足之处，例如：

大鼠：对性激素敏感；不适合用于多巴胺受体激动剂的研究，因其早期妊娠的发生和维持所依赖的激素主要是催乳素；妊娠后期对非甾体抗炎药高度敏感。

小鼠：代谢率高，易惊、群体畸形现象（所有种属动物均会出现）特别明显，胎仔小。

家兔：常缺乏药代动力学和毒理资料，对一些抗生素和消化道功能紊乱敏感，临床表现的解释较困难。

豚鼠：常缺乏药代动力学和毒理资料，对一些抗生素和消化道功能紊乱敏感，胎仔发育期长，历史背景资料不足。

家猪和/或小型猪：群体畸形的背景情况多变，所需的受试物量大，

需要较大饲养空间，历史背景资料不足。

白鼬：如果不采用特殊的管理系统，只能季节性繁殖（其成功与否主要取决于人和动物的相互影响），历史背景资料不足。

仓鼠：静脉给药虽非不可能，但相当困难，会将受试物存于颊部小囊中而影响实际给药量，攻击性非常强，对肠道功能紊乱敏感，对许多受试物有过度敏感的致畸反应，胎仔小。

犬：季节性繁殖，多近亲繁殖，历史背景资料不足。

非人灵长类动物：与其他种属动物一样，其药代动力学情况与人不同，历史背景资料不足，常常因为其只数太少而难以进行危险性评估。更适合用于进行明确生殖毒性物质（该毒性已比较肯定）特性的试验研究，而不是评估其危险性。

注释 3：整体动物以外的其他试验系统

已经建立了一些整体动物以外的其他试验系统，并在预试验研究（“预筛选”或“优先选择”）和后续试验研究中采用。为对同系的一组受试物进行预试验，研究清楚其中至少一种受试物对整体动物的可能作用较为重要（可推断其作用）。据此，可选择一些受试物进行更进一步的试验。

从后续研究或进一步明确受试物的作用特征上考虑，其他试验系统可能有助于详细研究某些可观察到的发育过程，例如，揭示具体毒性机理、明确（药物）浓度-反应关系、选择“敏感（生长发育）阶段”，或检测已知代谢产物的作用。

注释 4：剂量选择

剂量选择是生殖毒性试验设计的关键问题之一。可根据已有的研究资料来选择高剂量，如果已有资料信息不足，应进行预试验。大约 2~4 周重复给药毒性试验研究的周期，与各段生殖毒性研究设

计的很接近。若选择与重复给药毒性研究相似的剂量，可参考全身毒性表现，以分析对生育力方面的影响。

生殖毒性研究中存在许多可变因素，剂量-反应关系趋势的存在与否，是判断效应与药物相关性的一个关键性依据。由于剂量-反应关系曲线可能是陡直的，故不建议设计宽的剂量间距。若试图通过一项研究来分析效应的剂量-反应关系，应至少设三个剂量组和适当的对照组。若还不能确定其剂量-反应关系，应增设剂量组，避免剂量间距过大，并应确定生殖毒性方面“未观察到不良反应的剂量水平”。

在剂量选择时参考药代动力学研究结果是重要的，若剂量的增加并不导致血浆和组织中浓度的升高，则增加剂量的意义很小。剂量间距的大小取决于药代动力学和其他毒性研究结果。应优先考虑尽量小的剂量间距。

注释 5：给药途径选择

通常，给药途径与临床拟用途径一致，但如果药代动力学研究结果显示，某种给药途径下机体中的暴露量（如 AUC）更高，此时，选用暴露量更小或实际操作相当困难的给药途径（如吸入给药）的意义可能较小。

经口给药，通常使用灌胃给药法。掺食法（饲料/饮水）给药时，往往达不到预期剂量或不能准确给药，因此一般不采用。

注射给药，应注意受试物的性状及其局部安全性。静脉注射时，应注意控制注射速度，防止药液泄漏。腹腔注射时可能会对子宫或胎仔直接产生作用，故采用妊娠动物进行试验时，一般不用该途径。

有时也可采用皮下或肌肉注射途径。

对于临床上局部应用（皮肤、眼、耳等）的受试物，可采用其他的给药途径替代。皮肤给药时，应避免动物舔食、与笼子摩擦和剃毛时的皮肤损伤。皮肤给药的替代途径，可采用吸收途径类似的皮下注射。

当选择的给药途径与临床拟用途径不同时，应说明依据。

注释 6：试验方案选择

对于化学药物来说，如果给药剂量达 2g/kg 而不致死，且重复给药毒性试验剂量达 1g/kg 时未出现毒性，可仅进行单项包括两代的生殖毒性试验，包括两受试物组（0.5 g/kg 和 1.0 g/kg）与一个对照组。但应关注种属动物选择的合理性以及受试物有效性。

此外，对多巴胺受体激动剂或减少循环中催乳素水平的受试物，雌性大鼠为较差的模型动物，而家兔可能是用于上述受试物所有生殖毒性研究的更好的动物种属，但目前似乎尚未进行这种尝试。若有证据显示家兔的代谢方式比大鼠与人更接近，则家兔也可用于其他类型受试物的生殖毒性研究。

注释 7：常规试验与后续试验

常规试验（指导原则规定的试验）在不同程度上具有难以判断的特点，即对某一指标影响的产生，可能有多种不同原因。例如，出生时每窝幼仔数的减少可能是因为排卵率（黄体数）的减少、着床前死亡率的提高，或因为着床后死亡率或出生后立即死亡率的增加所致。而上述死亡可能是其早期胎体畸形的后果，由于随后的继发性改变等原因，该畸形不能够再观察到。尤其是那些在对照组中已表现出的低发生率的反应，给药所致影响与偶然出现的情况间的区别，就要根据其与其他类型影响的关系来判断。因此，若发现对某一指标的影响，应考虑进行后续试验以探索其可能的联系，明确其

毒性的性质、范围和原因，也包括判断其剂量-反应关系以便有助于其危险性评价。这不同于常规试验的情况，此时剂量-反应关系存在与否，将有助于区别给药所致影响与偶然情况的不同。

注释 8：计时方法

本指导原则中，妊娠的计时方法为以观察到阴道涂片精子阳性和/或阴栓的日期计为妊娠第 0 天。大鼠和家兔的着床发生在妊娠的第 6~7 天，硬腭闭合在第 15~18 天。

其他计时方法也可接受，但必须在报告中明确说明。另外，研究者必须在不同的研究中保持计时方法的一致性，以确保给药过程中不出现空隙。建议在相关研究的给药期之间，应设计至少一天的重叠期。

交配时间会影响胎仔和幼仔相关参数的变异性，应确认准确的交配时间。

通常，幼仔动物的出生日即计为产后或哺乳的第 0 天。可借助准确的交配日期来判断是否出现分娩延迟或滞产。

注释 9：动物数

对动物数的要求，总体原则是满足数据分析的需要。考虑到国内的现实情况，本指导原则中仍然保留了对动物数的最低要求。该要求主要参考了 ICH 相关会议纪要中美国、欧盟、日本对动物数要求。

注释 10：给药时间

生育力试验，尤其减少雄性动物交配前给药期，应根据前期试验所积累的资料以及对精子发生过程基础研究的再评价而设计（对精子发生的研究以往尤其要求较长的交配前给药期）。但选择性影响雄性生殖功能的受试物是罕见的，通过与雌性动物交配来观察受试物对精子发生影响这一方法是不灵敏的；而充分的雄性动物生殖

器官病理学和组织病理学检查(如通过 Bouin's 固定、石蜡包埋、睾丸 2~4 μm 横切片, 附睾纵切片, PAS 和苏木素染色)则是检查对精子发生的影响的一种更为敏感和快捷的方法。影响精子发生的受试物一般作用于分裂后期。尚无仅通过雄性动物给药 9~10 周并与雌性交配, 来发现雄性生殖方面毒性的有说服力的例子(试验)。生育力试验可对重复给药毒性试验中组织学检查不能观察到的受试物对雄性生育力的功能性影响, 以及对雌雄动物交配行为的影响进行评价。

重复给药试验可提供受试物对精子发生的潜在影响的信息。评价对精子的影响应参考至少 1 个月的重复给药毒性试验的结果。如果在 1 个月以上的重复给药毒性试验中未发现任何毒副作用, 那么在交配前雄性动物给药周期可缩短至 4 周。

已有研究显示大鼠精子发生(包括精子成熟)整个过程需 63 天, 若已有的资料提示生育力的研究范围需扩大或需明确其作用性质, 则应合理设计试验以对其进行进一步的研究。

注释 11: 动物处理

雌雄动物比例: 雌雄动物最好以 1:1 比例进行交配, 因为不管是为了取得高的受孕率还是为了避免试验结果的错误分析和阐述, 这都是最安全的方法。

交配时期和方法: 大部分实验室采用 2~3 周的交配期。在一些实验室中, 一旦阴道涂片阳性或查到阴栓即将雌性动物移走, 而另一些实验室则继续使雌雄动物同笼。大部分大鼠在同笼的最初 5 天内即可交配(在第 1 个动情期内), 但某些雌鼠可能出现假孕。在此情况下, 可将雌雄大鼠同笼约 20 天, 使雌性动物重新开始动情期以受孕。

终末处死：如果雌性大鼠在胚胎着床后停止给药，在其妊娠 13~15 天时处死，通常可满足评价对生育力和生殖功能影响的需要，例如可区分着床与吸收胎。为观察不良反应（在生育力研究中没有必要），获得后期胚胎丢失、胎仔死亡或结构畸形等资料，雌性动物一般在妊娠 20/21 天处死，雄性动物建议在交配成功后处死。结果模棱两可时，可将雄性动物与未给药的雌性动物进行交配以检查雄性动物是否有生育能力。

注释 12：观察指标

本指导原则中仅列出常规指标，应根据受试物、临床适应症、用药人群特点等具体情况，增加相关观察指标。

给药期间每日对妊娠动物称重是有意义的。对某些受试物，在非妊娠期（交配前、交配期与哺乳期）则最好每周称重 2 次以上。

对明显未妊娠的大鼠或小鼠（不包括家兔），可进行子宫硫化胺染色，以确定是否有胚胎死亡。

注释 13：胚胎-胎仔发育毒性试验中的第二种动物

通常胚胎-胎仔发育毒性带来的后果相对更为严重，故对其试验结果应更为关注。采用多种动物进行试验，在将试验结果外推至人时可能会有更为充分的试验依据。通常，胚胎-胎仔发育毒性试验需要采用至少两种动物进行，推荐采用大鼠和家兔。

注释 14：体格发育、感觉功能、反射和行为

评价体格发育的最佳指标为体重。离乳前体格发育的标志如耳廓张开、毛发生长、门齿萌出等均与胎仔体重具有高度相关性。胎仔体重与交配后时间的相关性大于体重与出生时间之间的相关性。平面翻正反射、听觉惊跳反射、空中翻正反射和对光反射等依赖于身体发育的状况。

离乳后体格发育的两项明显标志是雌鼠阴道张开和雄鼠龟头包皮腺裂开。后者与睾酮水平升高有关，而睾丸下降与睾酮水平无关。这些标志意味着性成熟的开始。

功能测试：至今为止，功能测定绝大多数为行为试验，虽然人们已在此方面花费了很多精力，但尚未找到可推荐的特异性测试方法。研究者们正努力寻找可测试感觉功能、自主活动、学习和记忆的方法。

注释 15：生殖毒性研究的阶段性

胚胎-胎仔发育毒性带来的后果相对更为严重，对该段试验结果应更为关注，如果采用多种动物进行试验，在将试验结果外推至人时可能会提供更为充分的试验依据。

考虑到目前我国的现状，由于创新药物没有或仅有较少的可以参考的资料，需要更加关注对人体安全性。为了将受试者（及其后代）的风险降至最低，并为合理用药、利弊权衡提供参考，在临床研究开始前应尽可能了解受试物对雌雄动物生殖能力、生殖器官、生殖细胞以及早期胚胎发育的影响。因此，目前要求生育力与早期胚胎发育毒性试验和胚胎-胎仔发育毒性试验在临床试验开始前完成。

在某些特殊情况下，如用于艾滋病、晚期恶性肿瘤等治疗的药物以及用于生殖控制、孕妇等特殊人群的药物，可灵活考虑生殖毒性的要求，如研究内容和具体设计、动物种属和阶段性等。

此外，在常规试验后，发现了某些不良影响，为弄清该影响的实质及其发生的机理而外推至人，进行适当的后续试验是很重要的。对于后续试验的时间安排应视具体情况灵活掌握。