

S5(R2)

**人用药品注册技术要求国际协调会
ICH 三方协调指导原则**

药品的生殖毒性和雄性生育力毒性检测

**现行 ICH 进程第四阶段
1993 年 6 月 24 日总指导原则
(2005 年 11 月整合 2000 年 11 月 9 日的附录)**

按照 ICH 进程，本指导原则由相应的 ICH 专家小组制定，已递交管理部门征询意见。在 ICH 进程第四阶段，草案被推荐给欧盟、日本和美国管理部门采用。

S5 (R2)

历史记录

最初版本	历史	日期	至2005年11月后新的版本
------	----	----	----------------

首版：药品生殖毒性检测

S5A	第二阶段：指导委员会批准，并发布以公开征询意见	1992.09.19	S5
S5A	第四阶段：指导委员会批准进入，并推荐给ICH三方的管理机构采纳	1993.06.24	S5

总指导原则附件：雄性生育力毒性

S5B	第二阶段：指导委员会批准增补版，并发布以公开征询意见	1995.03.30	列入S5 (R1)
S5B	第四阶段：指导委员会批准增补版，并推荐给ICH三方的管理机构采纳	1995.11.29	列入S5 (R1)
SB (M)	第四阶段：指导委员会批准对增补版进行轻微修改，并推荐给ICH三方的管理机构采纳	2000.09.09	列入S5 (R2)

现行第四阶段版本

S5A 和S5B (M)	总指导原则更名为S5 (R2)，添加了附件及其修订。 新题目为“药品的生殖毒性和雄性生育力毒性检测”	2005.11	S5 (R2)
-----------------	---	---------	---------

第一部分
药品的生殖毒性检测
ICH 三方协调指导原则
在 ICH 进程第四阶段由 ICH 指导委员会签署
1993 年 6 月 24 日

目 录

1. 前言

- 1.1 制定本指导原则的目的
- 1.2 研究目的
- 1.3 研究的选择

2. 动物的标准

- 2.1 种属选择及其数量
- 2.2 其他试验系统

3. 有关给药的总体建议

- 3.1 剂量
- 3.2 给药途径和给药频率
- 3.3 动力学
- 3.4 对照组

4. 推荐的研究设计——联合研究

- 4.1 最常用的研究设计
 - 4.1.1 生育力和早期胚胎发育至着床的研究
 - 4.1.2 对围产期发育影响的研究，包括对母体功能的影响
 - 4.1.3 对胚胎-胎仔发育影响的研究
- 4.2 单一研究设计（啮齿类动物）

4.3 分段研究设计（啮齿类动物）

5. 统计方法

6. 数据呈现

7. 专业术语

1. 前言

1. 1 制订本指导原则的目的

可用于药品与化学物潜在生殖毒性检测的方法有相当一部分是重叠的。作为应用更丰富的方法学以有效进行检测时的第一步，本指导原则试图根据目前常用的检测化合物的研究设计来综合出一套策略，其应鼓励评价化学物对子代发育的安全性。现已认知，在明确界定的动物生殖阶段给药可更好地反映药品在人体的暴露情况，更具体地确定在哪个生殖阶段存在危险。上述研究方法对大多数药品可能有用，而对于确实存在的长期低剂量暴露的情况，采用一代或二代的研究方法可能更好地呈现其毒性。

实际的测试策略要根据以下因素来决定：

- 药品预期的临床用途，尤其是与生殖有关的；
- 药品临床拟采用的剂型和给药途径；
- 利用其任何已有的毒性、药效、动力学方面的资料，及其他在结构/活性上类似化合物的资料。

为成功地应用本指导原则，灵活性是必要的（注释 1）。任何指导原则都不可能提供足以涵盖可能出现的所有情况的信息。研究人员都应该根据临床和动物实验的技术和伦理标准的现状，乐于探讨并考虑测试策略的变化。许多基础研究的资料对实验设计的优化有用，包括雄性生育力评价、妊娠/哺乳期动物的动力学和代谢研究。

注释 1 (1.1) 科学的灵活性

这些指导原则并不是具有强制性的法规，它们是起点而不是终点。以此为基础，研究者可根据受试物已有的资料和技术条件为检测来设计一套策略。虽然鼓励采用本文中已提出的一些替代的测试设计，实验者也可探索和设计出其他的实验设计。在设计一套策略时，主要目的是为了检测和发现任何生殖毒性的指征。

本文中未涉及研究设计和技术方法的具体细节。对一个实验室适合的技术可能不适合另一个实验室，所以这些内容应由研究者来决定。研究者应该利用好人力和资源以尽其所能，并应该知道如何做的比任何局外人更好；研究者的工作态度、能力、毅力等人文属性比物质层面的设施设备更为重要。遵从 GLP 是必要的，具体内容参见 GLP 规范。

1. 2 研究目的

生殖毒性研究的目的是为了揭示一种或多种活性物质对哺乳动物生殖功能的任何影响。为达此目的，应结合现有的所有其他药理和毒理方面的资料，进行生殖毒性研究及其结果的阐明，以确定其对人潜在生殖毒性（危险性）是大于、小于或等于其他毒性表现。而且，重复给药毒性实验可以提供有关潜在生殖毒性的重要信息，尤其是雄性生育力方面。可能的人体暴露、比较动力学和生殖毒性机理研究的资料，对将动物实验的结果外推到人类（评价其相关性）可能是有帮助的。

联合进行所选的多项生殖毒性研究时，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。为测定出给药所致的速发和迟发效应，其观察应持续一个完整的生命周期，即从某一代的受孕到其下一代受孕间的时间周期。为方便测试，可将生命周期的这一完整过程分成以下几个阶段：

- 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）。

有关的计时方法参见注释 2。

注释 2 (1.2) 计时方法

本指导原则中，妊娠的计时方法为：即使是在前一个晚上进行的交配，仍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。除非另有说明，可以假定大鼠、小鼠和家兔的着床发生在妊娠的第 6~7 天，硬腭的闭合在 15~18 天。

其他计时方法同样也可被接受，但必须在报告中作明确规定。另外，研究者必须在不同的研究中保持计时方法的一致性，以确保生命周期中不出现空隙。建议在相关研究的给药期之间，应设计至少一天的重叠期。

交配时间的准确性应予详细说明，因为它会影响胎仔和幼仔相关参数的变异性。

同样，对所饲养的幼仔动物而言，若没有特别说明，其出生日即计为产后或哺乳期的第 0 天。但是，特别是出现分娩延迟或滞产时，参考交配的时间范围来计时可能是有帮助的。

1. 3 研究的选择

本指导原则主要从检测对生殖影响的角度考虑，提出研究的设计。当观察到某一影响时，为明确该反应的性质，应该根据具体情况进行进一步的设计研究（注释 3）。应说明选择某一套研究的合理性，其中应包括剂量选择的依据。

应根据技术条件的现状并考虑已知的同类药在生殖方面的作用，对研究进行周密设计。这样可以减少动物痛苦并使用所需的最少动物数以达到所有的目的。假若完成了某初步研究，应对其结果进行考虑并在其总体评价中予以讨论（注释 4）。

注释 3 (1.3) 首批试验和后继试验

在不同程度上，所有的首批试验（指导原则中所述）从本质上讲，均具有难以判断的性质，即对某一终点产生的影响，可能有多种不同原因。例如，出生时每窝胎仔数的减少可能是因为排卵率（黄体数）的减少、较高的着床前死亡率，较高的着床后死亡率或出生后立即死亡率所致。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，该畸形不能够再被观察到。尤其是那些在对照组中已表现出的低自发率的反应，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。

一种毒性物质常常剂量依赖性地产生多种类型的影响。例如，畸形的出现几乎总是与胚胎死亡数的增加和不太严重的结构改变的发生率提高有关联。若出现对某一指标影响，应考虑进行后继实验研究以探索其可能的联系，即要明确其毒性的性质、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，这不同于首批试验的情况，此时剂量-反应关系的存在与否有助于区别给药所致影响与偶然的差异。

注释4 (1.3) 初步研究

多数生殖毒性试验在计划或开始进行的时候，往往已有急性毒性和至少一个月的重复给药毒性试验的信息。这些信息可为生殖毒性试验剂量的确定提供足够的参考。假如已完成了充分的初步研究，其结果可为确定生殖毒性主试验剂量选择的依据之一。原则上不管这些试验的 GLP 遵从性如何，都应该作为申报资料提交。这可能会避免不必要的动物消耗。

2. 动物的标准

应该明确说明所使用动物的健康状况、生育力、经产史、异常表现的发生率、胚胎和胎仔死亡情况，以及不同研究间上述动物情况的一致性。各研究内及不同研究间在开始阶段所用动物的年龄、体重和经产情况应有可比性；为符合这些要求，最简单办法是选用年轻、性成熟的成年动物与未经产雌性动物进行交配。

2. 1 种属选择及其数量

应该采用哺乳动物进行该研究。通常要求采用与其他毒理学研究相同的种属和品系。以大鼠作为主要啮齿类动物的理由是，它具有实用性好、与使用该动物获得的其他研究结果的可比性高的特点，并已积累了大量的背景资料。

只有在胚胎毒性研究中，传统上还要求采用第二种哺乳动物，其中兔为优先选用的“非啮齿”类动物，因兔已积累了丰富的背景资料，且容易获得和实用。兔不合适时，可根据具体情况考虑，选择另一种可替代的非啮齿类动物或第二种啮齿类动物（注释 5）。

注释5 (2.1) 动物种属和品系的选择

在选择生殖毒性研究用动物种属和品系时，应注意选用（与人类）相关的动物。选择已在其他毒理学研究中采用的动物种属和品系（进行生殖毒性研究），可以避免进行额外的预试验。如果提供的动力学、药理学和毒理学资料能显示所选动物种属与人类相关，则仅用一种动物就足够。如果某一种属动物未表现出与人类的相似性（与第一种动物相同），则将其选作第二种动物几乎没有价值。应从受试药、采用的试验设计和后续阐明结果的角度考虑选择动物种属（品系）的优缺点。

所有的动物种属都有其优点，例如，大鼠，其次是小鼠，都是合适的通用模型。兔作为非啮齿类动物的一种，在重复给药毒性和除胚胎毒性以外的其他生殖毒性研究动物选择时，有些不受重视。其实，兔对于生育力研究，尤其是雄性生育力研究是很有价值的动物种属。对于长期精液分析而言，和犬（常被用作慢性毒性研究的第二种动物），它们的精液样品可以不用借助痛苦性的技术（电射精）而获得。大部分其他动物种属不是合适的、通用的模型，而可能仅仅适合用于进行某些特定的研究。

所有动物种属都有其不足之处，例如：

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

小鼠：代谢率高，易惊，群体畸形现象（会出现在所有种属）特别明显，胎仔小。

兔：常缺乏动力学和毒理资料，对一些抗生素和消化道功能紊乱敏感，临床征状的解释较困难。

豚鼠：常缺乏动力学和毒理资料，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。

家养猪和/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，对许多化合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，其动力学情况与人的不同，历史背景资料不足，常常因为其动物数太少而难以检测风险。更适合用于进行以明确生殖毒性物质（该毒性已比较肯定）特性为目的的研究，而不是检测其危险性。

2. 2 其他试验系统

其他试验系统是指所有生长的哺乳和非哺乳动物的细胞系统、组织、器官，或体外或体内独立生长的培养体。若将这些系统与同系物优选或后续研究中阐明作用机理的整体动物研究结合起来考虑，能够提供非常有价值的信息，而且也可间接地减少实验动物的数量。但它们缺乏发育过程的复杂性，和母体与生长机体（胚胎）间动态的相互变化。这些系统不能明确否认某一作用的存在，也不能对其危险性/暴露情况进行推测。简而言之，这些试验系统尚不能替代目前生殖毒性研究常用的整体动物，以达到在前言中提出的研究目的（注释 6）。

注释 6 (2.2) 整体动物以外其他试验系统的应用

已经建立了一些其他试验系统，并在初步研究（“预筛选”或“优先选择”）和后续研究中采用。

在对同系的一组化合物进行初步研究时，至少已知其中一种化合物在整体动物中潜在的结果是必要的（通过推断，预期的效果）。依此策略，可选择一些化合物进行更进一步的实验。

从后续研究或进一步明确化合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。

3. 有关给药的总体建议

3. 1 剂量

剂量选择是生殖毒性研究设计的关键性问题之一。可根据全部已有的研究资料（药理、急性毒性和慢性毒性和药代研究，注释 7）来选择高剂量。2~4 周的重复给药毒性试验其给药周期与各段生殖毒性研究设计的给药周期很接近。若上述研究资料不足，建议进行预试验（注释 4）。

选定了高剂量后，应逐步向下选择其他各组的剂量，各剂量值间距的大小取决于动力学和其他毒性研究结果。为确定“未观察到不良反应的剂量水平”，应优先考虑设计尽量小的剂量间距，以揭示任何可能存在量效关系趋势（注释 8）。

注释 7 (3.1) 剂量选择

若选择与重复给药毒性研究相似的剂量，可因此通过在全身系统毒性的背景下，对生育力方面任何潜在的影响进行解释。

期望高剂量应该出现一些轻微的母体毒性反应。

就具体某化合物而言，限制生殖毒性试验给药高剂量值（已在重复给药毒性研究或生殖毒性预试验中被确定）的因素主要包括：

- 体重增长的减缓

- 体重增长的加快，尤其是该变化与体内稳态机制失调有关时
- 特殊的靶器官毒性
- 血液学、临床生化检查
- 放大的药理作用，该作用不一定表现为明显的临床反应（例如，镇静和惊厥作用）。
- 受试物的理化性质或给药剂型，以及给药途径，可能限制实际的给药量。在大多数情况下， 1g/kg/day 为最大给药限量。
- 动力学研究对确定低毒化合物高剂量给药时的全身暴露情况是有帮助的，但是，若剂量的增加并不导致血浆或组织中浓度的升高，剂量增加的意义就很小。
- 预试验中胚胎-胎仔死亡率的明显增加。

注释 8 (3.1) 剂量-反应关系的确定

生殖研究中存在许多可变因素，难以对随机误差（变异）和给药产生的作用进行区别，而剂量-效应关系趋势的存在与否，可成为判断作用由药物所致可能性大小的一个关键性依据。必须记住，这些研究中剂量与反应的关系曲线也许是陡直的，故不建议设计宽的剂量间距。若试图通过一项研究来对出现的作用进行剂量-反应关系分析，建议至少设三个剂量组和适当的对照组。如还不能肯定其量效关系，应增设第四剂量组，以免剂量间距过大。如此设计，应该可以确定生殖毒性方面“未观察到不良反应的剂量水平”。否则，就意味着应该对该受试药进行更深入的研究。

3. 2 给药途径和给药频率

一般情况下，给药途径应与临床拟用途径相似。若研究表明，不同给药途径的（药物）分布（动力学特点）情况类似，只采用一种给药途径也可以接受（注释 9）。

给药次数通常为每天一次，但也应参考动力学参数的情况增加或减少次数（注释 10）。

注释9 (3.2) 不同途径给药的暴露情况

若结果显示，某种给药途径的机体（药物）负荷量大，例如其曲线下面积（AUC）更大，就似乎没有理由去研究机体负荷量更小或实际操作相当困难的给药途径（如吸入给药）。在为一新的给药途径设计新的研究前，应根据已有的动力学资料来判断进行另一项研究的必要性。

3. 3 动力学

在开始生殖毒性研究前，最好掌握一些受试物动力学方面的信息，因其可提示是否应进行动物种属选择、研究设计、给药方案的调整。这些（动力学）资料既不要求太丰富和严谨，也不需来源于妊娠和哺乳动物。

在对其进行评价时，根据试验结果，可能有必要进一步提供妊娠或哺乳期动物的动力学信息（注释 10）。

注释10 (3.3) 妊娠动物的动力学

由于妊娠和哺乳期动物存在生理方面的迅速变化，其动力学研究可能出现一些问题。最好采用分段（二段或三段）的研究方法。在制定（生殖毒性）研究计划的过程中，动力学资料（常来源于未妊娠动物），可为判断动物种属的总体适用性提供信息，也可有助于研究设计的确立和剂量的选择。在一个研究过程中，动力学研究可以为准确的给药剂量提供保证，也可提示其与预期结果的明显偏差。

3. 4 对照组

建议对照组动物的赋形剂给药频率与受试物组的相同。当赋形剂可能产生作用或影响受试物的作用时，应另设一对照组（假处理组或不给药组）。

4. 推荐的研究设计—联合研究

应借鉴已有的受试物或类似化合物的药理、动力学、毒理资料，以确立最合理的研究策略和选择研究设计。建议首先应优先考虑采用与现有药品指导原则中的（最常用的选择）没有太大不同的研究设计。对大多数药品而言，分三段进行的研究设计通常比较合适，而由于具体情况的不同，其他研究策略、联合研究和研究设计可能与“最常用的选择”一样或更合理。总的来说，关键问题是，各段研究之间（给药处理）不应留有间隔，并允许对生殖过程的各阶段进行直接或间接的评价（注释 11）。

应证明研究设计的合理性。

注释 11 (4) 其他研究设计选择举例

对于给药剂量达 2g/kg 而不致死，且重复给药毒性试验剂量达 1g/kg 时未出现毒性的化合物，可仅进行一项包括两代的生殖毒性研究，包括两受试物组（ 0.5 和 1.0g/kg ）与一个对照组。但这可能让人怀疑选择的种属动物是否合适，或受试物是否有效。

对那些可能单次给药、终身给药一次的化合物（例如诊断药、手术用药），在任何一段时间内，临床治疗重复给药达两次以上的可能性很小，而提高给药剂量、减少给药周期的（动物试验）设计似乎更合理。对于雌性动物，从临床给药情况来考虑，胚胎期以外给药的必要性很小或没有。

对多巴胺受体激动剂或减少循环中催乳素水平的化合物，雌性大鼠为较差的模型动物，而兔可能是用于上述化合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。若有证据表明兔的代谢方式比大鼠与人更接近，则兔也可用于其他类型化合物的生殖毒性研究。

对那些重复给药后出现血浆动力学改变的药物，若采用 4.1.3 中的研究设计，其对胚胎-胎仔发育的潜在不良影响可能难以全面评估。这些情况下，可能有必要将 4.1.1 研究的给药周期延长至第 17 天。给药结束时处死动物，可评价其对生育力和胚胎-胎仔发育的影响。

4. 1 最常用的研究设计

最常选用的研究设计应该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
- 围产期发育，包括母体的功能
- 胚胎-胎仔发育

4. 1. 1 生育力和早期胚胎发育到着床的研究

研究目的

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。此研究包括对生育过程 A 段和 B 段进行评价（见 1.2）。对于雌性动物，应对动情周期、输卵管转运、着床及胚胎着床前发育进行检查。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)(注释 12)。

注释 12 (4.1.1) 交配前给药

生育力研究，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）。选择性影响雄性生殖功能的化合物颇为罕见，通过与雌性动物交配来观察受试物对精子发生影响是不灵敏

的方法；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影响的一种更为敏感和快捷的方法。影响精子发生的化合物一般作用于分裂后期。目前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）。

重复给药毒性试验可提供受试物对精子发生产生潜在影响的信息，因而使生育力试验更集中在对导致毒性的其他更直接原因的研究上。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。若已有的资料或缺乏相关资料提示生育力的研究范围需扩大或从检查扩展至明确其作用性质，则应合理设计研究以进一步明确其作用的特性。

其评价内容包括：

- 配子成熟度
- 交配行为
- 生育力
- 胚胎着床前阶段
- 着床

受试动物

至少一种动物，推荐用大鼠。

动物数量

每组各性别动物数应满足对数据进行有意义分析的需要(注释 13)。

注释 13(4.1.1,4.1.2,4.1.3) 动物数

在以往的或现行的指导原则以及本指导原则中，对于每组动物数究竟是多少无充分的科学依据，在可管理的最大研究规模上，且不影响总体研究控制的条件下，有根据的推测所需动物数。通常越贵的动物（难以

获得或饲养) 每组要求的动物数越少。不管是何种动物，最好每组动物数相同，但对较为少用的动物如灵长类，其各组动物数应多些。

还应说明的是，应根据是否期望某项作用在该群体得以表现来确定动物数。对于出现频率高的作用，动物数则可少些；而要通过推断来排除某项毒性，所需要的动物数则应视变量（评价终点）的具体情况而定，如其在对照群体中的发生率（罕见的或必然发生的）及其离散度（连续和半连续型）。也可参见注释 23。

除很少出现的作用（如畸形，流产，整窝仔丢失）外，对啮齿类动物和兔，评价 16 至 20 窝在一定程度上可使不同研究具有一致性。16 窝以下则可使不同研究结果不一致；而每组 20-24 窝以上亦不能使其一致性和准确性明显增加。动物数与评价项目直接相关。若试验中需要将每组再细分以进行不同评价，则试验开始时动物数应加倍。与之类似，在两代繁殖研究中，药物对 F1 代影响的最终评价需要 16-20 窝（F1 代）窝仔。因为考虑到试验中自然丢失的情况，在研究开始时应加大 F0 代每组动物数。

给药期

进行设计，尤其是评价对精子发生影响时，应参考至少给药 1 个月的重复给药毒性研究的结果。若重复给药毒性研究结果未表现出对生殖器官的影响，则交配前给药期可定为雌性 2 周，雄性 4 周（注释 12）。应对交配前给药期长短选择进行说明和提供依据（参见 1.1 章提到的对有关研究的要求）。给药期应贯穿整个交配期，对雄性动物直至处死，对雌性动物至少应直至着床。这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，及对雌雄动物交配行为的影响进行评价。若其他研究显示对雌性或雄性动物生殖器官重量或组织学观察有影响，或对检查的质量有怀疑或缺乏其它研究资料时，则需设计一更全面周密的试验（注释 12）。

交配

建议雌雄动物 1:1 交配，并对一窝的雌雄亲代进行标记，以便识别（注释 14）。

注释 14 (4.1.1) 交配

交配比例：当雌雄动物均给药，或与独立的雄性和雌性动物研究的考虑相同时，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：大部分实验室均采用 2-3 周的交配期，在一些实验室，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

雌性动物可在妊娠中期的任何时间进行尸检。雄性动物可在交配后的任何时间处死，但建议在妊娠确定后采取处死动物这一不可挽回的步骤（注释 15）。

注释 15 (4.1.1) 终末处死

雌性动物

如果雌性动物在胚胎着床后停药，在其妊娠 13-15 天处死，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。

通常认为，为观察不良反应，在妊娠 20/21 天处死雌性动物得到后期胚胎丢失、胎仔死亡或结构畸形等资料在生育力研究中没有必要

雄性动物

建议在交配成功后，处死雄性动物。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。研究 4.1.1 部分用的雄性动物如果给药期延长至交配后且处死延迟，则也可用于评价对雄性生殖系统的毒性。

观察指标

试验期间：

- 每天至少观察一次体征和死亡情况，
- 每周至少两次测定体重和体重改变(注释 16)，
- 每周至少一次测定摄食量(交配期除外)，
- 至少交配期间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，
- 在其他毒性研究中已证明有意义的指标。

终末检查：

- 对所有成年动物进行尸检（肉眼检查），
- 保存肉眼观察出现异常的器官，以备可能进行的组织学检查，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，以备根据具体情况可能进行的组织学检查和评价。在试验结束和报告完成后可处理这些组织，
- 计数附睾或睾丸中的精子并进行精子活力检查，
- 计数黄体数和着床点数(注释 16)，
- 活胎数和死胎数。

注 16 (4.1.1, 4.1.2, 4.1.3) 观察指标

给药期间每日对妊娠动物称体重可提供有用的信息。对某些化合物，在非妊娠期(交配前、交配期、哺乳期)则最好每周称体重 2 次以上。

对明显未妊娠的大鼠或小鼠(不包括兔)，可进行子宫硫化胺染色，以确定是否有胚胎的着床前死亡。

4. 1. 2 对围产期发育影响的研究，包括对母体功能的影响

研究目的

是为了检测从着床到离乳这段时期给药对妊娠/哺乳的雌性动物以及胚胎和子代发育的不良影响。由于对此阶段所造成影响的临床征状可能延迟，应持续观察至子代性成熟阶段(即 1.2 中所述 C 至 F 段)(注释 17, 18)。

注释 17 (4.1.2) 子代给药

本指导原则是从现有该类指导原则基础上衍生而来，它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，应该考虑选特定年龄段子代直接给药，以进行特殊研究（根据具体情况设计）。

注释 18 (4.1.2) 分段进行的胚胎毒性和围产期研究

若把出生前和出生后的试验分为两段进行，一段应涉及胚胎期，另一段应涉及胎仔期、分娩期和哺乳期，而两段试验中均需对出生后子代进行评价。

不良反应评价

- 较非妊娠雌性动物更强的毒性，
- 出生前和出生后子代死亡情况，
- 生长发育的改变，
- 子代的功能缺陷，包括行为、成熟(青春期)和生殖(F1 代)。

动物

至少一种动物，推荐用大鼠。

动物数量

每组各性别的动物数应满足对试验数据进行有意义分析的需要(注释 13)。

给药期

雌性动物给药期应从着床至哺乳期结束(即 1.2 中所述的 C 至 E 段)。

试验步骤

雌性动物分娩并饲养其子代至离乳，每窝选择一只雌性和一只雄性的子代(参考资料方法)，饲养至成年，然后进行交配以检测其生殖能力(注释 19)。

注释 19 (4.1.2) F1 代动物

本指导原则建议每窝中选择一只雌鼠和一只雄鼠进行试验，这样便于在同一 F1 子代个体中评价生殖功能和进行行为及其他功能测试。这样有利于实现在个体水平相互对照比较不同测试的成果。尽管如此，在一些实验室中，人们更愿意选择不同的子代动物来测试行为和生殖功能。对于某个实验室来说，什么是最合适的取决于所选用的试验组合和已有的资源。

观察指标

试验期间(母体动物):

- 每天至少观察一次体征和死亡情况，
- 分娩前每周至少两次测定体重及体重变化（注释 16），
- 分娩前每周至少一次测定摄食量，
- 观察在其他毒理研究中已证明的有意义的指标，

- 妊娠周期,

- 分娩。

终末检查（用于母体，适当时，也用于子代）：

- 对所有成年动物进行尸检（肉眼检查），
- 保存肉眼观察出现异常的器官，以备进行可能的组织学检查，同时保留足够的对照组动物相应器官以便比较，
- 着床(注释 16)，
- 畸形，
- 出生时存活的子代，
- 出生时死亡的子代，
- 出生时体重，
- 离乳前后的存活率和生长/体重(注释 20)，成熟程度和生育力，
- 体格发育(注释 21)，
- 感觉功能和反射(注释 21)，
- 行为(注释 21)。

注 20 (4.1.2) 每窝胎仔数减少

检测对生殖功能影响时，是否应进行窝仔动物剔除尚处于讨论之中，研究者应说明是否进行了剔除。

注释 21 (4.1.2) 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。而胎仔体重与交配后时间的相关性大于体重与出生后时间之间的相关性。至少当其妊娠周期的长短明显不同时是这样。一些反射，如平面翻正反射、听觉惊跳反射、空中翻正反射及对光反射亦依赖于体格发育的状况。

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的裂开。后者与睾丸酮水平升高有关，而睾丸下降与睾丸酮水平无关。这些标志意味着性成熟的开始。建议在达到性成熟时记录体重，以便明确与对照组之间的差异是特异性的还是与总体生长发育有关。

功能测试：迄今为止，功能测试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。鼓励研究者们寻找可测试感觉功能、自主活动、学习和记忆的方法。

4. 1. 3 对胚胎-胎仔发育影响的研究

研究目的

从着床到硬腭闭合阶段给药，评价药物对妊娠雌性动物、胚胎和胎仔发育的影响(即 1.2 中所述的 C 至 D 段)。

不良反应评价

- 较非妊娠雌性动物更强的毒性，
- 胚胎胎仔死亡，
- 生长改变，
- 结构变化。

动物

通常为两种动物：一种为啮齿类，推荐用大鼠；另一种为非啮齿类，推荐用兔(注释 5)。当选用一种动物时应说明动物选择的合理性。

动物数

每组各性别的动物数应满足对试验数据进行有意义分析的需要(注释 13)。

给药期

由着床到硬腭闭合(即到 C 段末)。见 1.2。

试验步骤

在大约分娩前一天处死并检查雌性动物。检查所有胎仔的存活和畸形情况。为了对不同检测方法所得结果进行后续相关性评价，应对胎仔逐个进行标记（注释 22）。

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。当采用被强烈推荐的新鲜显微解剖技术检测兔软组织改变时，100% 的兔胎仔需进行软组织和骨骼畸形的检查。

注释 22 (4.1.3) 对胎仔的个体标记和评价

为了能够检测畸形类型，对单个样本，应尽可能地将不同检测方法得出的各结果(即体重、外部检查、内脏和/或骨骼检查)进行综合考虑。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时，则不需要对中、低剂量组动物进行检查。但建议保存固定的样本以备可能的检查之用。如果按常规应用新鲜显微解剖技术，应该预期到这可能会给以后的组间比较（采用固定的胎仔标本来进行的）带来困难。

观察指标

试验期间(母体动物):

- 每天至少一次观察体征和死亡情况，
- 每周至少两次检查体重和体重改变(注释 16)，
- 每周至少一次测定摄食量，
- 其他毒理试验中已证明有意义的指标。

终点检查:

- 对所有成年动物进行尸检（肉眼检查），

- 保存肉眼观察出现异常的器官，以备进行可能的组织学检查，同时保留足够的对照组动物相应器官以便比较，
- 计算黄体数，死亡及存活的胎仔数(注释 16)，
- 胎仔体重，
- 胎仔畸形(注释 22)，
- 对胎盘进行大体观察。

4. 2 单一研究设计（啮齿类动物）

如果将生育力和围产期研究的给药期连贯在一起全程给药，使二者合为一个单一的研究，就可对生殖过程从 A 到 F 各段的情况进行评价（注释 1. 2）。假若该研究中包括了对胎仔的检查，且在足够高的给药剂量（暴露）下得出了明确的阴性结果，可不要求再进行进一步的生殖毒性研究。胎仔结构畸形的检查也可附加在一项（或多项）胚胎-胎仔发育研究中进行，从而设计成了两段研究（注释 3、11）。

应提供对第二种动物胚胎-胎仔发育影响研究的结果（参见 4.1.3）。

4. 3 分段研究设计（啮齿类动物）

假如其中包括对胎仔的检查，最简单的两段研究设计为生育力研究和围产期发育研究。然而可以认为，假如（受试药）动物暴露达到人体暴露量以上的足够范围时，围产期发育的研究并未显示其对产前发育有影响的迹象，那么大多数情况下，附加的胎仔检查（参见 4.1.3）并不能明显改变其危险性评价的结果。

此外，生育力研究（参见 4.1.1）中雌性动物给药期可持续到硬腭闭合，并参照胚胎-胎仔发育研究（4.1.3）中的方法对胎仔进行检查。这种与围产期研究联合考虑的（两段）研究设计，可进行“最常用的研究设计”中要求的所有检查，而所用动物数却少得多（注释 3、11）。

应提供对第二种动物胚胎-胎仔发育影响研究的结果（参见 4.1.3）。

5. 统计方法

对研究的统计资料进行分析是阐明其结果的手段，其最主要内容是判断各变量与其分布之间关系（描述性统计），因为这决定如何进行组间比较。生殖毒性观察指标通常呈非正态分布，其分布的多样性可表现为从近似连续型到极端型的各种情况。

当采用推理性统计方法（判断统计学意义）时，应该以交配（动物）对或窝作为组间比较的基本单位，而不是用胎仔或幼仔个体。应说明检验方法的合理性（注释 23）。

注释 23 (5.) 推理性统计

“显著性”检验（为推理性统计方法）只是被用于帮助解释结果。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没有生物学意义的推论是轻率的。从某种程度上讲，认为有“统计学意义”的差别一定有生物学意义也是不慎重的。特别是对那些呈偏态分布的低发生率的事件（例如胚胎死亡、畸形），统计学在研究中所占权重很低。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：采用窝而不是胎仔个体为单位，若亲代两种性别动物均给药处理，则用交配对（也即两代研究中亲代的配对）为单位。

6. 数据呈现

总结高质量报告的关键是要简明扼要地将各个体数据制成表格，以说明所用每一动物的结果。应使阅读者能够了解任何一个动物从试验开始到结束的处理全过程，并且容易推断动物个体对其所在组各总体数据的贡

献。组总体数据的表达形式从生物角度看应该是合理的（即避免不真实的精确度），并可反映变量的分布情况。各数据（如体重、摄食量、每窝的相应数据）的附录或表格应简明，并尽可能地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（如临床征状、尸解发现、畸形等）制表时，建议将表现阳性的几个数据一同列表。尤其是针对结构改变（胎仔畸形）的数据，应该在原始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），并报告受影响各胎仔被观察到的全部改变。必要时，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。

7. 专业术语

除了对成年动物生殖能力的影响外，生殖毒性还包括：

发育毒性：是指成年前产生的任何不良影响。它包括在胚胎或胎仔期和产后产生或表现出的影响。

胚胎毒性、胎仔毒性、胚胎-胎仔毒性：是指产前暴露对胎体产生的任何不良影响，包括结构或功能的异常，或产后表现出的这些影响。

术语“胚胎毒性”、“胎仔毒性”是指在其发育的时间点/阶段产生的不良影响，不管何时对其进行检测。

一代、二代或三代研究：是根据由成年动物繁殖并直接与受试物接触的后代数来定义。例如，一代生殖毒性研究中，F0 亲代直接接触受试物，而 F1 代间接（通过母体）接触，该研究通常在 F1 代动物离乳时终止。在二代生殖毒性研究中（与农业化肥和工业化学物的该研究一样），F0 亲代直接接触受试药，F1 代间接和直接接触，而 F2 代间接接触。三代生殖毒性研究的情况依此类推。

机体负荷: 是指给药后受试物在动物体内的总剂量，包括原形药及其代谢产物，也要考虑其分布和累积情况。

动力学: 在该指导原则的全文中均用术语“动力学”表达其含义，该术语在此并不是具体指药代和/或毒代动力学。尚无可更好地表达该术语的单词。

第二部分

雄性生育力毒性

ICH 三方协调的药品生殖毒性检测指导原则的附件

ICH 三方协调指导原则

1995 年 11 月 29 日在 ICH 指导委员会会议进入 ICH 进程第四阶段，2000 年 11 月 9 日修订

2005 年 11 月整合进入核心指导原则

该指导原则被推荐给 ICH 三方的管理部门采用。

一、背景简介（此部分不属于本指导原则的内容）

1993年6月ICH三方协调一致的药品生殖毒性检测指导原则被ICH指导委员会所采纳，并由此起一直在ICH三方中执行。

在该指导原则实施过程中，又收集了有关下述两项内容的新资料：关于交配前动物给药的期限，以及关于适合于检测受试物对雄性生殖系统和雄性生育力影响的观察指标；这些新资料以两篇论文的形式发表在1995年8月的J.Amer.Coll.Toxicol.杂志上，同时也发表在1995年9月的J.Toxicol.Sci.杂志的特刊上。日本学者的合作研究结果提示，生殖器官的组织病理学检查是评价影响精子生成作用的最敏感方法。；在组织病理学检查难以实行时，以及为了进一步提供佐证和深入研究作用特点时，精子分析可获得与上述组织病理学检查相似的信息，精子分析不失之为一个有价值的实验方法。交配实验是检查受试物对精子成熟度、精子活力以及行为变化（即性欲）影响的敏感方法。

ICH的日本方面比较研究了交配前动物给药4周和9周的效果，发现二者对受试物生殖毒性的检出率方面无明显差别，换言之，交配前至少给药4周是必需的；而欧洲文献研究的结果提示，交配前给药2周和4周也具有相同的检出率。日本方面在最近进行的验证性研究的结果提示，在合理的剂量设计下，给药2周对于检测受试物对雄性生殖器官的毒性具有相同的效果(Sakai et al 2000)。

参考文献

- 1、 Takayama S, Akaike M, Kawashima K, Takahashi M, Kurokawa Y; A Collaborative Study in Japan on Optimal Treatment Period and Parameters for Detection of Male Fertility Disorders in Rats Induced by Medical Drugs. J. Amer. Coll. Toxicol., 14: 266-292, 1995.
- 2、 Ulbrich B, Palmer AK; Detection of Effects on Male Reproduction - A Literature Survey. J. Amer. Coll. Toxicol., 14; 293-327, 1995 3. J. Toxicol. Sci., Special Issue, Testicular Toxicity, 20: 173-374, 1995.
- 3、 J. Toxicol. Sci., Special Issue, Testicular Toxicity, 20: 173-374, 1995
- 4、 Sakai T, Takahashi M, Mitsumori K, Yasuhara K, Kawashima K, Mayahara H, Ohno Y; Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by 2-week repeated dose toxicity studies in rats. Overview of the studies. J. Toxicol. Sci. 25, 1-21 (2000)

雄性生育力毒性

二、ICH三方有关检测医用产品生殖毒性指导原则的附件（正文）

引言

本文是“ICH三方药品生殖毒性检测指导原则”的附件，同时也是对已公布的有关文本的修正。

最近协调一致的指导原则中包括有雄性生育力研究，在采用ICH这一指导原则时，人们一致认为，雄性生育力研究在测试设计上需要在科学和管理方面进一步提高和完善。

本修正案旨在为的测试概念和建议提供更好的描述，尤其是为以下几个方面：

- 灵活性
- 交配前给药期限

● 观察指标

一般原则和背景资料以两篇论文的形式发表在 J. Amer. Coll. Toxicol. 杂志上。这两篇文章含有为达成一致意见所必需的实验资料（前瞻性和回顾性），并有相应的注释。上述日本合作研究的资料也发表在 J. Toxicol. Sci. 杂志上。

修正案

前言（最后一段）

为了成功地执行本指导原则的精神，需要掌握灵活性（注释 1）。任何指导原则都不可能提供足以涵盖各种可能出现情况的信息。所有研究人员都应该根据临床和动物实验的技术和伦理标准的现状，探讨并考虑测试策略的变化。

4.1.1. 生育力以及从早期胚胎发育到着床的研究

给药期

一般而言，应充分利用已有的毒性研究资料（如组织病理学检查、生殖器官重量、在一些情况下的激素检测和遗传毒性数据），尤其是在研究受试物对精子生成影响时，这一点更为重要。如果在至少 2 周的重复给药毒性实验中（这些毒性实验并非专门研究雄性生育力毒性）未发现任何毒副作用，那么在交配前雌性动物给药 2 周，雄性动物给药 2 周便可（注释 12）。但应说明选择交配前给药期限的理由和根据。雄性动物给药应贯穿整个交配期直至试验结束，而雌性动物给药至少应包括整个着床期。这样便可评价受试物对雄性生育力的功能性影响和对两种性别动物交配行为的影响，而对雄性生育力的功能性影响无法在重复给药毒性实验中用组织病理学检测方法进行评价。如果其他的研究资料显示对雄性或雌性生殖器官重量或组织学有影响，或如果对检查结果的质量有疑问，或如果完全没有其他的研究资料，那么就有必要考虑进行更全面的研究（注释 12）。

观察指标

终期的检查：

- 对所有成年动物进行尸体剖检（肉眼检查）。
- 保存肉眼观察出现异常变化的器官，以备可能进行的组织病理学检查，同时保存足够数量的对照组动物的相应器官以便进行比较。
- 保存所有动物的睾丸、附睾、卵巢及子宫，以备根据具体情况可能进行的组织病理学检查和评价。
- 计数黄体数和着床点数（注释 16）。
- 计数活胎数和死胎数。

为了进一步确定已观察到的作用或更好地说明作用的特点，精子分析可作为一种可选择的方法而用之（注释 12）。

注释 12（4.1.1）交配前给药

生育力研究的实验设计，尤其是交配前雄性动物给药期限的缩短，是以大量的科学依据和对精子生成过程的基础研究的再评价为根据的。对雄性生殖功能具有选择性影响的化合物颇为罕见，影响精子生成的化合物几乎肯定会影响减数分裂后期和睾丸重量。通过与雌性交配的实验来检查受试物对精子生成的影响不是一种敏感的方法。睾丸的组织病理学检查是研究受试物对精子生成影响的最灵敏方法。雄性生殖器官高水平的病理学和组织病理学检查（例如，采用包氏液固定，石蜡包埋，2-4 微米厚的睾丸横断面切片、附睾的纵断面切片、PAS 和苏木素染色）是一种直接的检查方法。为了进一步证实其他实验方法所观察的结果或进一步阐述受试物的作用特点，精子分析实验（精子计数，精子活力，精子形态学）可作为一种可选方法而采用。在进行精子分析实验时，如果受检样品取自于输精管或附睾，那么这样的精子分析结果对生育力的评价更具有相关性。有关受试物对精子生成（和雌性生殖器官）潜在影响的信息可通过重复给药毒性实验或生殖毒性研究获得。

对那些用雄性生殖器官组织病理学检查和精子分析实验都不能检测出来的影响作用，在与雌性动物的交配实验中，交配前雄性动物给药 4 周和给药更长时间的研究效果基本都是一样的。既然给药 2 周的实验与给药 4 周的试验效果相当，那么在交配前给药 2 周也是可以接受的。当已有的资料提示应增加雄性生育力研究范围时，应设计相应的研究以进一步阐明其作用的特点。

注：与原版主要的改变为：正式确认①交配前动物给药可最短为 2 周；②用于提示雄性生育力影响的重复给药试验的给药时间缩短为 2 周。以上主要是基于日本学者的研究。