

附件 1

兽药安全药理学研究技术指导原则

一、概述

安全药理学（Safety pharmacology）主要是研究兽药在治疗范围及以上剂量时，可能出现的对生理功能非预期的不良影响，通常观察兽药对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统的影响。根据需要，进一步开展追加和/或补充安全药理学研究。

追加的安全药理学研究（Follow-up safety pharmacology studies）主要是根据兽药的药理作用、化学结构，进一步评估预期可能出现的不良反应。根据已有的临床前和/或临床试验结果，推测兽药对靶动物安全性存在影响时，应进行追加的安全药理学研究，即对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统进行更深入的研究。

补充的安全药理学研究（Supplemental safety pharmacology studies）主要是评价兽药对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统以外的器官功能的影响，包括对泌尿系统、自主神经系统、胃肠道系统和其他器官组织的研究。

安全药理学研究目的包括以下几个方面：确定兽药可能关系到靶动物安全性的非预期的药理作用；评价兽药在毒理学和/或临床研究中观察到的兽药不良反应和/或病理生理作用；研究所观察到的和/或推测的兽药不良反应机制。

本指导原则适用于兽用化学药物、兽用中药和兽用天然药物。

二、基本原则

安全药理学研究中核心组合试验执行《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。追加和/或补充的安全药理学研究应最大限度遵循《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。

安全药理学试验的设计，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、药理毒理研究信息、适应证、靶动物特点、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。

安全药理学研究贯穿在新兽药研究全过程中，可分阶段进行。在兽药进入临床试验前，应完成对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统影响的核心组合（Core battery）试验的研究。追加和/或补充的安全药理学研究视具体情况，可在申报新兽药前完成。

三、试验设计

（一）试验材料

1. 受试物

兽用化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

兽用中药、兽用天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

如果由于给药容量或给药方法限制，化学药物可使用原料药，中药可使用浸膏或提取物进行试验。试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。制剂安全性试验必须使用中试样品或临床试验用样品。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

2. 生物材料

生物材料有以下几种：整体动物、离体器官及组织、体外培养的细胞、细胞片段、细胞器、受体、离子通道和酶等。整体动物常用小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、犬等。动物选择应与试验方法相匹配，同时还应注意品系、性别及年龄等因素。生物材料选择应注意敏感性、重现性和可行性，以及与拟用靶动物的相关性等因素。体内研究建议尽量采用清醒动物。如果使用麻醉动物，应注意麻醉药物的选择和麻醉深度的控制。

实验动物应符合国家对相应等级动物的质量规定要求，并具有实验动物质量合格证明。

3. 样本量

试验组的组数及每组动物数的设定，应以能够科学合理地解释所获得的试验结果，恰当地反映有生物学意义的作用，并符合统计学要求为原则。小鼠、大鼠、豚鼠等每组一般不少于 10 只，家兔、犬等每组一般不少于 6 只。动物一般要求雌雄各半。

（二）试验方法

应根据兽药的特点和临床使用的目的，合理地进行试验设计。选用适当的经验证的方法，包括科学而有效的新技术和新方法。某些安全药理学研究可根据药效学、药动学、实验动物种属等选择试验方法。试验可采用体内和/或体外的方法。

1. 剂量

体内安全药理学试验要对所观察到的不良反应的剂量反应关系进行研究，如果可能也应对时间一效应关系进行研究。一般情况下，安全药理学试验应设计 3 个剂量，产生不良反应的剂量应与动物产生主要药效学的剂量或靶动物拟用的有效剂量进行比较。由于不同种属的动物对药效学反应的敏感性存在种属差异，因此安全药理学试验的剂量应包括或超过主要药效学的有效剂量或治疗范围。如果安全药理学研究中缺乏不良反应的结果，试验的最高剂量应设定为相似给药途径

和给药时间的其他毒理试验中产生毒性反应的剂量。体外研究应确定受试物的浓度—效应关系。若无明显效应时，应对浓度选择的范围进行说明。

2. 对照

一般可选用溶剂和/或辅料进行阴性对照。如为了说明受试物的特性与已知兽药的异同，也可选用阳性对照药。

3. 给药途径

整体动物试验，首先应考虑与临床拟用途径一致，可以考虑充分暴露的给药途径。对于在动物试验中难以实施的特殊的临床给药途径，可根据受试物的特点选择，并说明理由。

4. 给药次数

一般采用单次给药。但是若主要药效学研究表明该受试物在给药一段时间后才能起效，或者重复给药的非临床研究和/或临床研究结果出现安全性问题时，应根据具体情况合理设计给药次数。

5. 观察时间

结合受试物的药效学和药代动力学特性、受试动物、临床研究方案等因素选择观察时间点和观察时间。

（三）主要研究内容

1. 核心组合试验

安全药理学的核心组合试验的目的是研究受试物对重要生命功能的影响。中枢神经系统、心血管系统、呼吸系统通常作为重要器官系统考虑，也就是核心组合试验要研究的内容。根据科学合理的原则，在某些情况下，可增加或减少部分试验内容，但应说明理由。

（1）中枢神经系统

定性和定量评价给药后动物的运动功能、行为改变、协调功能、感觉/运动反射和体温的变化等，以确定兽药对中枢神经系统的影响。可进行动物的功能组合试验。

（2）心血管系统

测定给药前后血压（包括收缩压、舒张压和平均压等）、心电图（包括 QT 间期、PR 间期、QRS 波等）和心率等的变化。一般采用清醒动物进行心血管系统指标的测定（如遥测技术等）。

如兽药从适应证、药理作用或化学结构上属于易于引起靶动物 QT 间期延长类的化合物，例如：抗组织胺类药物和氟喹诺酮类药物等，应进行深入的试验研究，观察兽药对 QT 间期的影响。对 QT 的研究可参考相关指导原则。

（3）呼吸系统

测定给药前后动物的各种呼吸功能指标的变化，如呼吸频率、潮气量、呼吸深度等。

2. 追加和/或补充的安全药理学试验

当核心组合试验、临床试验、流行病学、体内外试验以及文献报道提示兽药存在潜在的与靶动物安全性有关的不良反应时，应进行追加和/或补充的安全药理学研究。追加的安全药理学试验，是除了核心组合试验外，反映受试物对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统的深入研究。追加的安全药理学试验根据已有的信息，具体情况具体分析选择追加的试验内容。补充的安全药理学试验，是出于对安全性的关注，在核心组合试验或重复给药毒性试验中未观察泌尿/肾脏系统、自主神经系统、胃肠系统等相关功能时，需要进行的研究。

（1）追加的安全药理学试验

中枢神经系统：对行为、学习记忆、神经生化、视觉、听觉和/或电生理等指标的检测。

心血管系统：对心输出量、心肌收缩作用、血管阻力等指标的检测。

呼吸系统：对气道阻力、肺动脉压力、血气分析等指标的检测。

（2）补充的安全药理学试验

泌尿/肾脏系统：观察兽药对肾功能的影响，如对尿量、比重、渗透压、pH、电解质平衡、蛋白质、细胞和血生化（如尿素、肌酐、蛋白质）等指标的检测。

自主神经系统：观察兽药对自主神经系统的影响，如与自主神经系统有关受体的结合，体内或体外对激动剂或拮抗剂的功能反应，对自主神经的直接刺激作用和对心血管反应、压力反射和心率等指标的检测。

胃肠系统：观察兽药对胃肠系统的影响，如胃液分泌量和 pH、胃肠损伤、胆汁分泌、胃排空时间、体内转运时间、体外回肠收缩等指标的测定。

（3）其他研究

在其他相关研究中，尚未研究兽药对下列器官系统的作用但怀疑有影响的可能性时，如潜在的药物依赖性、骨骼肌、免疫和内分泌功能等的影响，则应考虑兽药对这方面的作用，并作出相应的评价。

（四）结果分析与评价

根据详细的试验记录，选用合适的统计方法，对数据进行定性和定量分析。

应结合药效、毒理、药代以及其他研究资料进行综合评价，为临床研究设计提出建议。

四、试验报告

按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

五、参考文献

1. ICH S7A. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals, 2000.
2. ICH S7B. The Non-clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals, 2005.
3. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物安全药理学研究技术指导原则, 2014.
4. 农业部公告第 1247 号. 兽用化学药物安全药理学试验指导原则, 2009.

附件 2

兽药非临床毒理学评价试验指导原则

一、概述

为揭示拟上市兽药的毒性特征，保障对拟使用靶动物的安全、人的食品消费安全，必须对兽药的非临床毒理学（或安全性）进行评价。兽药非临床毒理学评价的目的：一是预测靶动物临床用药的安全性，为临床试验中拟定安全策略提供参考；二是确定该化合物是否可以作为兽药使用提供依据；三是制定日允许摄入量（Acceptable daily intake, ADI）和最大残留限量（Maximum residue limit, MRL）的重要依据。

本指导原则适用于兽用化学药物、兽用中药、兽用天然药物。消毒剂参考使用。

二、毒理学评价内容

非临床毒理学评价一般包括单次给药毒性、重复给药毒性、毒代动力学、遗传毒性、生殖毒性、致癌性、安全药理学、过敏性、刺激性和溶血性试验等。其中，单次给药毒性、重复给药毒性、遗传毒性、生殖毒性试验项目适用于所有兽药，免疫毒性、光敏毒性、致癌性、神经毒性等试验可基于安全性相关的化合物结构、药物类别、作用机制、已有数据结果确定是否开展。

（一）单次给药毒性试验

1. 经口单次给药毒性试验：所有给药途径的受试物均需开展。
2. 注射途径单次给药毒性试验：注射用受试物均需开展；静脉注射、肌肉注射、皮下注射或腹腔注射途径任选一种。
3. 经皮单次给药毒性试验：经皮肤给药的受试物均需开展。

（二）重复给药毒性试验

1. 用于支持临床适应证给药疗程的重复给药毒性试验：使用啮齿类和非啮齿类按照拟用临床给药途径开展。
2. 用于制定 ADI 的经口重复给药毒性试验：必须开展啮齿类和非啮齿类的 90 天经口毒性试验以及一年经口重复给药毒性试验，使用一种动物应给出理由。

开展兽药慢性毒性和致癌性试验联合研究时，小鼠需要 18 个月，大鼠 24 个月。可使用公认的转基因小鼠开展 6 个月致癌性研究，用于替代小鼠 18 个月试验。

3. 可伴随开展毒代动力学试验：确定毒性物质暴露—毒性关系。

（三）遗传毒性试验

首选标准试验组合 2 种中的一种。

1. 标准试验组合一

- （1）一项细菌回复突变试验（Ames 试验）。

(2) 一项染色体损伤的体外细胞遗传学试验（体外中期相染色体畸变试验或体外微核试验），或一项体外小鼠淋巴瘤 tk 基因突变试验。

(3) 一项体内遗传毒性试验，通常为采用啮齿类动物造血细胞进行的染色体损伤试验，用于检测微核或中期相细胞染色体畸变。

2. 标准试验组合二

(1) 一项细菌回复突变试验（Ames 试验）。

(2) 采用两种不同组织进行的体内遗传毒性试验，通常是一项啮齿类造血细胞微核试验及第二项体内试验。典型的试验是肝 DNA 链断裂试验，除非其他试验证明是合适的。

标准试验组合采用体内和体外试验结合，基因突变、染色体畸变、DNA 损伤三类方法互补检测。标准组合中未包含生殖细胞试验，不包含为检测非整倍体而设计的特定试验，应根据药物特点和作用机制等选择能充分揭示遗传毒性的方法，标准试验组合的调整可参考《兽药遗传毒性试验追加研究技术指导原则》和国家药品监督管理局药品审评中心发布的《药物遗传毒性研究技术指导原则》。当某项试验结果阳性或可疑时，需增加一项或多项支持性追加试验。

在标准组合中的一项或多项试验由于技术原因而无法实施的情况下，如果能提供充分的科学合理性，经过验证的其他试验可用作替代试验。

（四）生殖毒性试验

1. 用于支持适应证的生殖毒性试验：根据药物特点、作用机制和临床适应证等可选择合适的生殖毒性试验，如生育力和早期胚胎发育毒性试验（I 段）、胚胎一胎仔发育毒性试验（II 段，致畸试验）、围产期发育（包括母体功能）毒性试验（III 段）、一代/二代/三代生殖毒性试验。

2. 拟制定 ADI 的受试物，至少开展大鼠二代生殖毒性研究。

（五）致癌性试验

遗传毒性试验结果阳性、有可疑致癌作用或致癌结构的受试物需开展。

（六）免疫毒性试验

对免疫系统有影响或具有免疫调节特性的受试物，需要开展免疫毒性研究。

（七）安全药理学试验

全新物质需要开展安全药理学试验。

（八）毒代动力学试验

为获知受试物在毒性试验中不同剂量水平下的全身暴露程度和持续时间，预测受试物在靶动物和/或人体暴露时的潜在风险，可伴随开展毒代动力学试验。

（九）制剂安全性试验

1. 皮肤刺激试验：皮下注射和经皮肤给药的制剂需开展，经皮肤给药的制剂可用靶动物给药部位的局部耐受性代替。

2. 肌肉刺激试验：肌内注射的制剂需开展，可由靶动物给药部位的局部耐受性代替。

3. 眼刺激试验：眼部给药制剂、喷雾和易挥发的制剂需开展，眼部给药制剂可由靶动物安全性研究代替。

4. 黏膜刺激试验：子宫注入剂、乳房注入剂、喷雾和易挥发的制剂需开展，乳房注入剂可由靶动物安全性研究代替。

5. 溶血性试验：静脉注射用制剂需开展。

6. 过敏试验：根据制剂拟定用途和使用方法开展。

三、毒理学试验结果评定

（一）单次给药毒性试验

如经口 $LD_{50} < 10\text{mg/kg}$ 体重的受试物，一般放弃该化合物制成兽药使用，不再继续其他毒理学试验。

（二）重复给药毒性试验

中毒剂量小于推荐剂量 2~3 倍的受试物一般不能作为兽药使用，蓄积系数小于 3 的受试物一般不能长期添加使用。

（三）遗传毒性试验

三项试验中有一项是阳性结果受试物一般不能用于食品动物，如果此受试物特别重要，必须补做 1~2 项其他毒理学试验进行综合判断，并要通过致癌试验进行确证。

（四）生殖毒性试验

最小致畸剂量小于推荐剂量 3 倍的药物不能用于怀孕动物；有明显繁殖毒性的药物一般不能用于种畜。

（五）致癌毒性

致癌试验结果阳性或可疑的受试物一般不能用于食品动物。

四、兽药非临床毒理学试验应注意的问题

（一）兽药非临床安全性评价试验执行《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。

（二）受试物

兽用化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

兽用中药、兽用天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

如果由于给药容量或给药方法限制，化学药物可使用原料药，中药可使用浸膏或提取物进行试验。试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。制剂安全性试验必须使用中试样品或临床试验用样品。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

（三）兽药非临床安全性试验应符合动物试验的随机、对照和重复一般基本原则。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。试验设计时应考虑受试物的理化性质、结构特点、作用机制、拟使用靶动物、剂型、临床用药方案、同类药物文献等多种因素，科学合理设计试验。试验设计要重视与其他药理毒理试验设计和研究结果的关联性，使得试验结果与其他药理毒理试验研究互为说明、补充或/和印证。如果可行，结果不会出现干扰，部分试验可以合并实施。

（四）分析试验结果时，需要综合考虑：种属和性别差异，参数的剂量—反应关系，与其他关联参数、历史数据的比较，异常数据与毒性的关系，试验方法的局限性，数据的统计学意义和生物学意义。分析各项结果之间的关联性，药物的毒性特征是否充分揭示，是否能合理解释，结论是否充分。

（五）兽药非临床毒理学试验是兽药安全性的部分，还要与药效学的作用机制、药代动力学、靶动物安全性、临床不良反应等进行综合分析。

五、参考文献

1. 农业部公告第 1247 号. 兽药临床前毒理学评价试验指导原则，2009.
2. VICH GL33. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: General Approach to Testing, 2006.
3. VICH GL37. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Repeat-dose Chronic Toxicity Testing, 2006.
4. VICH GL31. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Repeat-dose (90 Days) Toxicity Testing, 2006.
5. VICH GL22. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Reproduction Testing, 2004.
6. VICH GL22 (R) . Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Reproduction Testing (Revision 1) , 2024.
7. VICH GL23 (R2) . Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Genotoxicity Testing, 2024.

8. ICH M3 (R2) . Guidance on Nonclinical Safety for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals, 2009.

9. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物遗传毒性研究技术指导原则, 2018.

附件 3

兽药单次给药毒性研究技术指导原则

一、概述

单次给药毒性（Single dose toxicity）通常指急性毒性（Acute toxicity），是指药物在单次或 24 小时内多次给予后一定时间内所产生的毒性反应。单次给药毒性试验对初步阐明药物的毒性作用和了解其毒性靶器官具有重要意义。单次给药毒性试验所获得的信息对重复给药毒性试验的剂量设计和某些药物临床试验起始剂量的选择具有重要参考价值，并能提供一些与动物药物过量所致急性中毒相关的信息。

本指导原则适用于兽用化学药物、兽用中药和兽用天然药物。消毒剂参考使用。

二、基本原则

单次给药毒性试验执行《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。

单次给药毒性试验的设计，应该在对受试物认知的基础上，遵循“具体问题具体分析”的原则。

对于兽用化学药物，应根据受试物的结构特点、理化性质、同类化合物情况、适应证和用药动物种群特点、试验目的等选择合适的试验方法，设计适宜的试验方案，并结合其他药理毒理研究信息对试验结果进行全面的评价。

对于兽用中药和兽用天然药物，还应考虑到其与兽用化学药物的不同特点，试验时应根据各自不同的情况进行针对性设计。

三、基本内容

（一）受试物

兽用化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

兽用中药、兽用天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

如果由于给药容量或给药方法限制，化学药物可使用原料药，中药可使用浸膏或提取物进行试验。试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析

报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

（二）实验动物

1. 种属：不同种属的动物各有其特点，对同一受试物的反应可能会有所不同。从充分暴露受试物毒性的角度考虑，采用不同种属的动物进行试验可获得较为充分的安全性信息。因此，对于兽用化学药物，单次给药毒性试验通常采用两种哺乳动物进行试验，一般选用一种啮齿类动物和一种非啮齿类动物。若未采用非啮齿类动物进行试验，应阐明其合理性。对于兽用中药、兽用天然药物，根据具体情况，可选择啮齿类和/或非啮齿类动物进行试验〔见七、附录（一）〕。

实验动物应符合国家对相应等级动物的质量规定要求，并具有实验动物质量合格证明。

2. 性别：通常采用两种性别的动物进行试验，雌雄各半。若采用单性别动物进行试验，应阐明其合理性。

3. 年龄：通常采用健康成年动物进行试验。如果受试物拟用于或可能用于幼龄动物，必要时应采用幼龄动物进行试验。

4. 动物数：应根据动物种属和研究目的确定所需的动物数。动物数应符合试验方法及结果分析评价的需要。

5. 体重：试验中的每批动物初始给药时的体重差异不宜过大，啮齿类动物初始给药时体重不应超过或低于平均体重的 20%。

（三）给药途径

给药途径不同，受试物的吸收速度、吸收率和暴露量会有所不同。通常情况下给药途径应至少包括临床拟用途径。如不采用临床拟用途径，应说明理由。

（四）试验方法

单次给药毒性试验的重点在于观察动物出现的毒性反应。单次给药毒性试验的试验方法较多，常用的试验方法有近似致死量法、最大给药量法、最大耐受量法、固定剂量法、上下法（序贯法）、累积剂量法（金字塔法）、半数致死量法等。应根据受试物的特点选择合适的方法，根据不同的试验方法选择合适的剂量〔见七、附录（三）〕。

（五）给药剂量

原则上，给药剂量应包括从未见毒性反应的剂量到出现严重毒性反应的剂量，或达到最大给药量。

不同动物和不同给药途径下的最大给药容量可参考相关文献及根据实际情况来确定。

根据所选择的试验方法，必要时应设置空白和/或溶剂（辅料）对照组。

考虑到胃内容物会影响受试物的给药容量，而啮齿类动物禁食时间的长短会影响到受试物肠道内吸收和药物代谢酶活性，从而影响毒性的暴露。因此，动物经口给药前一般应进行一段时间的禁食，不禁水。

（六）观察时间

给药后，一般连续观察至少 14 天，观察的间隔和频率应适当，以便能观察到毒性反应的出现时间及恢复时间、动物死亡时间等。如果毒性反应出现较慢或恢复较慢，应适当延长观察时间。

（七）观察指标

观察指标包括临床症状（如动物外观、行为、饮食、对刺激的反应、分泌物、排泄物等）、死亡情况（死亡时间、濒死前反应等）、体重变化（给药前、观察期结束时各称重一次，观察期间可多次称重，动物死亡或濒死时应称重）等。记录所有的死亡情况，出现的症状以及症状的起始时间、严重程度、持续时间、体重变化等。

所有的试验动物应进行大体解剖。试验过程中因濒死而安乐死的动物、死亡动物应及时进行大体解剖，其他动物在观察期结束后安乐死并进行大体解剖。当组织器官出现体积、颜色、质地等异常改变时，应进行组织病理学检查。

在一些情况下，为获得更为全面的单次给药毒性信息，可设计多个剂量组，观察更多的指标，如血液学指标、血液生化学指标、组织病理学检查等，以更好地确定毒性靶器官或剂量一反应关系。

四、结果分析与评价

（一）根据所观察到的各种反应出现的时间、持续时间及严重程度等，分析各种反应在不同剂量时的发生率、严重程度。对观察结果进行归纳分析，判断每种反应的剂量一反应及时间一反应关系。

（二）判断出现的各种反应可能涉及的组织、器官或系统等。

（三）根据大体解剖中肉眼可见的病变，初步判断可能的毒性靶器官。

（四）说明所使用的计算方法和统计学方法，必要时提供所选用方法合理性的依据。

（五）根据各种反应在不同剂量下出现的时间、发生率、剂量一反应关系、不同种属动物及实验室的历史背景数据、病理学检查结果以及同类药物的特点，判断所出现的反应与药物的相关性。判断受试物引起的毒性反应性质、严重程度、可恢复性以及安全范围；根据毒性可能涉及的部位，综合大体解剖和组织病理学检查的结果，初步判断毒性靶器官。

单次给药毒性试验的结果可作为后续毒理试验剂量选择的参考，也可提示一些后续毒性试验需要重点观察的指标。

五、试验报告

按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

六、术语

最大给药量（Maximal feasible dose, MFD）：指动物单次或 24 小时内多次（2~3 次）给药所采用的最大给药剂量。

最大耐受量（Maximal tolerance dose, MTD）：是指动物能够耐受的而不引起动物死亡的最高剂量。

半数致死量（Median lethal dose, LD₅₀）：预期引起 50%动物死亡的剂量，该值是经统计学处理所推算出的结果。

七、附录

（一）兽用中药、天然药物的要求

由于兽用中药、天然药物的特殊性，在具体进行试验时可参照以下要求进行；如不按以下要求进行，应充分说明理由。

1. 未在国内上市销售的从中药、动物、矿物等物质中提取的有效成分及其制剂，新发现的药材及其制剂，新的中药材代用品、药材新的药用部位及其制剂，未在国内上市销售的从中药、动物、矿物等物质中提取的有效部位制成的制剂，未在国内上市销售的中药、天然药物注射剂。

以上情况，由于其物质基础较传统中药发生了明显改变，或应用经验较少，一般采用啮齿类和非啮齿类两种动物，全面考察受试物的急性毒性反应情况。如不按以上要求进行，应说明理由。

2. 未在国内上市销售的非注射给药的中药、天然药物复方制剂。

如该复方制剂处方组成符合中医药理论，有一定的临床应用经验，一般情况下，可采用一种动物、按临床拟用途径进行急性毒性反应的观察。

如该复方制剂为天然药物复方制剂，建议采用啮齿类和非啮齿类两种动物，按临床拟用途径进行急性毒性反应的观察；如不按以上要求进行，应阐明其合理性。

如以上制剂处方中含有天然药物、有效成分或化学药品，则应当对上述药用物质进行急性毒性的相互作用研究。

3. 改变国内已上市销售中药、天然药物给药途径（不包括由非注射剂改为注射剂）的制剂。

可仅采用一种动物，比较改变前后两种不同给药途径的急性毒性反应。

4. 改变国内已上市销售药品剂型或改变生产工艺但不改变给药途径的中药、天然药物复方制剂。

如生产工艺的改变会引起物质基础的明显改变，或对药物的吸收、利用可能产生明显影响，建议采用一种动物，按临床拟用途径比较改变前后的急性毒性反应。

5. 增加新的适应证或者功能主治的品种。

如需延长用药周期或增加剂量者，应结合原有毒理学资料及处方组成等情况确定是否还需要进行单次给药毒性试验以及相应的试验内容。

（二）一般观察与指征

以下列出了一些常见的观察指征及其可能涉及的组织、器官和系统。单次给药毒性试验中，可能需要对该表格中列出的全部或部分指征进行观察。表 1 仅作为结果分析评价的参考，其他科学、合理的分析均是可以接受的。

表 1 一般观察与指征

观察	指征	可能涉及的组织、器官或系统
I. 鼻 孔 呼 吸 阻 塞，呼吸频率和深度改变，体表颜色改变	呼吸困难：呼吸困难或费力，喘息，通常呼吸频率减慢	CNS 呼吸中枢，肋间肌麻痹，胆碱能神经麻痹
	A 1. 腹式呼吸：膈膜呼吸，吸气时膈膜向腹部偏移	CNS 呼吸中枢，肺水肿，呼吸道分泌物蓄积，胆碱能功能增强
	2. 喘息：吸气很困难，伴随有喘息声	CNS 呼吸中枢，心肺功能不全
	B 呼吸暂停：用力呼吸后出现短暂的呼吸停止	心肺功能不全，肺水肿
	C 紫绀：尾部、口和足垫呈现青紫色	呼吸中枢刺激，心肺功能不全
	D 呼吸急促：呼吸快而浅	肺水肿，出血
II. 运动功能：运动频率和特征的改变	E 鼻分泌物：红色或无色	
	A 自发活动、探究、梳理、运动增加或减少	躯体运动，CNS
	B 嗜睡：动物嗜睡，但可被针刺唤醒而恢复正常活动	CNS 睡眠中枢
	C 正位反射（翻正反射）消失：动物体处于异常体位时所产生的恢复正常体位的反射消失	CNS，感觉，神经肌肉
	D 麻痹：正位反射和疼痛反应消失	CNS，感觉
	E 僵住：保持原姿势不变	CNS，感觉，神经肌肉，自主神经
	F 共济失调：动物行走时无法控制和协调运动，但无痉挛、局部麻痹、轻瘫或僵直	CNS，感觉，自主神经
	G 异常运动：痉挛，足尖步态，踏步，忙碌，低伏	CNS，感觉，神经肌肉
	H 俯卧：不移动，腹部贴地	CNS，感觉，神经肌肉
	I 震颤：包括四肢和全身的颤抖和震颤	神经肌肉，CNS
III. 惊厥（癫痫发作）：骨骼肌明显的不自主收缩或痉挛性收缩	J 肌束震颤：包括背部、肩部、后肢和足趾肌肉的运动	神经肌肉，CNS，自主神经
	A 阵挛性惊厥：肌肉收缩和松弛交替性痉挛	CNS，呼吸衰竭，神经肌肉，自主神经
	B 强直性惊厥：肌肉持续性收缩，后肢僵硬性伸展	CNS，呼吸衰竭，神经肌肉，自主神经
	C 强直性一阵挛性惊厥：两种惊厥类型交替出现	CNS，呼吸衰竭，神经肌肉，自主神经
	D 窒息性惊厥：通常是阵挛性惊厥并伴有喘息和紫绀	CNS，呼吸衰竭，神经肌肉，自主神经
	E 角弓反：背部弓起、头向背部抬起的强直性痉挛	CNS，呼吸衰竭，神经肌肉，自主神经
IV. 反射	A 角膜性眼睑闭合反射：接触角膜导致眼睑闭合	感觉，神经肌肉
	B 基本条件反射：轻轻敲击耳内表面，引起外耳抽搐	感觉，神经肌肉
	C 正位反射：翻正反射的能力	CNS，感觉，神经肌肉
	D 牵张反射：后肢被牵拉至从某一表面边缘掉下时缩回的能力	感觉，神经肌肉
	E 对光反射：瞳孔反射；见光瞳孔收缩	感觉，神经肌肉，自主神经
	F 惊跳反射：对外部刺激（如触摸、噪声）的反应	感觉，神经肌肉
V. 眼检指征	A 流泪：眼泪过多，泪液清澈或有色	自主神经
	B 缩瞳：无论有无光线，瞳孔缩小	自主神经
	C 散瞳：无论有无光线，瞳孔扩大	自主神经
	D 眼球突出：眼眶内眼球异常突出	自主神经
	E 上睑下垂：上睑下垂，针刺后不能恢复正常	自主神经
	F 血泪症：眼泪呈红色	自主神经，出血，感染
	G 瞬膜松弛	自主神经
	H 角膜浑浊，虹膜炎，结膜炎	眼睛刺激
VI. 心血管指征	A 心动过缓：心率减慢	自主神经，心肺功能不全
	B 心动过速：心率加快	自主神经，心肺功能不全
	C 血管舒张：皮肤、尾、舌、耳、足垫、结膜、阴囊发红，体热	自主神经、CNS、心输出量增加，环境温度高

观察	指征	可能涉及的组织、器官或系统
	D 血管收缩：皮肤苍白，体凉	自主神经、CNS、心输出量降低，环境温度低
	E 心律不齐：心律异常	CNS、自主神经、心肺功能不全，心肌梗塞
VII. 流涎	A 唾液分泌过多：口周毛发潮湿	自主神经
VIII. 竖毛	A 毛囊竖毛组织收缩导致毛发蓬乱	自主神经
IX. 痛觉缺失	A 对痛觉刺激（如热板）反应性降低	感觉，CNS
X. 肌张力	A 张力低下：肌张力全身性降低	自主神经
	B 张力过高：肌张力全身性增高	自主神经
XI. 胃肠指征		
排便（粪）	A 干硬固体，干燥，量少	自主神经，便秘，胃肠动力
	B 体液丢失，水样便	自主神经，腹泻，胃肠动力
呕吐	A 呕吐或干呕	感觉，CNS，自主神经（大鼠无呕吐）
多尿	A 红色尿	肾脏损伤
	B 尿失禁	自主感觉神经
XII. 皮肤	A 水肿：液体充盈组织所致肿胀	刺激性，肾功能衰竭，组织损伤，长时间静止不动
	B 红斑：皮肤发红	刺激性，炎症，过敏

注：CNS 指中枢神经系统

（三）单次给药毒性试验常用试验方法

由于受试物的化学结构、活性成分的含量各异，毒性反应的强弱也不同，研究者应根据受试物的特点，选择以下方法或国内外公认的试验方法。

本指导原则简单介绍下列常用的试验方法，详细的实验技术细节可参考相应的文献。

1. 近似致死剂量法

该方法主要用于非啮齿类的动物试验。试验方法如下：一般采用 6 只健康的 Beagle 犬或猴。犬的年龄一般为 6~8 月龄，猴的年龄一般为 3~5 岁，选用其他动物时应说明理由。根据小动物的毒性试验结果、受试物的化学结构和其他有关资料，估计可能引起毒性和死亡的剂量范围。按 50%递增法，设计出含数个剂量的剂量序列表。根据估计，由剂量序列表中找出可能的致死剂量范围，在此范围内，每间隔一个剂量给一只动物，测出最低致死剂量和最高非致死剂量，然后用二者之间的剂量给一只动物。如果该剂量下动物未发生死亡，则该剂量与最低致死剂量之间的范围为近似致死剂量范围；如果该剂量下动物死亡，则该剂量与最高非致死剂量间的范围为近似致死剂量范围。

2. 最大给药量法

对于某些低毒的受试物可采用该方法。在合理的最大给药浓度及给药容量的前提下，以允许的最大剂量单次给药或 24 小时内多次给药（剂量一般不超过 5g/kg 体重），观察动物出现的反应。一般使用 10~20 只动物，连续观察 14 天。

3. 固定剂量法

该方法不以死亡作为观察终点，而是以明显的毒性体征作为终点进行评价。

试验选择 5、50、500 和 2000mg/kg 四个固定剂量进行试验，特殊情况下可增加 5000mg/kg 剂量。实验动物首选大鼠，给药前禁食 6~12 小时，给受试物后再禁食 3~4 小时。采用一次给

药的方式进行。如无资料证明雄性动物对受试物更敏感，首先用雌性动物进行预试。根据受试物的有关资料，从上述四个剂量中选择一个作为初始剂量；若无有关资料可作参考时，可用 500mg/kg 作为初始剂量进行预试，如无毒性反应，则用 2000mg/kg 进行预试，此剂量如无死亡发生即可结束预试。如初始剂量出现严重的毒性反应，即降低一个档次的剂量进行预试，如此时动物存活，就在此两个固定剂量之间选择一个中间剂量试验。每个剂量给一只动物，预试一般不超过 5 只动物。每个剂量试验之间至少应间隔 24 小时。给受试物后的观察期至少 7 天，如动物的毒性反应到第 7 天仍然存在，尚应继续观察 7 天。在上述预试的基础上进行正式试验。每个剂量至少用 10 只动物，雌雄各半。根据预试的结果，在上述四种剂量中选择一个可能产生明显毒性但又不引起死亡的剂量进行试验，如预试结果表明，5.0mg/kg 引起死亡，则降低一个剂量档次进行试验。给受试物后至少应观察 2 周，根据毒性反应的具体特点可适当延长。对每只动物均应仔细观察并详细记录各种毒性反应出现和消失的时间。给受试物当天至少应观察记录两次，以后可每天一次。观察记录的内容包括皮肤、黏膜、毛色、眼睛、呼吸、循环、自主活动及中枢神经系统行为表现等。动物死亡时间的记录要准确。给予受试物前、后各 1 周、动物死亡及试验结束时应称取动物的体重。所有动物包括死亡或处死的动物均应进行尸检，尸检异常的器官应作组织病理学检查。固定剂量试验法所获得的结果，参考表 2 标准进行评价。

表 2 固定剂量法试验结果的评价表

剂量 (mg/kg)	试验结果		
	存活数<100%	100%存活毒性表现明显	100%存活无明显中毒表现
5	高毒 (Very toxic) (LD ₅₀ ≤25mg/kg)	有毒 (Toxic) (LD ₅₀ 25~200mg/kg)	用 50mg/kg 试验
50	有毒或高毒，用 5mg/kg 试验	有害 (Harmful) (LD ₅₀ 200~2000mg/kg)	用 500mg/kg 试验
500	有毒或有害，用 50mg/kg 试验	LD ₅₀ >2000mg/kg	用 2000mg/kg 试验
2000	用 500mg/kg 试验	该化合物无严重急性中毒的危险性	

4. 上下法

上下法最大的特点是节省实验动物，该方法不但可以进行毒性表现的观察，还可以估算 LD₅₀ 及其可信限，适合于能引起动物快速死亡的药物。该方法分为限度试验和主试验。限度试验主要用于有资料提示受试物毒性可能较小的情况。可以从与受试物相关的化合物或相似的混合物或产品中获得相关毒性资料。在相关毒性资料很少或没有时，或预期受试物有毒性时，应进行主试验。

限度试验：是最多用 5 只动物进行的序列试验。试验剂量为 2000mg/kg，特殊情况下也可使用 5000mg/kg。

2000mg/kg 剂量水平的限度试验：将受试物给予 1 只动物。如果该动物死亡，则进行主试验；如果该动物存活，依次将受试物给予另外 4 只动物，动物总数为 5 只。如果 1 只动物在试验后期死亡，而其他动物存活，应停止对其他动物给药，对所有动物进行观察，是否在相似的观察期间也发生死亡。后期死亡的动物应与其他死亡的动物同样计数，对结果进行如下评价：有 3 只

或 3 只以上动物死亡时， LD_{50} 小于 2000mg/kg；有 3 只或 3 只以上动物存活时， LD_{50} 大于 2000mg/kg；如果有 3 只动物死亡，则进行主试验。

5000mg/kg 剂量水平的限度试验：特殊情况下，可考虑使用 5000mg/kg 的剂量。将受试物给予 1 只动物。如果该动物死亡，则进行主试验；如果该动物存活，将受试物给予另外 2 只动物。如果这 2 只动物都存活，则 LD_{50} 大于 5000mg/kg，停止试验（即不再对其他动物给药，观察 14 天）。如果这 2 只动物中有 1 只死亡或者 2 只均死亡，将受试物给予另外 2 只动物，一次 1 只。如果 1 只动物在试验后期死亡，而其他动物存活，应停止对其他动物给药，对所有动物进行观察，是否在相似的观察期间也发生死亡。后期死亡的动物应与其他死亡的动物同样计数，对结果进行如下评价：有 3 只或 3 只以上动物死亡时， LD_{50} 小于 5000mg/kg；有 3 只或 3 只以上动物存活时， LD_{50} 大于 5000mg/kg。

主试验：由一个设定的给药程序组成，在此程序中，每次给药 1 只动物，间隔至少 48 小时。给药间隔取决于毒性出现时间、持续时间和毒性的严重程度。在确信前一只动物给药后能存活之前，应推迟按下一剂量给药。时间间隔可以适当调整，但使用单一时间间隔时，试验会更简便。第一只动物的给药剂量低于 LD_{50} 最接近的估计值。如果该动物存活，第二只动物给予高一级剂量；如果第一只动物死亡或出现濒死状态，第二只动物给予低一级剂量。剂量级数因子应选定为 $1/(\text{剂量}-\text{反应曲线斜率估计值})$ 的反对数（对应于斜率 2 的级数因子为 3.2），并应在整个试验过程中保持不变。当没有受试物斜率的有关资料时，使用 3.2 为剂量级数因子。使用默认级数因子时，剂量应从以下序列中选择：1.75、5.5、17.5、55、175、550、2000mg/kg（或有特殊要求时 1.75、5.5、17.5、55、175、550、1750、5000mg/kg）。如果没有受试物的致死估计值，应该从 175mg/kg 开始。如果预期动物对该受试物的耐受程度变化很大（即估计斜率小于 2.0），那么开始试验前应考虑增加剂量级数因子超过按对数剂量计算的默认值 0.5（即级数因子为 3.2）。同样，对于已知斜率很陡的受试物，应选择小于默认值的级数因子。在决定是否及如何对下一只动物给药之前，每只动物都应认真观察达 48 小时。当满足停止试验标准之一时，停止给药，同时根据终止时所有动物的状态计算 LD_{50} 估计值和可信区间。用最大可能性法计算 LD_{50} 值（经验证的计算软件）。当满足下列停止试验标准之一时，停止试验：（a）连续 3 只动物存活；（b）任意连续 6 只试验动物中有 5 只连续发生存活/死亡转换；（c）第一只动物发生转换之后至少有 4 只动物进入试验，并且其 LD_{50} 估算值的范围超出临界值（2.5 倍）（首次转换的第 4 只动物之后，对每次给药进行计算）。

对于 LD_{50} 和斜率的各种组合，在动物发生死亡/存活转换之后，用 4~6 只动物即可满足停止试验标准（C）。但在一些情况下，化合物的剂量-反应曲线的斜率较小，可能另外还需要增加动物（总数可达 15 只）。

5. 累积剂量设计法

在非啮齿类动物进行单次给药毒性试验可采用此方法。经典的试验设计需要 8 只动物，分对照组和给药组，每组 4 只动物，雌雄各 2 只。剂量的设计可以是 1、3、10、30、100、300、

1000、3000mg/kg，也可以采用 10、20、40、80、160、320、640、1280mg/kg，通常隔日给予下一个高剂量，剂量逐渐加大，直到出现动物死亡时或达到剂量上限时为止。当没有动物死亡时，MLD（最小致死剂量）和 LD₅₀ 大于最高剂量或受限制剂量。当在某一剂量所有动物均出现死亡时，MLD 和 LD₅₀ 应在最后两个剂量之间。当在某一剂量部分动物出现死亡，部分死亡出现在后继的下一个高剂量，此时，MLD 位于首次出现死亡的剂量和前一低剂量之间，LD₅₀ 则应在首次出现动物死亡的剂量和所有动物均死亡的剂量之间。假如没有动物死亡发生，常常以最高剂量给予动物 5~7 天，以确定后续的重复给药试验中高剂量的选择。

6. 半数致死量法

一种经典的单次给药毒性试验方法，试验结果经统计学处理可获得受试物的 LD₅₀。

八、参考文献

1. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物单次给药毒性研究技术指导原则，2014.
2. 国家食品药品监督管理局. 化学药物急性毒性试验技术指导原则，2005.
3. OECD TG425. Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure，2022.
4. OECD TG420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure，2001.

附件 4

兽药 28 天/90 天经口毒性试验指导原则

一、概述

确定经口连续给予受试物28天/90天后引起的毒性效应，了解受试物剂量—反应关系和毒性作用靶器官，确定28天/90天经口毒性试验未观察到有害作用剂量（No observed adverse effect level, NOAEL）等，为食品动物用兽药制定日允许摄入量（Acceptable daily intake, ADI）和最大残留限量（Maximum residue limit, MRL）提供依据，或为下一步较长期毒性和慢性毒性试验剂量、观察指标、毒性终点的选择提供依据。

本指导原则以啮齿类经口重复给药试验（28天或90天）为例，给出规范试验的一般性建议，试验设计可根据药物特点和试验目的等予以调整。

本指导原则适用于兽用化学药物、兽用中药和兽用天然药物。消毒剂参考使用。

二、基本原则

兽药 28 天/90 天经口毒性试验执行《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。

兽药 28 天/90 天经口毒性试验的设计，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、药理毒理研究信息、适应证、靶动物特点、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、试验设计

（一）实验动物

1. 实验动物选择

选择已有资料证明对受试物敏感的物种和品系，啮齿类动物首选大鼠，应符合国家对相应等级动物的质量规定，并具有实验动物质量合格证明。

采用健康大鼠，雌雄各半，给药起始年龄建议为 6~9 周龄。同性别体重差异应在平均体重的 20%之内。

如果该试验是大于6个月重复给药毒性试验的初步研究，两项试验应使用同一品系动物。

2. 实验动物管理

实验动物分别进行标记编号和称重，随机分组。

试验前，环境适应期至少为5天。

动物饲养条件应符合现行国家标准要求。同一处理组的同一性别动物应一起笼养（每笼不超过5只，以不影响动物自由活动或观察动物的症状和测定指标为宜）。若动物单只饲养须有充分的科学依据。笼具的安放应随机安排，尽可能减小位置造成的影响。

（二）受试物

兽用化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

兽用中药、兽用天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

如果由于给药容量或给药方法限制，化学药物可使用原料药，中药可使用浸膏或提取物进行试验。试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

（三）试验分组

原则上至少应设低、中、高 3 个剂量组，以及 1 个溶剂（或辅料）对照组，必要时设立空白对照组和/或阳性对照组；高剂量原则上使动物产生明显的毒性反应但不造成死亡或严重损害，如果出现死亡，死亡动物数应不超过 10%；低剂量组动物不宜出现毒性反应，原则上相当或高于动物药效剂量或临床使用剂量的等效剂量，中剂量应结合毒性作用机制和特点在高剂量和低剂量之间设立，可出现轻度的毒性反应，以考察毒性的剂量—反应关系。

啮齿类动物每个剂量组一般不少于 30 只（每个性别主试验组 10 只、恢复组 5 只），非啮齿类动物每个剂量组一般不少于 10 只（每个性别主试验组 3 只、恢复组 2 只）。如计划在试验过程中定期剖杀动物或伴随开展毒代动力学试验，则动物数应相应增加。

（四）给药方案

通常每天给药 1 次（或一日内以不超过 2~3 小时间隔分多次给药）。采用多次给药或其他给药间隔需提供科学依据。

根据药物性质，可选择将受试物混入饲料或饮水中给药，也可采用灌胃方式。其中，灌胃给药剂量最为准确；混饲或混饮给药时，应注意适口性，且不得干扰动物正常的营养或水分摄取。对于高剂量受试物组的设计，应考虑其对营养素平衡的影响；若受试物为非营养成分，其在饲料中的占比不应超过 5%；若超过 5% 时应调整饲料营养素水平，使各剂量组与对照组饲料营养素水平一致。

混饲时，可以使用恒定的日粮浓度（mg/kg 饲料）或根据动物体重确定每日给药剂量，按大鼠每日饲料摄入量折算为饲料中受试物浓度（mg/kg 体重/日），28 天经口毒性试验大鼠每日饲料

摄入量按体重的10%折算，90天经口毒性试验大鼠每日饲料摄入量按体重的8%折算，根据需要进行调整以保持恒定的剂量水平。需提供含药饲料的稳定性数据。

混饮时，动物每日饮水量按体重的15%~20%计算，需提供受试物在水中的稳定性数据。

灌胃时，大鼠灌胃量一般为 10ml/kg 体重/日，水溶液体积不超过 20ml/kg 体重，采用更大体积时，应说明理由。除刺激性或腐蚀性物质（通常较高浓度下其毒效应增强）外，应调整受试物浓度，确保各组给药体积相等。每天灌胃的时间点也应一致，并根据动物体重进行调整以保持恒定的剂量水平。

28天经口毒性试验一般不少于2周的恢复期，90天经口毒性一般不少于4周恢复期。

（五）试验指标

具体试验指标和设定原则参考《兽药重复给药毒性试验技术指导原则》，应根据受试物的特点、毒性特点、文献等合理设计试验和设立采集指标，尽早发现毒性反应及揭示毒性特征。

临床观察：试验期间至少每天观察一次动物的一般临床表现，并记录动物出现中毒的体征、程度、持续时间及死亡情况；每日观察时间段尽量相同，或在预期毒性反应出现的时间段观察；如果出现毒性反应，则应适当增加每日观察次数。观察内容包括但不限于被毛、皮肤、眼、黏膜、分泌物、排泄物、呼吸系统、神经系统、自主活动（如流泪、竖毛反应、瞳孔大小、异常呼吸）及行为表现（如步态、姿势、对处理的反应、有无强直性或阵挛性活动、刻板反应、反常行为等），最好采用试验机构明确规定的评分系统。动物在首次给药前进行一次详细的临床观察（用于个体内比较），之后每周至少一次对所有动物进行详细临床观察，这些详细观察应在标准活动场中、在饲养笼外进行。

体重、摄食量及饮水消耗量：每周称重并记录大鼠体重，记录投入饲料量及剩余饲料量，计算每周的体重、摄食量变化。记录动物每日饮水消耗量。如受试物经掺入饲料（混饲）或饮水（混饮）给予，应计算和报告各剂量组实际摄入剂量。

眼科检查：在试验开始前、给药结束后及恢复期结束时，各进行一次眼科检查，使用检眼镜或同等设备。至少应对高剂量组和对照组动物进行检查（最好对所有动物进行检查）。若发现眼部病变，则所有动物均应接受检查。

血液学指标：一般于给药结束、恢复期结束各测定1次。如果试验机构背景数据不充分，可考虑试验前采样1次。

血液生化指标：一般于给药结束、恢复期结束各测定1次，90天经口毒性试验一般于试验中期也测定1次。如果试验机构背景数据不充分，可考虑试验前采样1次。血液生化指标是反映组织毒性（尤其肝脏和肾脏）的重要指标。建议采用过夜禁食1次后取血，可减少干扰，尤其测定葡萄糖。

尿液测定：给药结束、恢复期结束，采集尿液，测定。

病理检查：

（1）大体剖检

给药结束、恢复期结束剖检。所有动物均应进行全面详细的剖检，包括仔细检查身体外表面、所有孔道、颅骨、胸腔和腹腔及其内容物。所有肉眼病变都应检查，做好记录，并将器官和组织固定保存。试验期间濒死或死亡动物也应做及时剖检及相关原因分析。

（2）脏器称量

剖检试验大鼠的同时，称取大鼠体重及各脏器（需称重脏器见《兽药重复给药毒性试验技术指导原则》）重量，记录，计算各脏器指数（脏/体比值）。

（3）组织病理学检查

病变组织和器官组织应在最适合组织类型和其组织病理学检查的介质中固定，需进行组织病理学检查的组织或器官见《兽药重复给药毒性试验技术指导原则》，如果眼科检查期间观察到变化则对眼睛进行组织病理学检查。高剂量组及对照组大鼠必须进行组织病理学检查，发现病变后应扩展到对较低剂量组大鼠的相应器官及组织进行检查。

（六）统计分析

以适当的统计学方法分析上述数据，比较试验组与对照组之间的差异显著性。

（七）结果分析与评价

1. 综合试验观察结果，评价受试物作用下大鼠的临床表现。
2. 结合数据评价受试物对大鼠增重率、饮水量及总体生长情况的影响。
3. 结合数据评价受试物对大鼠血液学指标、血液生化指标、尿液分析指标的影响。
4. 评价受试物各剂量对大鼠脏器系数的影响。
5. 评价受试物各剂量给大鼠组织器官造成的病理变化。
6. 分析偏差及对结果是否造成影响。
7. 综合分析试验结果，判断动物是否发生毒性反应及毒性靶器官，描述毒性反应的性质（剂量依赖性、时间依赖性、蓄积性、可逆性等）和程度、性别差异，如果有动物死亡应分析死亡原因，确定安全范围，并探讨可能的毒性作用机制。估计 28 天/90 天经口重复摄入药物的危险性。

四、试验报告

按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

五、参考文献

1. 农业部公告第 1247 号. 兽药 30 天和 90 天喂养试验指导原则，2009.
2. 农业部公告第 1247 号. 兽药临床前毒理学评价试验指导原则，2009.
3. VICH GL31. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Repeat-dose (90 Days) Toxicity Testing, 2006.
4. OECD TG407. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, 2025.
5. OECD TG408. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents, 2018.
6. OECD TG409. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Non-rodents, 1998.

附件 5

兽药细菌回复突变试验技术指导原则

一、概述

细菌回复突变试验又称为 Ames 试验，是目前应用最广泛的检测基因突变的方法之一。试验利用营养缺陷型的突变体菌株，测定受试物能否诱导细菌回复突变，以判断受试物的致突变性。

组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门菌不能合成组氨酸，不能在无组氨酸的培养基上生长；色氨酸营养缺陷型大肠杆菌不能合成色氨酸，不能在无色氨酸的培养基上生长。但致突变物可使突变型产生回复突变而成为野生型，因而能在无组氨酸或色氨酸的培养基上生长形成菌落，据此检查受试物是否具有致突变作用。某些致突变物需要代谢活化后才能使突变型菌株产生回复突变，可用经酶诱导剂处理的大鼠肝匀浆制备 S9 混合液，作为代谢活化系统。

本方法适用于检测由 DNA 的一个或数个碱基对的置换、增加或缺失造成的点突变。虽然本方法是检测诱导基因突变物质的有效方法，但并不能检测出所有致突变物质，不适用于评价对哺乳动物细胞复制过程有特异性干扰的化合物，如拓扑异构酶抑制剂、核苷酸类似物等，也不适用于一些在沙门菌试验中不会产生突变的致染色体断裂化合物，如无机砷化合物。

本指导原则适用于兽用化学药物、兽用中药和兽用天然药物。消毒剂参考使用。

二、基本原则

兽药细菌回复突变试验执行《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。

兽药细菌回复突变试验的设计，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、药理毒理研究信息、适应证、靶动物特点、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、试验设计

（一）试验菌株

至少应包含下述五种菌株组合：

- （1）鼠伤寒沙门菌 TA1535；
- （2）鼠伤寒沙门菌 TA1537 或 TA97 或 TA97a；
- （3）鼠伤寒沙门菌 TA98；
- （4）鼠伤寒沙门菌 TA100；
- （5）鼠伤寒沙门菌 TA102 或大肠杆菌 WP2 uvrA 或大肠杆菌 WP2 uvrA（pKM101）。

菌株特性鉴定需符合要求〔见附录（一）〕。新鲜细菌培养物应生长至指数生长晚期或稳定期早期，生长已达稳定期晚期的培养物不能使用，细菌数约为 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$ CFU/ml。

（二）受试物

兽用化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

兽用中药、兽用天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

（三）试验分组

试验应同时设置受试物组、阳性对照组和阴性对照组（溶剂对照和/或空白对照）。各组均应分别在代谢活化系统存在和不存在平行条件下测试。

1. 受试物组

至少应包含 5 个可用于结果分析的浓度。每一浓度至少平行 3 皿。

最高浓度主要取决于受试物对细菌的毒性及其溶解度：

（1）对于可溶性的无细菌毒性的受试物，推荐的最高浓度一般为 5mg/皿（液体受试物为 5μl/皿）。

（2）对于可溶性的有细菌毒性的受试物，应根据细菌毒性情况确定最高浓度，应能显示明显的毒性，如回复突变菌落数目减少、背景菌苔减少或消失。代谢活化系统的存在可改变受试物的毒性。

（3）对于难溶性的受试物，如果沉淀不干扰计数，应对产生沉淀的浓度进行计数，且最高浓度不超过 5mg/皿或 5μl/皿。当未观察到细菌毒性时，应以产生沉淀的最低浓度作为计数的最高浓度；当观察到浓度相关性的细菌毒性或诱变性时，则要求检测多个产生沉淀的浓度，并按可能产生毒性时的要求确定最高浓度。

对最高浓度之下的其他浓度，在开始试验时，一般浓度间距约为半对数，在研究浓度—反应关系时，也可采用更小的浓度间距。

2. 阳性对照组

采用已知的菌株特异性致突变剂替代受试物，其他处理和受试物组相同。应根据有无代谢活化系统、试验菌株类型选择适宜的阳性对照物。推荐的标准诱变剂参见附录（一）附表 2。

3. 溶剂对照组

仅含和受试物组相同的溶剂，不含受试物，其他处理和受试物组相同。

4. 空白对照组

如果现有资料不能证实溶剂不具有致突变性，还应设空白对照。

（四）代谢活化系统

常用的代谢活化系统是经酶诱导剂（如 Aroclor 1254 或苯巴比妥和 β -萘黄酮联合）诱导处理后的大鼠肝脏微粒体酶 S9 混合液，但也可使用其他系统。如果选择其他代谢活化系统，应提供科学依据以证明该选择合理。

S9 在试验介质中的终浓度一般为 5%~30%（v/v）。

（五）试验方法

本指导原则主要描述平皿掺入法和预孵育法。

平皿掺入法：在底层培养平皿上做好标记。取已融化并在 45℃ 水浴中保温的顶层培养基一管（2ml），依次加入测试菌液 0.1ml、受试物溶液 0.1ml、磷酸盐缓冲液 0.5ml（-S9）或 S9 混合液 0.5ml（+S9），迅速混匀，倒在底层培养基上，转动平皿，使顶层培养基均匀分布在底层上，平放固化，37℃ 培养 48~72h，计数每皿回复突变菌落数。

预孵育法：将受试物溶液 0.1ml 与测试菌液 0.1ml、磷酸盐缓冲液 0.5ml（-S9）或 S9 混合液 0.5ml（+S9）在 30~37℃ 预孵育 20min 或更长时间，再加至 2ml 顶层培养基中，其余步骤同平皿掺入法。在预孵育过程中，应将试管放入振荡器中振荡。

有些受试物宜采用预孵育法，如短链脂肪族亚硝胺、二价金属、醛类、偶氮染料和重氮化合物、吡咯里西啶生物碱、烯丙基化合物和硝基化合物。某些类别的致突变物采用标准方法有时不能被检出，如偶氮染料和重氮化合物、糖苷等，此时应采用其他方法。偏离标准方法应有科学依据。

（六）观察指标

应描述各浓度组细菌毒性大小和沉淀情况。主要评价指标为每皿回复突变菌落数，并计算各组的均值和标准差。

（七）结果分析及评价

试验数据应按不同处理条件、不同组别以列表形式提供。同时，提供本实验室历史性的阴性对照和阳性对照资料，包括范围、均值和标准差等。

至少在一个菌株上，在有或无代谢活化条件下，受试物所诱发的回复突变菌落数出现浓度依赖性的增加和/或在一个或多个浓度组上出现可重复性的增加，可判定为阳性结果。结果判定时应首先考虑试验结果的生物学意义，统计学分析有助于结果的评价。

该试验出现阳性结果时，应考虑受试物的纯度，以确定阳性结果是否为污染物所致。氨基酸（组氨酸或色氨酸）污染可能导致菌落数的升高，进而出现假阳性结果。

明显的阳性结果通常不需要重复试验。可疑结果应通过改变试验条件（如调整受试物或 S9 浓度，改变培养条件等）进一步试验加以明确。阴性结果需要验证（即重复一次），应改变试验的条件（如浓度间距等），如认为阴性结果无需进行验证试验，应说明理由。

四、试验报告

按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

五、附录

（一）Ames 试验用菌株的鉴定

菌株特性鉴定包括菌株的基因型、自发回变数、对标准诱变剂的反应三个方面。有下列情况应对菌株进行鉴定：

1. 新获得的或长期保存的菌株投入使用前；
2. 制备一批新的冷冻保存株或冰冻干燥菌株；
3. 菌株的自发回变数不在正常范围内；
4. 菌株对标准诱变剂丧失敏感性；
5. 母菌株反复传代。

试验菌株组氨酸/色氨酸缺陷、脂多糖屏障缺陷、氨苄西林抗性、uvrB/A 修复缺陷、四环素抗性、自发回变数鉴定的判断标准参见附表 1；对标准诱变剂反应的鉴定按照平皿掺入法试验操作步骤进行，将受试物换成标准诱变剂，各试验菌株对标准诱变剂的反应标准参见附表 2。

附表 1 试验菌株基因型和自发回变数鉴定的判断标准

菌株	组氨酸缺陷	色氨酸缺陷	脂多糖屏障缺陷	氨苄西林抗性	uvrB/A 修复缺陷	四环素抗性	自发回变菌落参考数*	
							Ames 实验室	Zeiger 实验室
TA97	+	/	+	+	+	-	90~180*	75~200*
TA97a	+	/	+	+	+	-	90~180*	75~200*
TA98	+	/	+	+	+	-	30~50	20~50
TA100	+	/	+	+	+	-	100~200	75~200
TA102	+	/	+	+	-	+	240~320*	100~400*
TA1535	+	/	+	-	+	-	10~35	5~20
TA1537	+	/	+	-	+	-	3~15	5~20
WP2 uvrA	/	+	/	-	+	-	/	5~20
WP2 uvrA (pKM101)	/	+	/	+	+	-	/	100~200

注 “+”表示需
要组氨酸

“+”表示需
要色氨酸

“+”表示具
有 rfa 突变

“+”表示
具有 R 因子

“+”表示对于
鼠伤寒沙门菌
具有 Δ uvrB 突
变，对于大肠
杆菌具有
 Δ uvrA 突变

“+”表示
具有 pAQ1
质粒

*在体外代谢活化条件下自发回变菌落数略增。
对于各菌的自发回变范围，各个实验室在参考其他实验室数据的基础上，应建立自己的历史对照数据库，形成适合本实验室条件的适用范围。同时，实验室背景数据应当与文献报道相符。

附表 2 试验菌株对标准诱变剂的反应标准

诱变剂	剂量 (μ g/皿)	S9	TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537	WP2 uvrA	WP2 uvrA (pKM101)
柔毛霉素	6.0	-	124	3123	47	592	/	/	/	/
叠氮化钠	1.5	-	76	3	3000	188	320 (0.5 μ g)	/	/	/
ICR-191	1.0	-	1640	63	185	0	/	/	/	/
链霉黑素	0.25	-	inh	inh	inh	2230	/	/	/	/
丝裂霉素C	0.5	-	inh	inh	inh	2772	/	/	/	/
2,4,7-三硝基-9-芴酮	0.20	-	8377	8244	400	16	/	/	/	/
4-硝基-O-次苯二胺	20	-	2160	1599	798	0	/	/	/	/
4-硝基喹啉-N-氧化物	0.5	-	528	292	4220	287	/	/	610	/
甲基磺酸甲酯	1.0 (μ l)	-	174	23	2730	6586	/	/	/	/
敌克松	50.0	-	2688	1198	183	895	/	/	/	/
9-氨基吡啶	50	-	/	/	/	/	/	337	/	/
2-氨基苄	10	+	1742	6194	3026	261	/	/	/	/
苯并(a)芘	1.0	+	337	143	937	255	/	110 (5 μ g)	/	/
2-氨基蒽	20	+	/	/	/	/	380 (5 μ g)	/	300	/

注：（1）inh 表示抑菌。

（2）2-氨基蒽不能单独作为评价 S9 混合液活性的指示剂，如果选用它作为阳性对照物，每批 S9 还应另选一种需要微粒体酶代谢活化的致突变物证实其活性，如苯并（a）芘。

（二）试验用菌株的保存

鉴定合格的菌种应选择合适的方式进行保存，并定期进行鉴定。

六、术语

回复突变（Reverse mutation）：细菌在化学致突变物作用下由营养缺陷型回变到原养型。

基因突变（Gene mutation）：在化学致突变物作用下，细胞 DNA 中碱基对的排列顺序发生变化。

染色体断裂（Chromosome breakage）：染色体臂出现长度大于染色体臂宽度的裂隙。

S9：采用经酶诱导剂（如 Aroclor 1254 或苯巴比妥和 β -萘黄酮联合）诱导的大鼠制备肝匀浆，在 9000g 下离心 10min 后的肝匀浆上清液。

七、参考文献

1. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物遗传毒性研究技术指导原则，2018.
2. OECD TG471. Bacterial Reverse Mutation Test，2020.
3. 国家药品监督管理局. 细菌回复突变试验方法，2026.
4. 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 细菌回复突变试验: GB 15193.4—2014，2014.
5. VICH GL23（R2）. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Genotoxicity Testing，2025.

附件 6

兽药哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验技术指导原则

一、概述

哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验，是通过检测受试物引起动物（通常是啮齿类动物）骨髓细胞染色体结构畸变的能力，以评价受试物致突变性的方法。在实验动物通过适当的途径接触受试物一定时间后，用中期分裂相阻断剂（如秋水仙素）处理，抑制细胞分裂时纺锤体的形成，以便增加中期分裂相细胞的比例，随后处死、取材、制片、染色、分析染色体畸变。

本方法适用于检测染色体断裂剂。如果有证据表明受试物或其活性代谢产物在骨髓中无法达到足够的暴露量，则不适合使用本方法。本方法不适用于检测非整倍体诱导剂。

本指导原则适用于兽用化学药物、兽用中药和兽用天然药物。消毒剂参考使用。

二、基本原则

兽药哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验执行《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。

兽药哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验的设计，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、药理毒理研究信息、适应证、靶动物特点、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、试验设计

（一）实验动物

1. 动物选择

通常使用小鼠和大鼠。若采用其他哺乳动物，需提供相应的科学依据。实验动物应来源于有实验动物生产资质的单位。

采用健康、性成熟动物，啮齿类动物给药起始年龄建议为 6~10 周龄。

试验开始时，动物体重差异应不超过同性别平均体重的 $\pm 20\%$ 。

2. 动物数量

每组每个采样时间点可分析的雌、雄动物数至少各 5 只。

3. 动物管理

实验动物分别进行标记编号和称重，随机分组。

试验前，应进行检疫观察，环境适应期至少为 5 天。

饲养条件应符合现行国家标准要求。同一处理组的同一性别动物应一起笼养（每笼不超过 5 只，以不影响动物自由活动和症状观察、指标测定为宜）。若动物单只饲养须有充分的科学依

据。笼具的安放应随机安排，尽可能减小位置造成的影响。避免阳性对照物和受试物之间交叉污染。

（二）受试物

兽用化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

兽用中药、兽用天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

如果由于给药容量或给药方法限制，化学药物可使用原料药，中药可使用浸膏或提取物进行试验。试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

（三）试验分组

试验应同时设置受试物组、阳性对照组和阴性对照组（溶剂对照和/或空白对照）。

1. 受试物组

至少应设置 3 个剂量组。

原则上，如果受试物具有毒性，高剂量组动物应有中毒表现，低剂量组动物应无中毒表现。对于在低毒或无毒剂量下具有特异生物学活性的物质（如激素和丝裂原），可以以抑制骨髓细胞有丝分裂指数（50%以上）为指标确定最高剂量，按等比级数向下设置中、低剂量。单次给药毒性试验给予受试物最大剂量（最大使用浓度和最大灌胃容量）未出现中毒现象，单次给药推荐的最高剂量为 2000mg/kg。

2. 阳性对照组

采用已知的阳性诱变剂替代受试物。推荐的阳性诱变剂包括甲磺酸乙酯、甲磺酸甲酯、乙基亚硝基脲、丝裂霉素 C、环磷酰胺、环磷酰胺一水合物、三亚乙基蜜胺。阳性对照物的剂量水平应预期在体内产生高于本底值的染色体结构畸变，且增高程度能达到可检出的水平。

3. 溶剂对照组

仅含和受试物组相同的溶剂，不含受试物。

4. 空白对照组

如果现有资料不能证实溶剂不具有致突变性，还应设空白对照。

（四）给药方案

一般采用灌胃（或注射）给药。通常单次给药（或一日内以不超过 2~3h 为间隔分多次给药），采用多次给药（给药间隔为 24h）需提供科学依据。

（五）采样

采样前，经腹腔注射适量的中期分裂相阻断剂（如秋水仙素），对于小鼠，通常在采样前 3~5h，对于大鼠，通常在采样前 2~5h。

如果采用单次给药，应在单次给药后的两个不同时间采集骨髓样本。对于啮齿类动物，第一个采样时间应在给药后完成 1.5 个正常细胞周期时（通常为给药后 12~18h），第二个采样时间推荐在第一次采样后 24h。受试物第一个采样点应包括所有剂量组，第二个采样点可仅包括高剂量组。

如果采用多次给药（给药间隔为 24h），通常在末次给药后约 1.5 个正常细胞周期时采样。

（六）观察指标

1. 临床观察

每天至少进行一次一般临床观察并记录临床表现，最好在每天的同一时间进行。在给药期间，每天观察实验动物的发病和死亡情况。

2. 细胞分析

动物处死后迅速取股骨或胫骨，获取骨髓细胞，制片、染色后，阅片分析。

每只动物分析不少于 100 个中期分裂相细胞，每个剂量组不少于 1000 个中期分裂相细胞，以测定染色体结构畸变细胞的百分率（即染色体结构畸变率），若阴性对照历史数据库的染色体结构畸变率背景值低于 1%，需要计数更多的中期分裂相细胞。染色单体型畸变与染色体型畸变应分别记录并记录亚型（断裂、交换）。裂隙应单独记录，但不计入畸变率中。同时应单独记录多倍体和内复制等数目畸变，但不计入畸变率中。主要观察项目见附录（一）。

（七）结果分析及评价

结果中应描述各剂量组的毒性大小，包括一般症状、死亡情况。主要评价指标为染色体结构畸变率。每组动物按性别分别计算染色体结构畸变率的均值和标准差，若无明显性别差异，可合并计算结果。可用 χ^2 检验或其他适当的显著性检验方法对所得试验数据进行统计学分析。

应以表格形式列出每只动物数据，包括一般症状、死亡情况、观察的细胞数、含有结构畸变染色体的细胞数、染色体结构畸变率、不同类型染色体畸变数及其频率等。多倍体和内复制等数目畸变、裂隙应单独记录，不计入总的畸变率中。多倍体数目的增加提示受试物可能会抑制有丝分裂或诱导染色体数目畸变。出现染色体内复制的细胞数增多提示受试物可能会影响细胞周期。同时，提供本实验室历史性的阴性对照和阳性对照资料，包括范围、均值、标准差、95%置信区间、样品数和时间等。

在阴性、阳性对照数据处于本实验室历史对照背景范围内，且阳性对照较阴性对照染色体结构畸变率显著升高前提下，若同时满足以下情况可判定为阳性结果，若均不满足则判定为阴性结果：

1. 与阴性对照相比，受试物至少一个剂量组染色体结构畸变率显著升高；
2. 升高在至少一个采样点具有剂量依赖性；
3. 任一受试物组染色体结构畸变率超出历史阴性对照数据的分布范围。

明显的阳性或阴性结果通常不需要重复试验。如果结果不是明显的阳性或阴性，需要分析更多的细胞或改变试验条件进行重复试验。

四、试验报告

按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

五、附录

（一）染色体数目异常和结构异常种类及特征描述

染色体数目异常		染色体结构异常	
种类	特征描述	种类	特征描述
多倍体	染色体超过二倍体的整倍性改变，如三倍体和四倍体	断裂	染色体或染色单体上存在的狭窄非染色区域，其宽度大于染色单体的宽度
非整倍体	染色体非整倍性改变，丢失或增加一条或多条染色体	裂隙	染色体或染色单体上存在的狭窄非染色区域，其宽度小于染色单体的宽度
内复制	包膜内特殊形式的多倍化现象	微小体	由染色体臂内断裂形成的微小断片，成圆点状
/	/	着丝粒环	染色体臂断裂后，由带着丝粒节段两端连接而成的环，常伴有一对无着丝粒断片
/	/	无着丝粒环	染色体臂断裂后，由无着丝粒节段的断片连接而成的环
/	/	单体互换	可形成三辐体（三条臂构型）、四辐体（四条臂构型）或其他形状的构型
/	/	双微小体	成对的染色质小体
/	/	非特异性型变化	如粉碎化、着丝点细长化、黏着等

（二）历史对照数据库的建立

实验室应建立历史对照数据库，包括结果范围和分布，并应采用质量控制方法确定对照数据处于受控状态，如 C-图或 X-bar 图等控制图表。对试验方案的任何更改，都应评估其是否会影响试验数据与实验室现有历史对照数据的一致性。只有当专家判定数据分布与前期数据库存在重大差异时，才需建立新的历史对照数据库。

首次建立历史阴性对照数据分布时，阴性对照数据应与已公开发表的对照数据（若有）一致。随着更多试验数据的纳入，阴性对照数据理想情况下应在历史阴性对照数据库分布的 95% 置信区间内，但对于在 95% 置信区间外的阴性对照数据，如果不是极端异常值，并且有证据表明试验系统处于受控状态，无技术或人为差错，仍可将其纳入历史对照数据库。

六、术语

染色体型畸变（Chromosome-type aberration）：染色体结构损伤，表现为在两个染色单体的相同位点均出现断裂或断裂重组的改变。

染色单体型畸变（Chromatid-type aberration）：染色体结构损伤，表现为染色单体断裂或染色单体断裂重组的损伤。

染色体数目畸变（Numerical-type aberration）：哺乳动物细胞染色体数目的改变。

着丝粒（Centromere/kinetochore）：在细胞分裂期染色体与纺锤体纤维连接的区域，以使子染色体有序移动到子细胞两极。

七、参考文献

1. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物遗传毒性研究技术指导原则，2018.
2. OECD TG475. Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test，2016.
3. 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范，2015.
4. 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验: GB 15193.6—2014，2015.
5. VICH GL23（R2）. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Genotoxicity Testing，2025.

附件 7

兽药哺乳动物红细胞微核试验技术指导原则

一、概述

哺乳动物红细胞微核试验，是通过检测哺乳动物（通常为啮齿类动物，如小鼠或大鼠）骨髓和/或外周血红细胞中微核出现率，以评价受试物引起染色体损伤的方法。微核是在细胞的有丝分裂后期染色体有规律地进入子细胞形成细胞核时，仍然滞留在细胞质中的染色单体或染色体的无着丝粒断片或环。它在末期以后，单独形成一个或几个规则的次核，包含在细胞的胞质中，由于比核小得多，故称微核。这种情况的出现往往是受到染色体断裂剂作用的结果。另外，也可能在受到纺锤体毒物的作用时，主核未能形成，代之以一组小核。此时小核往往比一般典型的微核稍大。微核可以出现在多种细胞中，但在有核细胞中较难与正常核的分叶及核突出物相区别。由于红细胞在成熟之前最后一次分离后数小时内可将主核排出，而保留微核于嗜多染红细胞（Polychromatic erythrocyte, PCE）中，因此通常计数 PCE 中的微核。

本方法适用于检测染色体断裂剂和部分非整倍体诱导剂。如果有证据表明受试物或其活性代谢产物在靶组织中无法达到足够的暴露量，则不适合使用本方法。

本指导原则适用于兽用化学药物、兽用中药和兽用天然药物。消毒剂参考使用。

二、基本原则

兽药哺乳动物红细胞微核试验执行《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。

兽药哺乳动物红细胞微核试验的设计，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、药理毒理研究信息、适应证、靶动物特点、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、试验设计

（一）实验动物

1. 动物选择

通常使用小鼠和大鼠骨髓，也可通过小鼠外周血中未成熟红细胞（如嗜多染红细胞）或大鼠血液新生网织红细胞测定。由于大鼠脾脏可清除血液中的微核化红细胞，若使用大鼠外周血，需采用具有足够灵敏度的检测方法。也可使用已证明了对断裂剂/非整倍体诱导剂具有足够灵敏度、来源于其他哺乳动物的骨髓或外周血的未成熟红细胞，并提供相应的科学依据。当使用其他哺乳动物的外周血时，必须证实脾脏对循环系统中微核化红细胞的清除不会影响微核的检测。实验动物应来源于有实验动物生产资质的单位。

采用健康初成年动物，啮齿类动物给药起始年龄建议为 6~10 周龄。

试验开始时，动物体重差异应不超过同性别平均体重的 $\pm 20\%$ 。

2. 动物数量

每组每个采样时间点可分析的雌、雄动物数至少各 5 只。

3. 动物管理

实验动物分别进行标记编号和称重，随机分组。

试验前，应进行检疫观察，环境适应期至少为 5 天。

饲养条件应符合现行国家标准要求。同一处理组的同一性别动物应一起笼养（每笼不超过 5 只，以不影响动物自由活动和症状观察、指标测定为宜）。若动物单只饲养须有充分的科学依据。笼具的安放应随机安排，尽可能减小位置造成的影响。避免阳性对照物和受试物之间交叉污染。

（二）受试物

兽用化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

兽用中药、兽用天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

如果由于给药容量或给药方法限制，化学药物可使用原料药，中药可使用浸膏或提取物进行试验。试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

（三）试验分组

试验应同时设置受试物组、阳性对照组和阴性对照组（溶剂对照和/或空白对照）。

1. 受试物组

至少应设置 3 个剂量组。

原则上，如果受试物具有毒性，高剂量组动物应有中毒表现，低剂量组动物应无中毒表现。对于在低毒或无毒剂量下具有特异生物学活性的物质（如激素和丝裂原），可以以抑制骨髓细胞有丝分裂指数（50%以上）为指标确定最高剂量，按等比级数向下设置中、低剂量。单次给药毒性试验给予受试物最大剂量（最大使用浓度和最大灌胃容量）未出现中毒现象，给药时间 < 14 天的推荐最高剂量为 2000mg/kg/天，给药时间 ≥ 14 天的推荐最高剂量为 1000mg/kg/天。

2. 阳性对照组

采用已知的阳性诱变剂替代受试物。推荐的阳性诱变剂包括甲磺酸乙酯、甲磺酸甲酯、乙基亚硝基脲、丝裂霉素 C、环磷酰胺、环磷酰胺一水合物、三亚乙基蜜胺、秋水仙素或长春碱（作为非整倍体诱导剂）。阳性对照物的剂量水平应预期在体内产生高于本底值的微核，且增高程度能达到可检出的水平。

3. 溶剂对照组

仅含和受试物组相同的溶剂，不含受试物。

4. 空白对照组

如果现有资料不能证实溶剂不具有致突变性，还应设空白对照。

（四）给药方案

一般采用灌胃（或注射）给药，根据具体情况选择合适的给药方案，可采用单次给药（或一日内以不超过 2~3h 为间隔分多次给药）或多次给药（给药间隔为 24h），首选多次给药。

（五）采样

采样时间根据靶组织中微核出现和消失的动力学特征确定。

如果采用单次给药，应至少采样 2 次，通常骨髓采样时间应在给药后 24~48h 内，外周血采样时间应在给药后 36~72h 内。受试物第一个采样点应包括所有剂量组，第二个采样点可仅包括高剂量组。

如果给药 2 次（约每 24h 给药一次），骨髓采样时间为末次给药后 18~24h，外周血采样时间为末次给药后 36~48h。

如果给药 3 次及 3 次以上（约每 24h 给药一次），骨髓采样时间为末次给药后 24h 内，外周血采样时间为末次给药后 40h 内。

（六）观察指标

1. 临床观察

每天至少进行一次一般临床观察并记录临床表现，最好在每天的同一时间进行。在给药期间，每天观察实验动物的发病和死亡情况。

2. 细胞分析

动物处死后迅速取股骨或胫骨，获取骨髓样品，或从尾静脉或其他适当的血管采集外周血样品，制片、染色后，阅片分析。可用 Giemsa 染色，也可用 DNA 特异性染料（如吖啶橙或 Hoechst 33258 加 Pyronin-Y）。如果需要鉴别受试物是染色体断裂剂还是非整倍体诱导剂，可用荧光原位杂交（Fluorescence in situ hybridization, FISH）或引物原位标记等方法。

每只动物至少计数 500 个（骨髓）或 2000 个（外周血）红细胞以确定未成熟红细胞（嗜多染红细胞（PCE）或网织红细胞（Reticulocyte, RET））占总红细胞（未成熟红细胞和正染红细胞（Normochromatic erythrocyte, NCE））的比例；每只动物至少计数 4000 个未成熟红细胞，观察并计数其中含有微核的未成熟红细胞，以测定未成熟红细胞的微核率（一个细胞中出现两个或

多个微核时，仍按一个含微核细胞计数）。若阴性对照历史数据库的微核率背景值低于 0.1%，需要计数更多的未成熟红细胞。给药组未成熟红细胞占总红细胞的比例不应低于阴性对照组的 20%。如果给药时间在 4 周以上，可以直接计数 4000 个红细胞中的微核率。

也可采用已经过充分验证的自动化分析系统（如图像分析系统、流式细胞术、激光扫描细胞计数仪等）对微核进行检测。

（七）结果分析及评价

结果中应描述各剂量组的毒性大小，包括一般症状、死亡情况等，以及 PCE/（PCE+NCE）或 RET/（RET+NCE）的比例。主要评价指标为嗜多染红细胞微核率或网织红细胞微核率。每组动物按性别分别计算未成熟红细胞微核率的均值和标准差，若无明显性别差异，可合并计算结果。可用泊松（Poisson）分布、u 检验或其他适当的统计学方法对所得试验数据进行统计学分析。

应以表格形式列出每只动物数据，包括一般症状、死亡情况、未成熟红细胞数、含微核的未成熟红细胞数以及 PCE/（PCE+NCE）或 RET/（RET+NCE）的比例等。同时，提供本实验室历史性的阴性对照和阳性对照资料，包括范围、均值、标准差、95%置信区间、样品数和时间等。

在阴性、阳性对照数据处于本实验室历史对照背景范围内，且阳性对照较阴性对照微核率显著升高前提下，若同时满足以下情况可判定为阳性结果，若均不满足则判定为阴性结果：

1. 与阴性对照相比，受试物至少一个剂量组微核率显著升高；
2. 升高在至少一个采样点具有剂量依赖性；
3. 任一受试物组微核率超出历史阴性对照数据的分布范围。

该试验出现阳性结果应考虑阳性结果是否归因于红细胞生成的干扰（如再生障碍性贫血、髓外造血作用）、应激、体温偏低或过高，脾脏功能的改变可影响含微核细胞从血液中的清除，导致循环中的含微核红细胞数量轻微升高。

明显的阳性或阴性结果通常不需要重复试验。如果结果不是明显的阳性或阴性，需要分析更多的细胞或改变试验条件进行重复试验。

四、试验报告

按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

五、附录

历史对照数据库的建立

实验室应建立历史对照数据库，包括结果范围和分布，并应采用质量控制方法确定对照数据处于受控状态，如 C-图或 X-bar 图等控制图表。对试验方案的任何更改，都应评估其是否会影响试验数据与实验室现有历史对照数据的一致性。只有当专家判定数据分布与前期数据库存在重大差异时，才需建立新的历史对照数据库。

首次建立历史阴性对照数据分布时，阴性对照数据应与已公开发表的对照数据（若有）一致。随着更多试验数据的纳入，阴性对照数据理想情况下应在历史阴性对照数据库分布的 95%置

信区间内，但对于在 95%置信区间外的阴性对照数据，如果不是极端异常值，并且有证据表明试验系统处于受控状态，无技术或人为差错，仍可将其纳入历史对照数据库。

六、术语

微核（Micronucleus）：细胞有丝分裂后期，染色体有规律地进入子细胞形成细胞核时，仍留在细胞质中的整条染色单体或染色体的无着丝断片或环。在末期单独形成一个或几个规则的次核，被包含在细胞的胞质内而形成。

着丝粒（Centromere/kinetochore）：在细胞分裂期染色体与纺锤体纤维连接的区域，以使子染色体有序移动到子细胞两极。

正染红细胞（Normochromatic erythrocyte）：成熟的红细胞，缺乏核糖体，可用选择性核糖体染料将其与未成熟的嗜多染红细胞区分。

嗜多染红细胞（Polychromatic erythrocyte）：未成熟的红细胞，处于发育的中间期，仍含有核糖体，故可用选择性核糖体染料将其与成熟的正染红细胞区分。

非整倍体（Aneuploidy）：二倍体染色体组中缺少或额外增加一条或若干条完整的染色体的变异类型。

染色体断裂（Chromosome breakage）：染色体臂出现长度大于染色体臂宽度的裂隙。

七、参考文献

1. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物遗传毒性研究技术指导原则，2018.
2. OECD TG474. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test，2016.
3. 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范，2015.
4. 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验: GB 15193.5—2014，2014.
5. VICH GL23（R2）. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Genotoxicity Testing，2025.

附件 8

兽药哺乳动物精原细胞染色体畸变试验技术指导原则

一、概述

哺乳动物精原细胞染色体畸变试验，是通过检测受试物引起动物（通常是啮齿类动物）精原细胞染色体结构畸变的能力，以评价受试物对雄性生殖细胞的致突变性的方法。在实验动物通过适当的途径接触受试物一定时间后，用中期分裂相阻断剂（如秋水仙素）处理，随后处死、取材，经低渗、固定、软化及染色后制备精原细胞染色体标本，在显微镜下观察中期分裂相细胞，分析精原细胞染色体畸变。

如果有证据表明受试物或其活性代谢产物在睾丸中无法达到足够的暴露量，则不适合使用本方法。本方法不适用于检测染色体数目畸变。

本指导原则适用于兽用化学药物、兽用中药和兽用天然药物。消毒剂参考使用。

二、基本原则

兽药哺乳动物精原细胞染色体畸变试验执行《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。

兽药哺乳动物精原细胞染色体畸变试验的设计，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、药理毒理研究信息、适应证、靶动物特点、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、试验设计

（一）实验动物

1. 动物选择

通常采用健康且性成熟雄性小鼠，给药起始年龄建议为 8~12 周龄。若采用其他雄性哺乳动物，需提供相应的科学依据。实验动物应来源于有实验动物生产资质的单位。

试验开始时，动物体重差异应不超过平均体重的±20%。

2. 动物数量

每组每个采样时间点至少包括 5 只可用于分析的动物。

3. 动物管理

实验动物分别进行标记编号和称重，随机分组。

试验前，应进行检疫观察，环境适应期至少为 5 天。

饲养条件应符合现行国家标准要求。同一处理组的动物应一起笼养（每笼不超过 5 只，以不影响动物自由活动和症状观察、指标测定为宜）。若动物单只饲养须有充分的科学依据。笼具的安放应随机安排，尽可能减小位置造成的影响。避免阳性对照物和受试物之间交叉污染。

（二）受试物

兽用化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

兽用中药、兽用天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

如果由于给药容量或给药方法限制，化学药物可使用原料药，中药可使用浸膏或提取物进行试验。试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

（三）试验分组

试验应同时设置受试物组、阳性对照组和阴性对照组（溶剂对照和/或空白对照）。

1. 受试物组

至少应设置 3 个剂量组。

原则上，如果受试物具有毒性，高剂量组动物应有中毒表现，低剂量组动物应无中毒表现。对于在低毒或无毒剂量下具有特异生物学活性的物质（如激素和丝裂原），可以以抑制精原细胞有丝分裂指数（50%以上）为指标确定最高剂量，按等比级数向下设置中、低剂量。单次给药毒性试验给予受试物最大剂量（最大使用浓度和最大灌胃容量）未出现中毒现象，给药时间 < 14 天的推荐最高剂量为 2000mg/kg/天，给药时间 ≥ 14 天的推荐最高剂量为 1000mg/kg/天。

2. 阳性对照组

采用已知的阳性诱变剂替代受试物。推荐的阳性诱变剂包括环磷酰胺、环磷酰胺一水合物、环己胺、丝裂霉素 C、丙烯酰胺单体、三亚乙基蜜胺。阳性对照物的剂量水平应预期在体内产生高于本底值的精原细胞染色体结构畸变，且增高程度能达到可检出的水平。

3. 溶剂对照组

仅含和受试物组相同的溶剂，不含受试物。

4. 空白对照组

如果现有资料不能证实溶剂不具有致突变性，还应设空白对照。

（四）给药方案

一般采用灌胃（或注射）给药。通常单次给药（或一日内分两次给药，给药间隔最好为4~6h）。采用其他给药方案需提供科学依据。

（五）采样

采样前，经腹腔注射适量的中期分裂相阻断剂（如秋水仙素），对于小鼠和大鼠，通常在采样前3~5h。

如果采用单次给药，高剂量组应于末次给药后的第24h和第48h采样，中、低剂量组均在末次给药后24h采样。根据需要可以采用其他采样时间，但需提供科学依据，如当受试物能产生S期独立效应时，采样时间可能会提前。

（六）观察指标

1. 临床观察

每天至少进行一次一般临床观察并记录临床表现，最好在每天的同一时间进行。在给药期间，每天观察实验动物的发病和死亡情况。

2. 细胞分析

动物处死后迅速取出睾丸，获取精原细胞，制片、染色后，阅片分析。

每只动物至少计数100个中期分裂相细胞，每个剂量组至少观察500个中期分裂相细胞，以测定染色体结构畸变细胞的百分率（即染色体结构畸变率）。若阴性对照历史数据库的染色体结构畸变率背景值低于1%，需要计数更多的中期分裂相细胞，若观察到的畸变细胞数量较多，可以减少观察的细胞数。染色单体型畸变与染色体型畸变应分别记录并记录亚型（断裂、交换）。裂隙应单独记录，但不计入畸变率中。同时应单独记录多倍体和内复制等数目畸变，但不计入畸变率中。主要观察项目见附录。

（七）结果分析及评价

结果中应描述各剂量组的毒性大小，包括一般症状、死亡情况等。主要评价指标为染色体结构畸变率。可用二项分布或其他适当的统计学方法对所得试验数据进行统计学分析。

应以表格形式列出每只动物数据，包括一般症状、死亡情况、观察的细胞数、含有结构畸变染色体的细胞数、染色体结构畸变率、不同类型染色体畸变数及其频率等。多倍体和内复制等数目畸变、裂隙应单独记录，不计入总的畸变率中。多倍体数目的增加提示受试物可能会抑制有丝分裂或诱导染色体数目畸变。出现染色体内复制的细胞数增多提示受试物可能会影响细胞周期。同时，提供本实验室历史性的阴性对照和阳性对照资料，包括范围、均值、标准差、95%置信区间、样品数和时间等。

在阴性、阳性对照数据处于本实验室历史对照背景范围内，且阳性对照较阴性对照染色体结构畸变率显著升高前提下，若同时满足以下情况可判定为阳性结果，若均不满足则判定为阴性结果：

1. 与阴性对照相比，受试物至少一个剂量组染色体结构畸变率显著升高；
2. 升高在至少一个采样点具有剂量依赖性；

3. 任一受试物组染色体结构畸变率超出历史阴性对照数据的分布范围。

明显的阳性或阴性结果通常不需要重复试验。如果结果不是明显的阳性或阴性，需要分析更多的细胞或改变试验条件进行重复试验。

四、试验报告

按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

五、附录

染色体数目异常和结构异常种类及特征描述

染色体数目异常		染色体结构异常	
种类	特征描述	种类	特征描述
多倍体	染色体超过二倍体的整倍性改变，如三倍体和四倍体	断裂	染色体或染色单体上存在的狭窄非染色区域，其宽度大于染色单体的宽度
非整倍体	染色体非整倍性改变，丢失或增加一条或多条染色体	裂隙	染色体或染色单体上存在的狭窄非染色区域，其宽度小于染色单体的宽度
内复制	包膜内特殊形式的多倍化现象	微小体	由染色体臂内断裂形成的微小断片，成圆点状
/	/	着丝粒环	染色体臂断裂后，由带着丝粒节段两端连接而成的环，常伴有一对无着丝粒断片
/	/	无着丝粒环	染色体臂断裂后，由无着丝粒节段的断片连接而成的环
/	/	单体互换	可形成三辐体（三条臂构型）、四辐体（四条臂构型）或其他形状的构型
/	/	双微小体	成对的染色质小体
/	/	非特定性型变化	如粉碎化、着丝点细长化、黏着等

六、术语

精原细胞（Spermatogonium）：雄性哺乳动物曲细精管上皮中能经过多次有丝分裂增殖并经减数分裂产生精母细胞的干细胞，为原始的雄性生殖细胞。具有与体细胞相同的染色体数目。

染色体型畸变（Chromosome-type aberration）：染色体结构损伤，表现为在两个染色单体的相同位点均出现断裂或断裂重组的改变。

染色单体型畸变（Chromatid-type aberration）：染色体结构损伤，表现为染色单体断裂或染色单体断裂重组的损伤。

染色体数目畸变（Numerical-type aberration）：哺乳动物细胞染色体数目的改变。

着丝粒（Centromere/kinetochore）：在细胞分裂期染色体与纺锤体纤维连接的区域，以使子染色体有序移动到子细胞两极。

七、参考文献

1. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物遗传毒性研究技术指导原则，2018.

2. OECD TG483. Mammalian Spermatogonial Chromosomal Aberration Test，2016.

3. 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 小鼠精原细胞或精母细胞染色体畸变试验: GB 15193.8—2014，2014.

4. VICH GL23（R2）. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Genotoxicity Testing，2025.

附件 9

兽药体外哺乳动物细胞染色体畸变试验技术指导原则

一、概述

体外哺乳动物细胞染色体畸变试验，是通过检测受试物诱发体外培养的哺乳动物细胞染色体结构畸变的能力，以评价受试物致突变性的方法。在加入和不加入外源代谢活化系统的条件下，使培养的哺乳动物细胞暴露于受试物，应用中期分裂相阻断剂处理，使细胞停止在中期分裂相，随后收获细胞，制片，染色，分析细胞染色体畸变，从而判断受试物是否具有致突变性。

本方法适用于检测染色体断裂剂，不适用于检测非整倍体诱导剂。

本指导原则适用于兽用化学药物、兽用中药和兽用天然药物。消毒剂参考使用。

二、基本原则

兽药体外哺乳动物细胞染色体畸变试验执行《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。

兽药体外哺乳动物细胞染色体畸变试验的设计，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、药理毒理研究信息、适应证、靶动物特点、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、试验设计

（一）细胞

可采用已建立的细胞系（如中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、中国仓鼠肺（CHL）细胞等），也可采用原代培养细胞（如哺乳动物外周血淋巴细胞）。一般情况下，推荐使用 CHL 细胞。所用细胞应在生长性能、染色体数目和核型、染色体畸变自发频率等方面基本保持稳定，细胞周期时间应与公开发表的细胞特征一致。细胞系需定期检查核型和染色体数目、有无支原体污染等。

（二）受试物

兽用化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

兽用中药、兽用天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

（三）试验分组

试验应同时设置受试物组、阳性对照组和阴性对照组（溶剂对照和/或空白对照）。各组均应分别在代谢活化系统存在和不存在平行条件下测试。

1. 受试物组

至少应包含 3 个可用于结果分析的浓度。每一浓度一般平行 2 皿；若能获得足够细胞数，或超过 3 个检测浓度时，可用单皿。

最高浓度主要取决于受试物的细胞毒性及其溶解度：

（1）对于可溶性的无细胞毒性的受试物，推荐的最高浓度一般为 10mM，2mg/ml 或 2μl/ml（选用较低者）。

（2）对于可溶性的有细胞毒性的受试物，应根据细胞毒性大小确定最高浓度。细胞系可通过相对群体倍增数（Relative population doubling, RPD）或相对细胞增长数（Relative increase in cell count, RICC）的降低来反映细胞毒性，外周血淋巴细胞可通过有丝分裂指数（Mitotic index, MI）的降低来反映细胞毒性。最高浓度所产生的细胞毒性应为 50%~60%。细胞毒性评价公式参见附录（一）。

（3）对于难溶性的受试物，一般采用最小沉淀浓度作为最高浓度。

对最高浓度之下的其他浓度，对于细胞毒性小或无细胞毒性的受试物，一般浓度间距为 2~3 倍；对于有细胞毒性的受试物，所选择的浓度应覆盖产生细胞毒性的范围，并且包括具有中度或少/无细胞毒性的浓度；在一些情况下，如受试物具有较陡峭的浓度反应关系，则可适当缩小浓度间距或将检测的浓度增加至 3 个以上。

2. 阳性对照组

采用已知的阳性诱变剂替代受试物，其他处理和受试物组相同。推荐的阳性对照物参见附录（二）。阳性对照物的浓度应预期产生超过本底值的、可重复的染色体结构畸变细胞增多。

3. 溶剂对照组

仅含和受试物组相同的溶剂，不含受试物，其他处理和受试物组相同。

4. 空白对照组

如果现有资料不能证实溶剂不具有致突变性，还应设空白对照。

（四）代谢活化系统

常用的代谢活化系统是经酶诱导剂（如 Aroclor 1254 或苯巴比妥和 β -萘黄酮联合）诱导处理后的大鼠肝脏微粒体酶 S9 混合液，但也可使用其他系统。如果选择其他代谢活化系统，应提供科学依据以证明该选择合理。

S9 在试验介质中的终浓度一般为 1%~10%（v/v）。

（五）细胞处理及收获时间

在代谢活化或非代谢活化条件下，受试物和细胞作用 3~6h，在 1.5 个正常细胞周期时收获细胞；在非代谢活化条件下，受试物和细胞还应持续作用至 1.5 个正常细胞周期时收获细胞。对于某些受试物，与细胞接触时间/收获细胞时间可能要大于 1.5 个正常细胞周期。

（六）观察指标

应观察记录各浓度组细胞毒性大小和沉淀情况。

任一处理条件下各组应至少观察 300 个分散良好的中期分裂相细胞，当采用平行 2 皿时，则应均一分配。若观察到大量染色体畸变细胞，分析细胞数可相应减少。应分别记录各组观察的中期分裂相细胞数、含有结构畸变染色体的细胞数和畸变类型，染色单体型畸变与染色体型畸变应分别记录并记录亚型（断裂、交换）。裂隙应单独记录，但不计入畸变率中。同时应单独记录多倍体和内复制等数目畸变，但不计入畸变率中。主要观察项目见附录（三）。

（七）结果分析及评价

结果中应描述各浓度组细胞毒性大小和沉淀情况。主要评价指标为染色体结构畸变细胞的百分率（即染色体结构畸变率）。可用 χ^2 检验或其他适当的统计学方法对所得试验数据进行统计学分析。

试验数据按不同处理条件、不同组别列表提供，包括细胞毒性大小和沉淀情况；观察的细胞数、含有结构畸变染色体的细胞数、染色体结构畸变率、不同类型染色体畸变数及其频率等。多倍体和内复制等数目畸变、裂隙应单独记录，不计入总的畸变率中。虽然非整倍体诱导剂可诱导多倍体产生，但仅多倍体产生并不能提示受试物具有诱导非整倍体的潜力，多倍体数目的增加提示受试物可能会抑制有丝分裂或诱导染色体数目畸变。出现染色体内复制的细胞数增多提示受试物可能会影响细胞周期。同时，提供本实验室历史性的阴性对照和阳性对照资料，包括范围、均值、标准差、95%置信区间和样品数等。

在细胞毒性符合要求，阴性、阳性对照数据处于本实验室历史对照背景范围内，且阳性对照较阴性对照染色体结构畸变率显著升高前提下，若同时满足以下情况可判定为阳性结果，若均不满足则判定为阴性结果：

1. 与阴性对照相比，受试物在任一处理条件下至少一个浓度组染色体结构畸变率显著升高；
2. 升高具有浓度依赖性；
3. 任一受试物组染色体结构畸变率超出历史阴性对照数据的分布范围。

结果判定时应首先考虑试验结果的生物学意义，统计学分析有助于结果的评价。

该试验出现阳性结果应考虑阳性结果是否归因于体内不存在的条件（如 pH 值、渗透压、沉淀物）、是否仅发生于产生最高细胞毒性的浓度（如阳性结果发生于细胞生长抑制 $\geq 50\%$ 时）。

明显的阳性或阴性结果通常不需要重复试验。如果结果不是明显的阳性或阴性，需要分析更多的细胞（当可行时），或改变试验条件进行重复试验（如改变试验浓度间距、改变代谢活化条件等）。

四、试验报告

按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

五、附录

（一）细胞毒性评价公式

1. 对于细胞系，可通过相对群体倍增数（Relative population doubling, RPD）和相对细胞增长数（Relative increase in cell count, RICC）的降低来反映细胞毒性。

（1）细胞毒性（%）=100%-RPD

式中：

$$RPD = \frac{\text{受试物组细胞倍增数}}{\text{溶剂对照组细胞倍增数}} \times 100\%$$

倍增数 = $\lg(\text{试验后细胞数} / \text{试验前细胞数}) / \lg 2$

（2）细胞毒性（%）=100%-RICC

式中：

$$RICC = \frac{\text{受试物组试验后细胞数} - \text{受试物组试验前细胞数}}{\text{溶剂对照组试验后细胞数} - \text{溶剂对照组试验前细胞数}} \times 100\%$$

2. 对于外周血淋巴细胞，可通过有丝分裂指数（Mitotic index, MI）的降低来反映细胞毒性。

细胞毒性（%）=100%-MI

式中：

$$MI = \frac{\text{有丝分裂细胞数}}{\text{观察细胞总数}} \times 100\%$$

（二）推荐的阳性对照物

根据受试物的性质和结构选择适宜的阳性对照物，阳性对照物应是已知的断裂剂，能引起可检出且可重复的阳性结果。当不存在外源性活化系统时，可使用甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、乙基亚硝基脲、丝裂霉素 C、4-硝基喹啉-N-氧化物、阿糖胞苷等。当存在外源性活化系统时，可使用苯并（a）芘、环磷酰胺等。

不加 S9 的阳性对经常用丝裂霉素 C，其常用浓度为 0.2~0.8 $\mu\text{g/ml}$ ，其 pH 为 6~9 的水溶液在 0~5 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存能存放 1 周。加 S9 的阳性对经常用环磷酰胺，其常用浓度为 8~15 $\mu\text{g/ml}$ ，其水溶液不稳定，应现配现用。

（三）染色体数目异常和结构异常种类及特征描述

染色体数目异常		染色体结构异常	
种类	特征描述	种类	特征描述
多倍体	染色体超过二倍体的整倍性改变，如三倍体和四倍体	断裂	染色体或染色单体上存在的狭窄非染色区域，其宽度大于染色单体的宽度
非整倍体	染色体非整倍性改变，丢失或增加一条或多条染色体	裂隙	染色体或染色单体上存在的狭窄非染色区域，其宽度小于染色单体的宽度
内复制	包膜内特殊形式的多倍化现象	微小体	由染色体臂内断裂形成的微小断片，成圆点状
/	/	着丝粒环	染色体臂断裂后，由带着丝粒节段两端连接而成的环，常伴有一对无着丝粒断片
/	/	无着丝粒环	染色体臂断裂后，由无着丝粒节段的断片连接而成的环
/	/	单体互换	可形成三辐体（三条臂构型）、四辐体（四条臂构型）或其他形状的构型
/	/	双微小体	成对的染色质小体
/	/	非特性型变化	如粉碎化、着丝点细长化、黏着等

（四）历史对照数据库的建立

实验室应建立历史对照数据库，包括结果范围和分布，并应采用质量控制方法确定对照数据处于受控状态，如 C-图或 X-bar 图等控制图表。对试验方案的任何更改，都应评估其是否会影响试验数据与实验室现有历史对照数据的一致性。任何重大不一致都将导致需要建立新的历史对照数据库。

首次建立历史阴性对照数据分布时，阴性对照数据应与已公开发表的对照数据（若有）一致。随着更多试验数据的纳入，阴性对照数据理想情况下应在历史阴性对照数据库分布的 95% 置信区间内，但对于在 95% 置信区间外的阴性对照数据，如果不是极端异常值，并且有证据表明试验系统处于受控状态，无技术或人为差错，仍可将其纳入历史对照数据库。

六、术语

染色体型畸变（Chromosome-type aberration）：染色体结构损伤，表现为在两个染色单体的相同位点均出现断裂或断裂重组的改变。

染色单体型畸变（Chromatid-type aberration）：染色体结构损伤，表现为染色单体断裂或染色单体断裂重组的损伤。

染色体数目畸变（Numerical-type aberration）：哺乳动物细胞染色体数目的改变。

着丝粒（Centromere/kinetochore）：在细胞分裂期染色体与纺锤体纤维连接的区域，以使子染色体有序移动到子细胞两极。

S9：采用经酶诱导剂（如 Aroclor 1254 或苯巴比妥和β-萘黄酮联合）诱导的大鼠制备肝匀浆，在 9000g 下离心 10min 后的肝匀浆上清液。

七、参考文献

1. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物遗传毒性研究技术指导原则，2018.
2. OECD TG473. *In Vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test，2016.

3. 国家药品监督管理局. 体外哺乳动物染色体畸变试验方法, 2026.
4. 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 体外哺乳类细胞染色体畸变试验: GB 15193.23—2014, 2014.
5. VICH GL23 (R2) . Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Genotoxicity Testing, 2025.

附件 10

兽药体外哺乳动物细胞微核试验技术指导原则

一、概述

体外哺乳动物细胞微核试验，是通过检测哺乳动物细胞经受试物处理后产生微核情况，以评价受试物致突变性的方法。微核可来源于无着丝粒的染色体片段，或在细胞有丝分裂后期不能迁往细胞两极的整条染色体。

本方法可用于检测在细胞暴露于受试物期间或暴露后，受试物对经历过有丝分裂的细胞诱发染色体断裂和部分非整倍体作用的活性。

本指导原则适用于兽用化学药物、兽用中药和兽用天然药物。消毒剂参考使用。

二、基本原则

兽药体外哺乳动物细胞微核试验执行《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。

兽药体外哺乳动物细胞微核试验的设计，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、药理毒理研究信息、适应证、靶动物特点、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、试验设计

（一）细胞

可选用中国仓鼠肺（V79或CHL）细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、TK6人淋巴母细胞等进行试验。一般情况下，推荐使用CHL细胞。所用细胞应在生长性能、染色体数目和核型、微核自发频率等方面基本保持稳定，细胞周期时间应与公开发表的细胞特征一致。细胞系需定期检查核型和染色体数目、有无支原体污染等。

（二）受试物

兽用化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

兽用中药、兽用天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

（三）试验分组

试验应同时设置受试物组、阳性对照组和阴性对照组（溶剂对照和/或空白对照）。

各组均应分别在代谢活化系统存在和不存在平行条件下测试。

1. 受试物组

至少应包含3个可用于结果分析的浓度。每一浓度一般平行2皿；若能获得足够细胞数，或超过3个检测浓度时，可用单皿。

最高浓度主要取决于受试物的细胞毒性及其溶解度：

（1）对于可溶性的无细胞毒性的受试物，推荐的最高浓度一般为10mM，2mg/ml或2μl/ml（选用较低者）。

（2）对于可溶性的有细胞毒性的受试物，应根据细胞毒性大小确定最高浓度。无细胞松弛素B（CytoB）时可通过相对群体倍增数（Relative population doubling, RPD）或相对细胞增长数（Relative increase in cell count, RICC）的降低来反映细胞毒性，有CytoB时可通过分裂阻滞增殖指数（Cytokinesis-block proliferation index, CBPI）或复制指数（Replication index, RI）来反映细胞毒性。最高浓度所产生的细胞毒性应为50%~60%。细胞毒性评价公式参见附录（一）。

（3）对于难溶性的受试物，若无细胞毒性，一般采用最小沉淀浓度为最高浓度；若细胞毒性出现在最小沉淀浓度以上，一般建议只检测1个沉淀浓度，因为沉淀可能产生干扰。

对最高浓度之下的其他浓度，对于细胞毒性小或无细胞毒性的受试物，一般浓度间距为2~3倍；对于有细胞毒性的受试物，所选择的浓度应覆盖产生细胞毒性的范围，并且包括具有中度或少/无细胞毒性的浓度；在一些情况下，如受试物具有较陡峭的浓度反应关系，则可适当缩小浓度间距或将检测的浓度增加至3个以上。

2. 阳性对照组

采用已知的阳性诱变剂替代受试物，其他处理和受试物组相同。

阳性诱变剂包括染色体断裂剂和非整倍体诱导剂。加S9时，断裂剂可以选用环磷酰胺和苯并（a）芘；不加S9时，断裂剂可以选用阿糖胞苷、丝裂霉素C、甲磺酸甲酯和4-硝基喹啉-N-氧化物。非整倍体诱导剂只用于不加S9时，可以选用秋水仙素和长春碱。

如果短期处理在S9存在和不存在两种条件下都选用断裂剂作为阳性对照，那么长期处理应该选用非整倍体诱导剂作为阳性对照。

阳性对照物的浓度应预期产生超过本底值的、可重复的微核率升高。

3. 溶剂对照组

仅含和受试物组相同的溶剂，不含受试物，其他处理和受试物组相同。

4. 空白对照组

如果现有资料不能证实溶剂不具有致突变性，还应设空白对照。

（四）代谢活化系统

常用的代谢活化系统是经酶诱导剂（如Aroclor 1254或苯巴比妥和 β -萘黄酮联合）诱导处理后的大鼠肝脏微粒体酶S9混合液，但也可使用其他系统。如果选择其他代谢活化系统，应提供科学依据以证明该选择合理。

S9在试验介质中的终浓度一般为1%~10%（v/v）。

（五）细胞处理及收获时间

短期处理：在代谢或非代谢活化条件下，受试物和细胞作用3~6h，加或不加CytoB在1.5~2.0个正常细胞周期时收获细胞。

长期处理：在非代谢活化条件下，加或不加CytoB受试物和细胞还应持续作用至1.5~2.0个正常细胞周期时收获细胞。

对于某些受试物，与细胞接触时间/收获细胞时间可能要大于1.5个正常细胞周期。

（六）观察指标

应观察记录各浓度组细胞毒性大小和沉淀情况，应分别至少观察500个细胞来评价细胞毒性，加CytoB时通过CBPI或RI，不加CytoB时通过RICC或RPD。

任一处理条件下各组应至少观察2000个双核细胞（加CytoB）或单核细胞（不加CytoB），分析微核率（即含微核细胞率，一个细胞中出现两个或多个微核时仍按一个含微核细胞计数），当采用平行2皿时，观察的细胞应均一分配。对不规则的双核细胞（如两个核大小相差悬殊）和多于两个核的细胞不进行分析，也不要将分散不好的多核细胞误认为是双核细胞。微核判断标准参见附录（二）。也可采用已经过充分验证的自动化分析系统（如激光扫描细胞计数仪、图像分析系统等）对微核进行检测。

（七）结果分析及评价

结果中应描述各浓度组细胞毒性大小和沉淀情况。主要评价指标为微核率。可用 χ^2 检验或其他适当的统计学方法对所得试验数据进行统计学分析。

试验数据按不同处理条件、不同组别列表提供，包括细胞毒性大小和沉淀情况；观察的细胞数、含微核细胞数及微核率等。同时，提供本实验室历史性的阴性对照和阳性对照资料，包括范围、均值、标准差、95%置信区间和样品数等。

在细胞毒性符合要求，阴性、阳性对照数据处于本实验室历史对照背景范围内，且阳性对照较阴性对照微核率显著升高前提下，若同时满足以下情况可判定为阳性结果，若均不满足则判定为阴性结果：

1. 与阴性对照相比，受试物在任一处理条件下至少一个浓度组微核率显著升高；
2. 升高在至少一种处理条件下具有浓度依赖性；

3. 任一受试物组微核率超出历史阴性对照数据的分布范围。

结果判定时应首先考虑试验结果的生物学意义，统计学分析有助于结果的评价。

该试验出现阳性结果应考虑阳性结果是否归因于体内不存在的条件（如pH值、渗透压、沉淀物）、是否仅发生于产生最高细胞毒性的浓度（如阳性结果发生于细胞生长抑制 $\geq 50\%$ 时）。

明显的阳性或阴性结果通常不需要重复试验。如果结果不是明显的阳性或阴性，需要分析更多的细胞（当可行时），或改变试验条件进行重复试验（如改变试验浓度间距、改变代谢活化条件等）。

四、试验报告

按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

五、附录

（一）细胞毒性评价公式

1. 无细胞松弛素B（CytoB）时可通过相对群体倍增数（Relative population doubling, RPD）、相对细胞增长数（Relative increase in cell count, RICC）的降低来反映细胞毒性。

（1）细胞毒性（%）=100%-RPD

式中：

$$RPD = \frac{\text{受试物组细胞倍增数}}{\text{溶剂对照组细胞倍增数}} \times 100\%$$

倍增数=lg（试验后细胞数/试验前细胞数）/lg2

（2）细胞毒性（%）=100%-RICC

式中：

$$RICC = \frac{\text{受试物组试验后细胞数} - \text{受试物组试验前细胞数}}{\text{溶剂对照组试验后细胞数} - \text{溶剂对照组试验前细胞数}} \times 100\%$$

2. 使用 CytoB 时可通过分裂阻滞增殖指数（Cytokinesis-block proliferation index, CBPI）、复制指数（Replication index, RI）来反映细胞毒性。

（1）细胞毒性（%）=100%-[（CBPI_T-1）/（CBPI_C-1）]×100%

式中：

T—受试物组

C—溶剂对照组

$$CBPI = \frac{\text{单核细胞数} + 2 \times \text{双核细胞数} + 3 \times \text{多核细胞数}}{\text{细胞总数}}$$

（2）细胞毒性（%）=100%-RI

式中：

$$RI = \frac{(\text{受试物组双核细胞数} + 2 \times \text{受试物组多核细胞数}) / \text{受试物组细胞总数}}{(\text{溶剂对照组双核细胞数} + 2 \times \text{溶剂对照组多核细胞数}) / \text{溶剂对照组细胞总数}} \times 100\%$$

（二）微核的判断标准

微核一般为圆形或椭圆形；直径不超过主核的1/3；与主核在一个焦点平面上，与主核的颜色、结构特征及折光性一致；与主核之间没有核物质相连，可以和主核有边界的重叠，但能看清各自的核膜。

（三）历史对照数据库的建立

实验室应建立历史对照数据库，包括结果范围和分布，并应采用质量控制方法确定对照数据处于受控状态，如C-图或X-bar图等控制图表。对试验方案的任何更改，都应评估其是否会影响试验数据与实验室现有历史对照数据的一致性。任何重大不一致都将导致需要建立新的历史对照数据库。

首次建立历史阴性对照数据分布时，阴性对照数据应与已公开发表的对照数据（若有）一致。随着更多试验数据的纳入，阴性对照数据理想情况下应在历史阴性对照数据库分布的95%置信区间内，但对于在95%置信区间外的阴性对照数据，如果不是极端异常值，并且有证据表明试验系统处于受控状态，无技术或人为差错，仍可将其纳入历史对照数据库。

六、术语

微核（Micronucleus）：细胞有丝分裂后期，染色体有规律地进入子细胞形成细胞核时，仍留在细胞质中的整条染色单体或染色体的无着丝断片或环。在末期单独形成一个或几个规则的次核，被包含在细胞的胞质内而形成。

着丝粒（Centromere/kinetochore）：在细胞分裂期染色体与纺锤体纤维连接的区域，以使子染色体有序移动到子细胞两极。

非整倍体（Aneuploidy）：二倍体染色体组中缺少或额外增加一条或若干条完整的染色体的变异类型。

染色体断裂（Chromosome breakage）：染色体臂出现长度大于染色体臂宽度的裂隙。

S9：采用经酶诱导剂（如 Aroclor 1254 或苯巴比妥和β-萘黄酮联合）诱导的大鼠制备肝匀浆，在 9000g 下离心 10min 后的肝匀浆上清液。

七、参考文献

1. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物遗传毒性研究技术指导原则，2018.
2. OECD TG487. *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test, 2023.
3. 国家药品监督管理局. 体外哺乳动物细胞微核试验，2021.
4. 国家卫生健康委员会，国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 体外哺乳类细胞微核试验: GB 15193.28—2020，2020.
5. VICH GL23（R2）. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Genotoxicity Testing, 2025.

附件 11

兽药遗传毒性试验追加研究技术指导原则

一、概述

遗传毒性研究（Genotoxicity study）是兽药非临床毒理学评价的重要内容，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等选择合理的试验方法，设计适宜的试验方案。在评价受试物的潜在遗传毒性时，应考虑到体内和体外试验方法的内在价值及其局限性，并结合受试物的药学特点、药效学、药代动力学和其他毒理学研究结果等信息对试验结果进行综合分析与评价，其他可用信息（如已发表的文献报道）也可作为证据权重分析的一部分。

本指导原则重点阐述对遗传毒性试验结果的追加研究策略。

本指导原则适用于兽用化学药物、兽用中药和兽用天然药物。消毒剂参考使用。

二、追加研究策略

（一）对体外试验结果的追加

1. 对细菌回复突变试验（Ames 试验）阳性结果的追加

一些特殊情况下，Ames 试验阳性结果并不代表受试物具有遗传毒性潜力，例如当发生细菌特异性代谢时（如通过细菌硝基还原酶活化）。如果 Ames 试验为明显的阳性结果，则需进行必要的追加试验，直至进行附加的体内试验（包括致癌性试验），以评价体内致突变性和潜在致癌性，除非能通过恰当的获益—风险分析证明合理。

2. 对体外哺乳动物细胞试验阳性结果的追加

以下讨论基于 Ames 试验结果为阴性。

2.1 追加机制/体内试验

当体外哺乳动物细胞试验结果呈阳性，且缺乏充分证据排除其生物学相关性时，建议进行追加试验以提供进一步评价证据，追加试验策略可包括附加的体外试验或体内试验，具体如下：

附加的体外试验可为缺乏生物学相关性的阳性结果提供机制层面的信息，例如，证明小鼠淋巴瘤细胞试验中诱导染色体畸变或突变的受试物并非 DNA 损伤性物质；证明该阳性反应在体内可能不相关或可能具有阈值的间接作用机制（如抑制 DNA 合成、仅在高浓度时产生活性氧簇等）。对于体外微核试验呈阳性的情况，还可补充提示染色体丢失或非整倍体已知机制的试验，或开展着丝点染色试验以评估染色体丢失的可能性。若基于所获得的机制信息及证据权重分析，支持受试物不存在具有生物学相关性的遗传毒性，通常仅需开展一项具有充分暴露证据的体内细胞遗传学试验，以确证受试物不具有遗传毒性作用。若追加研究的目的在于进一步评估染色体丢失的可能性，则应当开展体内微核试验。

若缺乏充分的证据或机制信息以排除潜在的具有生物学相关性的遗传毒性，通常应当开展两项体内试验。该两项试验应采用不同的靶组织，且均需提供充分的暴露证据。

对于终点指标科学合理、且已证明具有充分暴露的体内试验，若其结果为阴性，可作为受试物不具有遗传毒性风险的充分评价依据。

2.2 对依赖于S9的体外试验阳性结果的追加

当阳性结果只出现在S9代谢活化系统存在的情况下，首先应确认是否为代谢活化的原因，而非其他不同条件（如血清浓度），追加试验的目的是确定体外结果与体内条件的相关性，通常进行肝脏的体内试验。

3. 对体外试验阴性结果的追加

对于体外试验阴性结果，在一些特殊情况下，如受试物的化学结构或已知代谢特征提示体外代谢活化方法（如啮齿类动物肝脏S9）可能不适合；受试物的化学结构或已知活性提示其他试验方法或系统可能更合适，需考虑进一步试验，如优化体外代谢活化系统。

（二）对体内试验结果的追加

体内试验结果意义与受试物在靶组织中是否有足够的暴露直接相关。如果体内试验结果与体外的不一致，应结合具体情况对结果差异进行分析，如考虑代谢差异。若体外试验为明显的阳性结果，而使用骨髓进行的体内试验为明显的阴性结果，则有必要使用骨髓以外的靶组织进行另一种体内试验，以确认该受试物是否具有遗传毒性。

此外，评价遗传毒性数据时应考虑所有毒理学和血液学结果，毒理改变引发的间接效应通常存在安全区间，可能不具有临床意义。

若体内微核试验显示微核率升高，应评估所有毒理学数据，以确定是否由非遗传毒性作用所致或非遗传毒性作用是否为其中的一个作用因素。如果怀疑存在干扰红细胞生成或其生理学的非特异性因素（如体温偏低或过高），体内染色体畸变试验可能更为合适。如果怀疑微核率升高的结果，应研究证明该升高是否由染色体丢失或染色体断裂所导致。有证据表明非整倍体诱导作用，如纺锤体抑制剂，具有非线性剂量反应关系，因此，可据此确定暴露阈值，对比临床暴露水平，评估安全范围是否充足。

（三）与致癌性试验中肿瘤发现有关的追加

遗传毒性试验组合检测的主要是以直接遗传损伤为作用机制的致癌物，并不适用于非遗传毒性致癌剂。若受试物在标准遗传毒性试验组合中结果为阴性，但致癌性试验显示肿瘤发生率升高，且尚无充分证据明确其为非遗传毒性作用机制，需选用适宜试验模型开展附加遗传毒性试验，可调整体外试验的代谢活化条件，也可开展针对肿瘤诱发靶器官遗传损伤的体内试验，包括彗星试验、碱洗脱试验等DNA链断裂检测、³²P-后标记法等DNA加合物检测、转基因突变诱导试验，以及肿瘤相关基因遗传学改变的分子特征分析等。

三、术语

S9：采用经酶诱导剂（如 Aroclor 1254 或苯巴比妥和β-萘黄酮联合）诱导的大鼠制备肝匀浆，在 9000g 下离心 10min 后的肝匀浆上清液。

非整倍体（Aneuploidy）：二倍体染色体组中缺少或额外增加一条或若干条完整的染色体的变异类型。

染色体断裂（Chromosome breakage）：染色体臂出现长度大于染色体臂宽度的裂隙。

四、参考文献

1. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物遗传毒性研究技术指导原则，2018.
2. VICH GL23（R2）. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Genotoxicity Testing，2025.

附件 12

兽药致畸试验指导原则

一、概述

致畸试验，是通过观察受试物对母体子宫内的胚胎或胎仔在器官发生期间引起子代永久性结构异常的有害作用，以评价受试物的胚胎毒性。

母体在孕期受到可通过胎盘屏障的某种有害物质作用，影响胚胎的器官分化与发育，导致结构异常，出现胎仔畸形。因此，在受孕动物胚胎的器官形成期给予受试物，可检出受试物对胎仔的致畸作用。检测妊娠动物接触受试物后引起的致畸可能性，预测其对靶动物/人可能的致畸性。

本指导原则适用于兽用化学药物和兽用天然药物。兽用中药和消毒剂参考使用。

二、基本原则

致畸试验执行《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。

致畸试验的设计，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、适应证和适用靶动物特点、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、试验方法

（一）受试物

兽用化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

兽用中药、兽用天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

如果由于给药容量或给药方法限制，化学药物可使用原料药，中药可使用浸膏或提取物进行试验。试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

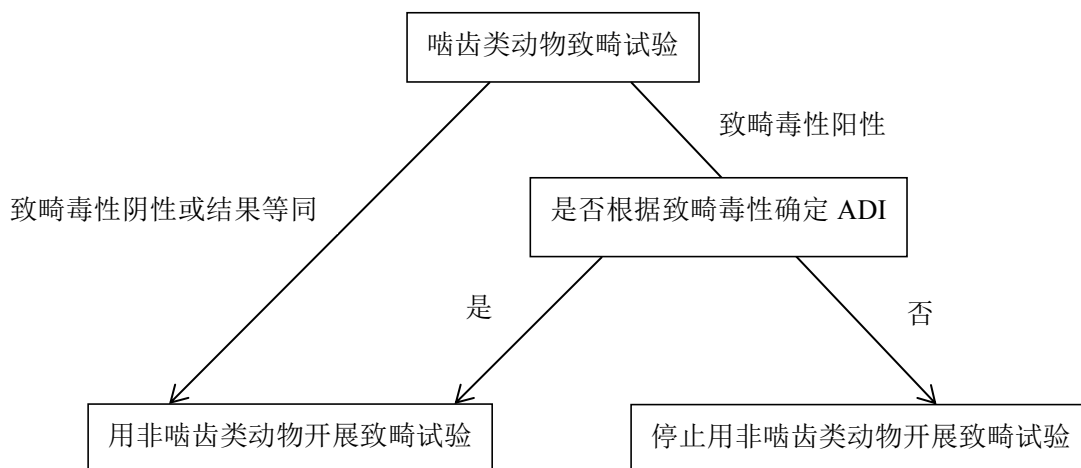
（二）实验动物

1. 种、系选择

实验动物的选择应符合 GB 14922 和有关规定。啮齿类首选大鼠，非啮齿类首选家兔。若选用其他物种应提供理由。选用健康、性成熟的雄性动物和未经交配的雌性动物，试验开始时动物同性别体重的差异不应超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。所用动物应注明种类、品系、性别、体重和周龄。

对拟用于非食品动物的受试物，如啮齿类动物观察到明显的致畸现象，可不再开展非啮齿类动物的致畸试验。对拟用于食品动物的受试物，一般需开展一种啮齿类动物和一种非啮齿类动物的致畸试验。

具体可根据 VICH GL32 *Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Developmental Toxicity Testing* 发育毒性试验指导原则中啮齿类动物的致畸结果按决策树进行评价。决策树从啮齿类动物的致畸试验开始，如果观察到明显的致畸毒性，且受试物需根据致畸试验来确定日允许摄入量（Acceptable daily intake, ADI），应继续开展非啮齿类动物的致畸试验来观察是否会出现更为敏感的发育毒性，否则不需要开展非啮齿类动物的致畸试验。如果啮齿类动物的致畸试验阴性或结果等同，则需要开展非啮齿类动物的致畸试验。如果没有进行啮齿类动物致畸试验，即使在啮齿类动物上观察到其他发育毒性（如胎仔毒性或胚胎致死），仍需要开展非啮齿类动物的致畸试验。



2. 动物性别和数量

性成熟雄性和雌性动物通常按 1:1 或 1:2 比例合笼交配，如果 5 日内未交配，应更换雄鼠。为了获得足够的胎仔来评价其致畸作用，大鼠每个剂量水平的怀孕动物数不少于 16 只，家兔每个剂量水平怀孕动物数不少于 12 只。

3. 动物准备

试验前，动物应在实验动物房进行检疫观察和至少 5 日环境适应。

4. 动物饲养

饲养条件应符合现行国家标准要求。试验期间动物自由饮水和摄食，妊娠大鼠最好单笼饲养，也可少量成组饲养；妊娠家兔应单笼饲养。

（三）剂量及分组

试验一般设三个剂量组，同时设溶剂对照组，溶剂对照组除不给受试物外，其余处理均同剂量组。必要时设阳性对照组，常用经口给予的阳性对照物为五氯酚钠、阿司匹林、维生素 A 和环磷酰胺等。曾用阳性对照物开展过致畸试验、并在所用实验动物种系有阳性结果发现，试验可略去设置阳性对照组。

高剂量组原则上应使部分动物出现某些发育毒性和（或）母体毒性，如体重轻度减轻等，但不引起死亡或严重疾病，如果母体动物有死亡发生，应不超过母体动物数量的 10%。低剂量组不应出现任何观察到的母体毒性或发育毒性作用。建议递减剂量系列的组间距 2~4 倍比较合适。当组间差距较大时（如超过 10 倍）加设一个试验组。

试验剂量的设计参考单次给药毒性试验剂量、28 天经口毒性试验、90 天经口毒性试验剂量和靶动物实际摄入量进行。对于能求出 LD₅₀ 的受试物，根据 LD₅₀ 和剂量—反应关系曲线斜率设计高剂量组的剂量。对于求不出 LD₅₀ 的受试物，如果 28 天或 90 天经口毒性试验未观察到有害作用，以未观察到有害作用剂量（No observed adverse effect level, NOAEL）作为高剂量组；如果 28 天或 90 天经口毒性试验观察到有害作用，以最小观察到有害作用剂量（Lowest observed effect level, LOAEL）为高剂量组，以下设 2 个剂量组。设置剂量水平时还应参考受试物的其他毒理学资料。

（四）试验步骤

1. 受孕动物检查

对于大鼠，雌、雄动物同笼后，每日早晨对雌鼠检查阴栓或进行阴道涂片检查是否有精子，查出阴栓或精子，认为雌鼠已交配，当日作为“受孕”零日。对于家兔，雌兔和雄兔合笼后阴道涂片检查到精子当日作为“受孕”零日。将检出的“受孕动物”随机分到各组，并称重和编号。

2. 受试物给予

受试物通常经口灌胃给予，若选用其他途径应说明理由。通常，在器官形成期给予受试物（大鼠受孕的第 6~15 日，兔受孕的第 6~18 日）。受试物灌胃给予时，要将受试物溶解或悬浮于合适的溶剂中，首选溶剂为水、不溶于水的受试物亦可使用植物油（如橄榄油、玉米油等），不溶于水或油的受试物可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液或糊状物等。受试物应新鲜配制，有资料表明其溶液或混悬液储存稳定者除外。应每日在同一时间灌胃 1 次，根据母体体重调整灌胃体积。灌胃体积一般为 10ml/kg 体重，如为水溶液时，最大灌胃体积可达 20ml/kg 体重；如为油性液体，灌胃体积应不超过 4ml/kg 体重；各组灌胃体积一致。

3. 母体观察

每日对动物进行临床观察，包括皮肤、被毛、眼睛、黏膜、呼吸、神经行为、四肢活动等情况，及时记录各种中毒体征，包括发生时间、表现程度和持续时间，发现虚弱或濒死的动物应进行隔离或处死，母体有流产或早产征兆时应及时剖检。

在受孕第 0 日、给予受试物第 1 日、给予受试物期间每 3 日及处死当日称母体体重，并定期测定摄食量。若通过饮水途径给予受试物，还应记录饮水量。

4. 受孕母体处死和检查

(1) 一般检查

于分娩前 1 日（一般大鼠为受孕第 20 日、家兔为受孕第 28 日）处死母体，剖腹检查亲代受孕情况和胎体发育。迅速取出子宫，称子宫连胎重，以得出妊娠动物的净重量。记录黄体数、早死胎数、晚死胎数、吸收胎数、活胎数及着床数。

处死时对所有妊娠动物进行尸体解剖和肉眼检查，保存肉眼发现有改变的脏器，以便于进行组织学检查，同时保存足够对照组的相应脏器以供比较。

(2) 胎仔外观检查

逐一记录胎仔性别、体重、体长。检查胎仔外观有无异常。外观检查至少包括表 1 的项目。

表 1 致畸试验胎仔外观检查项目

部位	头部	躯干部	四肢
检查项目	无脑	胸骨裂	多肢
	脑膨出	胸部裂	无肢
	顶骨裂	脊椎裂	短肢
	脑积水	腹裂	半肢
	小头症	脊椎侧弯	多趾
	颜面裂	脊椎后弯	无趾
	小眼症	脐疝	并趾
	眼球突出	尿道下裂	短趾
	无耳症	无肛门	缺趾
	小耳症	短尾、卷尾	
	耳低位	无尾	
	无顎症		
	小顎症		
	下顎裂		
	口唇裂		

(3) 胎骨标本制作与检查

以下所述骨骼标本制作方法仅供参考。

骨骼标本制作方法一：将每窝 1/2 的活胎放入 95%乙醇溶液中固定 2~3 周，取出胎仔流水冲洗数分钟后，放入 10~20g/L 氢氧化钾溶液内（至少 5 倍于胎仔体积）8~72 小时，透明后放入茜素红应用液（50%乙酸溶液为溶剂的茜素红饱和液 5ml、甘油 10ml、1%水合氯醛溶液 60ml 混合；取混合溶液 3~5ml，用 10~20g/L 氢氧化钾溶液稀释至 1000ml）中染色 6~48 小时，并轻摇 1~2 次/日，至头骨染红为宜。再放入透明液 A（甘油 200ml、氢氧化钾 10g、蒸馏水 790ml 混合）中 1~2 日，放入透明液 B（甘油和蒸馏水等体积混合）中 2~3 日，待骨骼染红而软组织基本褪色。

骨骼标本制作方法二：将胎仔去皮、去内脏及脂肪后，放入茜素红溶液（茜素红 0.1g、氢氧化钾 10g、蒸馏水 1000ml 混合，临用时配制）染色，当日摇动玻璃瓶 2~3 次，待骨骼染成红色时为止。将胎仔换入透明液 A 中 1~2 日，换入透明液 B 中 2~3 日，待胎仔骨骼已染红，而软组织的紫红色基本褪去，可换置甘油中。

胎仔骨骼检查：将骨骼标本放入小平皿中，用透射光源，在体视显微镜下作整体观察，然后逐步检查骨骼。测量头顶间骨及后头骨缺损情况，然后检查胸骨的数目、缺失或融合（胸骨骨化中心为 5 个，剑突 1 块；骨化不完全时首先缺第 5 胸骨、次缺第 2 胸骨），肋骨通常为 12~13 对，常见畸形有融合肋、分叉肋、波状肋、短肋、多肋（常见 14 肋）、缺肋、肋骨中断。脊柱发育和椎体数目（颈椎 7 个，胸椎 12~13 个，腰椎 5~6 个，骶椎 4 个，尾椎 3~5 个），有无融合、纵裂等。最后检查四肢骨。

胎仔的骨骼检查项目见表 2。

表 2 致畸试验胎仔骨骼检查项目

部位	检查项目
枕骨	骨化中心缺失
脊柱骨	数目、形状异常、融合、纵裂、部分裂开、骨化中心缺失、缩窄、脱离
骨盆	骨化中心缺失、形状异常、融合、裂开、缩窄、脱离
四肢骨	数目、形状异常
腕骨	骨化中心缺失
掌骨	形状异常
趾骨	形状异常
肋骨	数目、形状异常、融合、分叉、缺损
胸骨	数目、融合、骨化中心缺失

（4）胎仔内脏检查

对于大鼠，每窝的 1/2 活胎鼠放入 Bouins 液（2,4,6-三硝基酚饱和液 75 份、40%甲醛溶液 20 份、冰乙酸 5 份混合）中固定两周，作内脏检查。先用自来水冲去固定液，将鼠仰放在石蜡板上，剪去四肢和尾，用刀片在头部横切或纵切共 5 刀，再剖开胸腔和腹腔。按不同部位的断面观察器官的大小、形状和相对位置。正常切面见图：

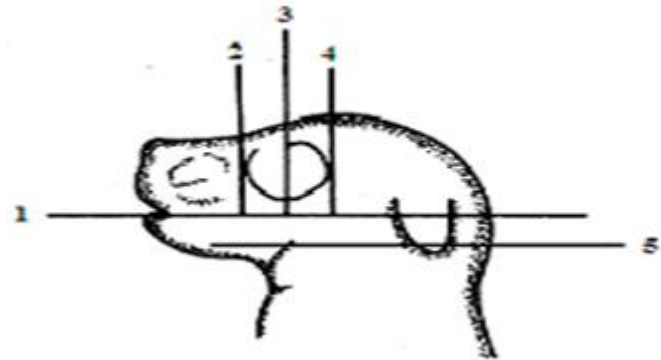


图 胎鼠头部示意图

经口从舌与两口角向枕部横切（切面①），可观察大脑、间脑、小脑、舌及顎裂。在眼前面作垂直纵切（切面②）、可观察鼻部。从头部垂直通过眼球中央作纵切（切面③），可观察眼部。沿头部最大横位处穿过脑作切面（切面④），可观察脑室部，切面①～④分别观察舌裂、双叉舌、顎裂，眼球、鼻畸形、脑和脑室异常。沿下顎水平通过颈部中部作横切（切面⑤），可观察气管、食管和延脑或脊髓。

以后自腹中线剪开胸、腹腔，依次检查心、肺、横膈膜、肝、胃、肠等脏器的大小、位置，检查完毕将其摘除，再检查肾脏、输尿管、膀胱、子宫或睾丸位置及发育情况。然后将肾脏切开，观察有无肾盂积水与扩大。必要时还需对心脏内部结构进行检查。致畸试验胎仔内脏检查至少包括表 3 中的项目。

表 3 致畸试验胎仔内脏检查项目

部位	头部（脊髓）	胸部	腹部
检查项目	嗅球发育不全	右位心	肝分叶异常
	侧脑室扩张	房中隔缺损	肾上腺缺失
	第三脑室扩张	室间隔缺损	多囊肾
	无脑症	主动脉弓	马蹄肾
	无眼球症	食道闭锁	肾积水
	小眼球症	气管狭窄	肾缺失
	角膜缺损	无肺症	膀胱缺失
	单眼球	多肺症	睾丸缺失
		肺叶融合	卵巢缺失
		膈疝	卵巢异位
		气管食管瘘	子宫缺失
		内脏异位	子宫发育不全
			输卵管积水

对非啮齿类动物，如家兔，应对所有的胎仔均进行骨骼和内脏的检查，其检查程序参照大鼠进行。

四、数据处理

整理每只动物的资料并将试验结果列表，包括试验开始时体重、各试验组动物数，子代动物数、试验过程中死亡或人为处死的动物数、受孕动物数、临床中毒表现和出现中毒体征的动物数。胎仔的观察结果，包括畸形类型及其他相关信息。

用合适的统计方法对下述指标进行统计分析：母体体重、体重增重（处死时母体体重—受孕 6 日体重）、子宫连胎重、体重净增重（处死时母体体重—子宫连胎重—受孕 6 日体重）、着床数、黄体数、吸收胎数、活胎数、死胎数及百分率、胎仔的体重及体长、有畸形的胎仔数（包括外观、骨骼和内脏畸形），有畸形胎仔的窝数及百分率，计算动物总畸胎率和某单项畸胎率。对胎仔的相关指标统计应以窝为单位。

$$\text{每组动物总畸胎率}(\%) = \frac{\text{出现畸形的活胎总数}}{\text{该组检查的活胎总数}} \times 100\%$$

注：凡每一活胎出现一种以上畸形时，均做一个畸胎计。

当出现的畸胎是以某一种或某几种畸形为主时，应按畸形种类单独计算该畸胎率。

$$\text{每组动物某单项畸胎率}(\%) = \frac{\text{出现某种畸胎总数}}{\text{该组检查的活胎总数}} \times 100\%$$

五、结果分析与评价

以文字描述和表格逐项进行汇总，包括母体体重、妊娠情况、黄体数、着床数、吸收胎数、活胎数、死胎数及百分数。胎仔的情况（体重、体长）、畸胎的类型（外观、骨骼和内脏）、数目及百分率，给出结果的统计处理方法。

根据观察到的效应和产生效应的剂量水平评价是否具有致畸性，及畸形的类型。给出致畸作用、其他发育毒性终点及母体毒性的LOAEL和NOAEL。

致畸试验检验动物受孕期经口重复暴露于受试物产生的子代致畸性和发育毒性。试验结果应该结合重复给药毒性、生殖毒性、毒物动力学及其他试验结果综合解释。由于实验动物和靶动物/人体存在物种差异，故试验结果外推到靶动物/人体存在一定的局限性。

六、试验报告

按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

七、术语

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

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。

八、参考文献

1. 农业部公告第 1247 号. 兽药大鼠传统致畸试验指导原则，2009.
2. 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 致畸试验: GB 15193.14—2015，2015.
3. VICH GL32. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Developmental Toxicity Testing，2002.
4. 卫生部. 化学品毒理学评价程序和试验方法第 21 部分：致畸试验，2011.
5. ICH S5 (R) . Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals，2020.
6. OECD TG414. Prenatal Developmental Toxicity Study，2018.

附件 13

兽药生殖毒性试验指导原则

一、概述

生殖毒性试验是研究受试物对雄性、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妊娠期，也可发生于妊前期和哺乳期。表现为受试物对生殖过程的影响，例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。

凡受试物能引起生殖机能障碍，干扰配子的形成或使生殖细胞受损，其结果除可影响受精卵及其着床而导致不孕外，尚可影响胚胎的发生及发育，如胚胎死亡导致自然流产、胎仔发育迟缓以及胎仔畸形。如果对母体造成不良影响会出现妊娠、分娩和乳汁分泌的异常，亦可出现胎仔出生后发育异常。

本指导原则适用于兽用化学药物和兽用天然药物。兽用中药和消毒剂参考使用。

二、基本原则

生殖毒性试验执行《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。

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、适应证和适用靶动物特点、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、试验方法

（一）受试物

兽用化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

兽用天然药物、兽用中药：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

如果由于给药容量或给药方法限制，化学药物可使用原料药，中药可使用浸膏或提取物进行试验。试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

（二）实验动物

实验动物的选择应符合 GB 14922 和有关规定。首选大鼠，选用 7~9 周龄，试验开始时动物同性别体重差异不超过平均体重的 20%。试验前动物在实验动物房应检疫观察和至少进行 5 日环境适应。每组应有足够的雌鼠和雄鼠配对，产生约 20 只受孕雌鼠。为此，一般在试验开始时两种性别每组各需要亲代（F₀代）大鼠 30 只；在继续试验中用来交配的各代大鼠〔子一代（F₁代）、子二代（F₂代）以及子三代（F₃代）〕每种性别每组需要 25 只（至少每窝雌雄各取 1 只，最多每窝雌雄各取 2 只）。选用的 F₀代雌鼠应为非经产、非受孕鼠。

（三）剂量及分组

动物按体重随机分组，试验一般设高、中、低三个剂量的受试物组和一个对照组，应考虑受试物特性（如生物代谢和生物蓄积特性）的影响作用。如果受试物使用溶剂，对照组应给予溶剂的最大使用量。如果受试物引起动物摄食量和利用率下降时，那么对照组动物需要与试验组动物配对饲喂。某些高剂量受试物组设计时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，高剂量组应使F₀代动物出现明显的毒性反应，但不引起动物死亡；中剂量组可引起轻微的毒性反应；低剂量组应不引起亲代及其子代动物的任何毒性反应。

（四）试验步骤

1. 给药方法

（1）试验期间，所有动物应采用相同的方式给予受试物；每日在同一时间段给予，每周7日。受试物应在交配前连续给予两种性别的各代大鼠至少10周，并继续给予受试物至试验结束。其中子代的雌鼠和雄鼠在断乳后每日给予。各代大鼠给予的受试物剂量（按动物体重给予，mg/kg体重或g/kg体重）、饲料和饮水均应相同。

（2）根据受试物的特性或试验目的，选择合适的给予方式。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，则应选择灌胃给予受试物。

（3）受试物掺入饲料或饮水给予，要将其与饲料（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的5%，若超过5%时（最大不应超过10%），可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，掺入量等同高剂量组），使其与剂量组饲料营养素水平保持一致，同时增设未处理对照组；也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也可表示为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100g体重的摄食量折算为受试物饲料浓度（mg/kg饲料）。

（4）受试物灌胃给予，要将其溶解或悬浮于合适的溶剂中，首选溶剂为水，不溶于水的受试物可使用植物油（如橄榄油、玉米油等），不溶于水或油的受试物可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液或糊状物等。受试物应新鲜配制，有资料表明其溶液或混悬液储存稳定性除外。应每日在同一时间灌胃1次，每周称体重2次，根据体重调整灌胃体积。灌胃体积一般为10ml/kg体重，如为水溶液时，最大灌胃体积可达20ml/kg体重；如为油性液体，灌胃体积应不超过4ml/kg体重；各组灌胃体积一致。

2. 交配

每次交配时，每只雌鼠应与从同一受试物组随机选择的单个雄鼠同笼（1：1或2：1交配），直到检测到阴栓或在阴道涂片中检测到精子，或者经过3个发情期或两周。查到阴栓或精子后应将雌、雄鼠分开，如果经过3个发情期或两周还未进行交配，也应将雌雄鼠分开，不再继续同笼。配对同笼的雌雄鼠应作标记。所有雌鼠在交配期应每日检查精子或阴栓，直到证明已交配为止。查到阴栓或精子的当日为受孕零日。预计已受孕的雌鼠应分开放入繁殖笼中，受孕鼠临产时应提供筑巢的垫料。

3. 每窝仔鼠数量的标准化

将每窝仔鼠于出生后第4日调整至相同的数量（每窝8~10只），尽量做到每窝内雌、雄鼠数量相等，也可以窝内雌、雄鼠数量不等，但各窝之间两性的鼠数应分别相同。原窝中多余的鼠应随机抽出，而不应按体重选择。

4. 观察代数

观察代数随受检目的而异，可作一代、二代、三代或多代观察。对拟用于非食品动物的受试物，一般进行一代生殖毒性研究或根据受试物拟定适应证、给药途径、药理毒性相关资料等参照ICH S5（R3）（人用药物生殖与发育毒性检测）进行分段生殖毒性研究。对拟用于食品动物的受试物，一般进行二代生殖毒性研究，如果在二代生殖试验中观察到受试物对子代有明显的生殖、形态或毒性作用，则需要进行三代或多代生殖毒性试验，进一步观察受试物的生殖毒性作用。

5. 一代、二代、三代生殖毒性试验法

（1）一代生殖毒性试验法

一代生殖毒性试验法示意图见图1。

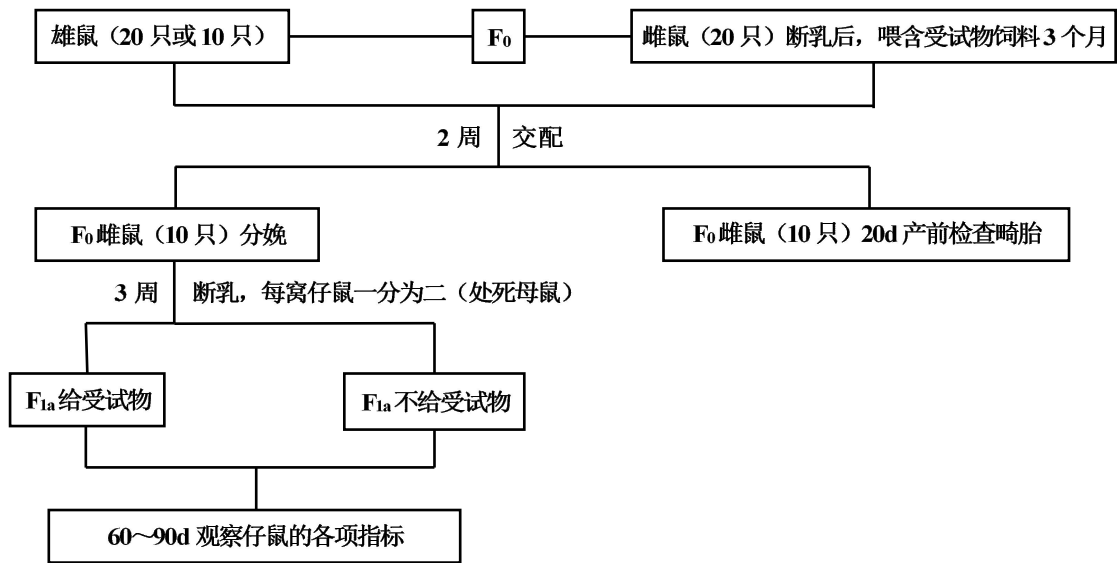


图 1 一代生殖毒性试验法示意图

注：附图中的实验动物数量为满足试验要求的最低数量，下同。

(2) 二代生殖毒性试验法

①二代生殖毒性试验法示意图见图2。

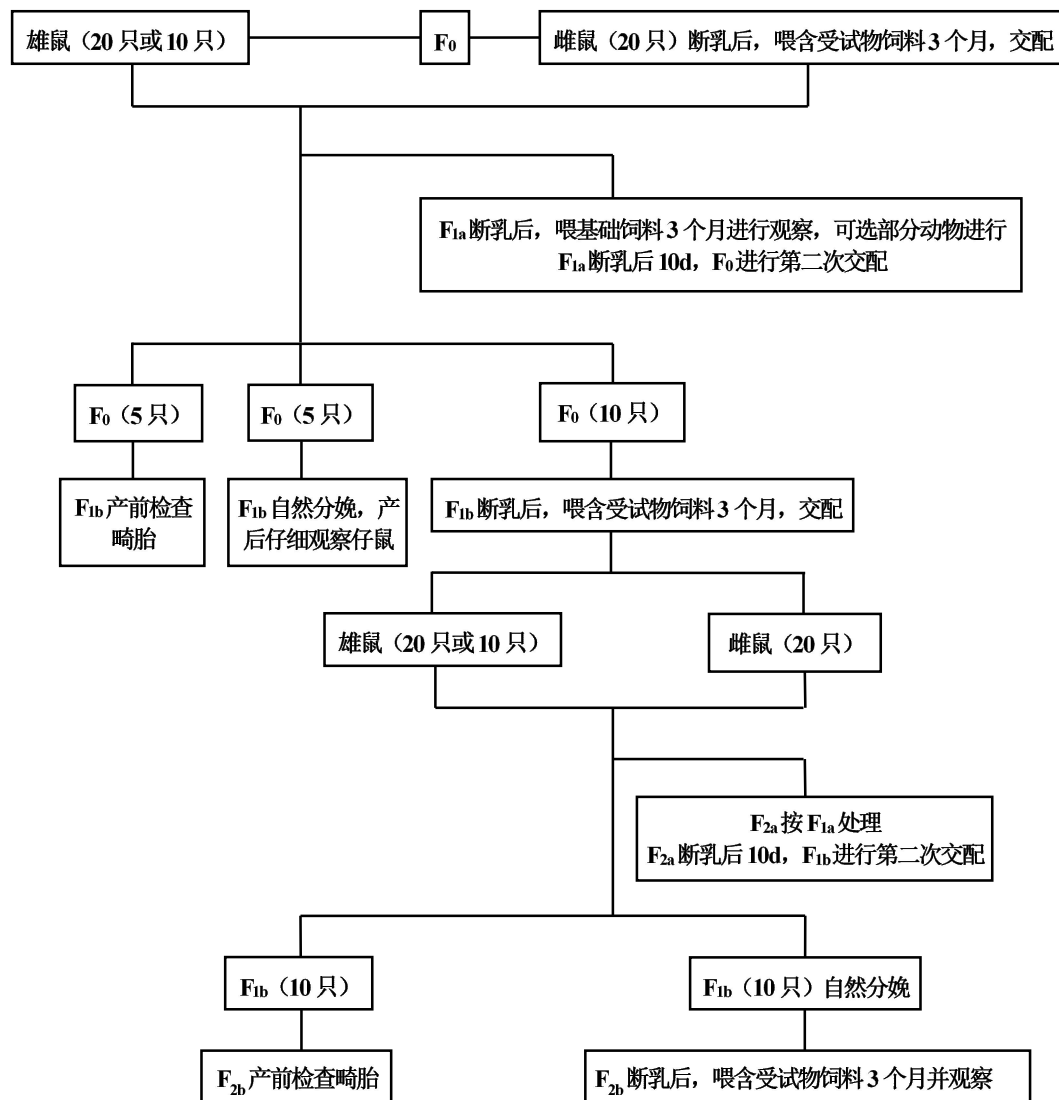


图2 二代生殖毒性试验法示意图

②F₀代断乳后，给予含受试物饲料3个月，雌雄即可交配，所产仔鼠为F_{1a}。F_{1a}断乳后不再给予受试物，观察3个月。

③F_{1a}断乳后10日将F₀再次交配，所产仔鼠为F_{1b}，将20只受孕鼠（F₀）中5只产前2~3日剖腹检查胎鼠有无畸形；另5只自然分娩观察产后仔鼠情况；将10只受孕鼠自然分娩，所产F_{1b}继续繁殖。

④F_{1b}断乳后，给予含受试物饲料3个月，进行交配，所产F_{2a}在断乳后喂不含受试物的饲料，观察3个月。

⑤F_{2a}断乳后10日，将F_{1b}再次交配，产F_{2b}前将F_{1b}受孕鼠分两群，每群10只，同③。

(3) 三代生殖毒性试验法

三代生殖毒性试验法示意图见图3。

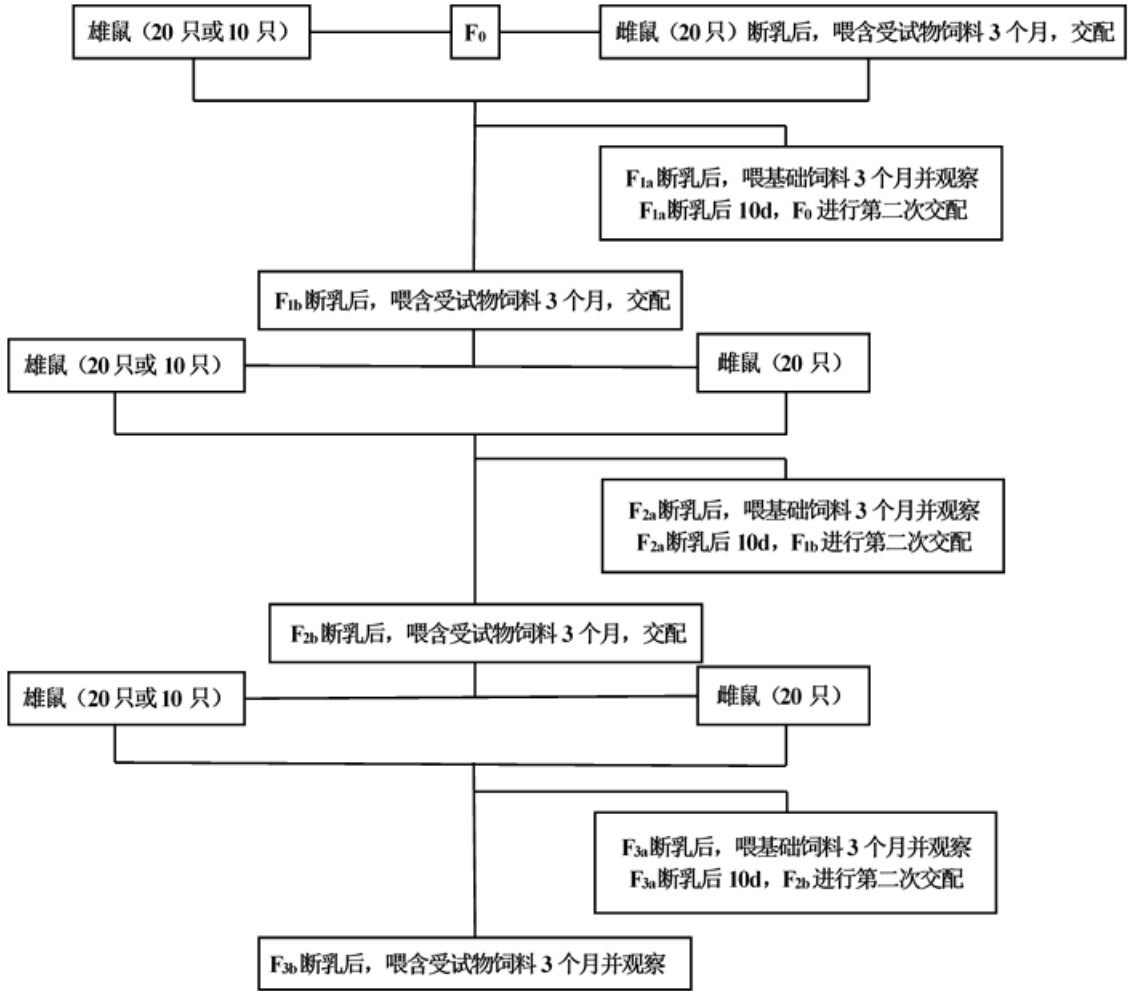


图3 三代生殖毒性试验法示意图

四、观察指标

- (一) 对实验动物做全面的临床检查，记录一般健康状况、受试物的所有毒性和功效作用所产生的症状、相关的行为改变、分娩困难或延迟的迹象、所有的毒性体征及死亡率，通过每日检查亲代（F₀、F₁、F₂，根据繁殖代数确定）动物阴栓和子宫颈，以及雌鼠的发情周期有无异常。
- (二) 亲代（F₀、F₁、F₂，根据繁殖代数确定）动物在给予受试物的第1日称重，以后每周称重2次，母鼠应在受孕的第0、7、14和21日称重，在哺乳期应同时称仔鼠的窝重。
- (三) 在交配前及受孕期，记录每周摄食量，如经饮水给予受试物，还应记录每周饮水量。

（四）试验结束时，根据试验设计，各代雄鼠均应对附睾的精子进行检查，对精子形状、数量以及活动能力进行评价。精子的活动能力和精子形状，可只检查对照组和高剂量组的各代雄鼠，每只动物至少检查200个精子。

（五）在分娩后（哺乳0日）应尽快检查每窝仔鼠的数量、性别、死产数、活产数及肉眼可见的异常，在出生当日死亡的，应尽可能检查其缺陷和死亡原因。记录活产数量、性别、并在出生当日对单个活产仔鼠称重，此后在哺乳期的第4、7、14和21日，阴道开放或龟头包皮分开，以及试验结束时对仔鼠称重。用来进行交配的子代断乳鼠（F₁、F₂，根据繁殖代数确定），观察并记录阴道开放或包皮分开的日龄，观察性成熟情况。

（六）试验结束时所有亲代（F₀、F₁、F₂，根据繁殖代数确定）动物脏器称重：子宫（包括输卵管和子宫颈）、卵巢、睾丸、附睾、脑、肝、肾、脾和已知的靶器官。

（七）试验结束时和试验期间死亡的亲代（F₀、F₁、F₂，根据繁殖代数确定）动物均应作大体解剖和组织病理学检查，观察各种形态结构异常及病理改变，特别注意生殖器官。如果每窝仔鼠的数量足够，子代（F₁、F₂、F₃，根据繁殖代数确定）每窝每种性别至少取3只仔鼠进行同样检查。检查的器官及组织应包括子宫、卵巢、睾丸、附睾以及靶器官脏器。

五、数据处理

（一）繁殖指数

1. 受孕率（%）= $\frac{\text{怀孕动物数}}{\text{交配雌性动物数}} \times 100\%$
2. 妊娠率（%）= $\frac{\text{分娩有活体幼仔的动物数}}{\text{怀孕动物数}} \times 100\%$
3. 出生活仔率（%）= $\frac{\text{出生时活的仔鼠数}}{\text{出生时仔鼠总数}} \times 100\%$
4. 出生存活率（%）= $\frac{\text{产后4日仔鼠存活数}}{\text{出生时活的仔鼠数}} \times 100\%$
5. 哺乳存活率（%）= $\frac{\text{21日断乳时存活的仔鼠数}}{\text{出生4日后存活的仔鼠数}} \times 100\%$
6. 性别比 = $\frac{\text{仔鼠出生后雄鼠数}}{\text{仔鼠出生后雌鼠数}}$

（二）数据处理

应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。数据应进行统计分析，可采用适当的统计方法进行处理。

试验结果至少应包含以下内容：

1. 按性别和剂量组分别记录的毒性反应，包括繁殖、妊娠和发育能力的异常；
2. 试验期动物死亡的时间或实验动物是否生存到试验结束；
3. 每窝仔鼠的体重和仔鼠的平均体重，以及试验后期单只仔鼠的重量；

4. 任何有关繁殖、仔鼠及其生长发育的毒性和其他健康损害效应；
5. 观察到的各种异常症状的出现时间和持续过程；
6. 亲代（F₀）和选作交配的子代动物的体重数据；
7. 病理大体解剖的发现；
8. 病理组织学检查结果的详细描述；
9. 结果的统计处理。

六、结果分析与评价

逐一比较受试物组动物与对照组动物繁殖指数是否有显著性差异，以评定受试物有无生殖毒性，并确定其生殖毒性的未观察到有害作用剂量（No observed adverse effect level, NOAEL）和最小观察到有害作用剂量（Lowest observed effect level, LOAEL）。同时还可根据出现统计学差异的指标（如体重、观察指标、大体解剖和病理组织学检查结果等），进一步估计生殖毒性的作用特点。

生殖毒性试验检验动物经口重复暴露于受试物产生的对雄性和雌性生殖功能的损害及对后代的有害影响，并从剂量一效应和剂量一反应关系的资料，得出LOAEL和NOAEL。试验结果应该结合重复给药毒性试验、致畸试验、毒物动力学及其他试验结果综合解释。由于实验动物和靶动物/人体存在物种差异，故试验结果外推到靶动物/人体存在一定的局限性，但也能初步确定靶动物/人体的允许暴露水平提供有价值的信息。

七、试验报告

按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

八、术语

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

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。

九、参考文献

1. 农业部公告第 1247 号. 兽药繁殖毒性试验指导原则，2009.
2. 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 生殖毒性试验: GB 15193.15—2015，2015.
3. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物生殖毒性研究技术指导原则，2006.
4. VICH GL22 （R）. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Reproduction Testing （Revision 1） ， 2025.
5. ICH S5 （ R3 ） . Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals， 2020.
6. 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 扩展一代生殖毒性试验: GB 15193.29—2020，2021.

附件 14

兽药致癌试验必要性指导原则

一、概述

兽药致癌试验的目的是考察兽药在实验动物体内的潜在致癌作用，从而评价和预测其可能对靶动物造成的危害，以及保障动物源食品中兽药残留对人体的安全。任何体外试验、实验动物毒性试验和靶动物应用中出现的潜在致癌性因素均可提示是否需要进行致癌试验。

确定兽药是否需进行致癌试验的最基本考虑是：与潜在致癌性有关的前期研究（如遗传毒性试验、肿瘤相关的长期全身毒性试验等）结果、化合物结构—活性关系、最长用药期、动物体内暴露量、毒代动力学试验和毒性机理研究的数据等，同时还应考虑实验动物、靶动物和人类之间的代谢差异。

本指导原则的目的在于阐述何种情况下需要进行兽药致癌试验，以避免实验动物资源、人力资源和物力资源的不必要使用。原则上，只有当确实需要通过实验动物长期给药研究评价靶动物体内药物暴露所致的潜在致癌性时，才应进行致癌试验。

本指导原则适用于兽用化学药物。兽用天然药物参考使用。

二、致癌性试验应考虑的因素

（一）潜在致癌因素

如果某些兽药存在潜在致癌的担忧因素，可能需要进行致癌性试验。应慎重评价这些潜在致癌因素，因为这是大多数药物进行致癌性试验最主要理由。应考虑的因素包括：（1）已有证据显示此类药物具有与靶动物或人类相关的潜在致癌性；（2）其构效关系提示有致癌性风险；（3）在重复给药毒性试验中有癌前病变的证据；（4）原形化合物或其代谢产物在组织内的长期滞留导致局部组织反应或其它病理生理变化。

（二）适应证和靶动物种群

用于晚期全身肿瘤的抗肿瘤药物，通常不需要进行致癌试验。当抗肿瘤药物较为有效并能明显延长生命的情况下，后期可能有继发性肿瘤的担忧。当这些药物拟用于非带瘤动物的辅助治疗或非肿瘤适应证长期使用时，通常需要进行致癌试验。

（三）给药途径

动物的给药途径应尽可能与临床拟用途径一致。如果不同给药途径下代谢及系统暴露量相似，可采用其中一种给药途径开展致癌性试验；此种情况下，应充分关注与临床给药途径相关的组织器官中受试物是否得到充分暴露。药代动力学数据可提供受试物是否得到充分暴露的证据。

（四）系统暴露的程度

系统暴露量非常小的局部用药不需要以经口给药途径来评价其对内脏器官的潜在致癌作用；如有潜在光致癌性担忧时，可能需要进行皮肤给药致癌性试验（通常用小鼠）。除非有明显的全身暴露或相关担忧，经眼给予的兽药通常不需要进行致癌性试验。

对于化合物改盐、改酸根或碱基的情况，若已有原化合物致癌性试验数据，应提供其与原化合物比较的药代动力学、药效学或毒性等方面无明显改变的证据。当药物暴露量和毒性发生变化时，需进行桥接研究以确定是否需要进行额外的致癌性试验。对于酯类和复杂衍生物，上述类似数据对考虑是否需进行额外的致癌性试验是有价值的，应根据具体情况具体分析。

（五）内源性肽类、蛋白类物质及其类似物

经化学合成、从动物组织中提取纯化或通过生物技术方法（如重组 DNA 技术）生产的内源性肽类或蛋白质及其类似物，可能需要特殊考虑。

对于替代性治疗的内源性物质（浓度在生理水平），尤其是当同类产品（如动物胰岛素、垂体来源的生长激素和降钙素）已有临床使用经验时，通常不需要进行致癌试验。

若从疗程、临床适应证或患病动物的角度考虑存在担忧因素，且中和抗体的产生并未使重复给药毒性试验的结果失去评价意义，内源性多肽、蛋白质及其类似物在下述情况下可能仍需要进行长期致癌性试验：（1）其生物活性与天然物质明显不同；（2）与天然物质相比显示出修饰后结构发生明显改变；（3）药物的暴露量（AUC）超过了局部或全身暴露的正常水平。

（六）附加试验的必要性

实验动物致癌性试验结果与靶动物的相关性可能存在不确定性，当实验动物致癌性试验出现阳性结果时，可能需要做进一步的机制研究，以评价实验动物出现的肿瘤与靶动物的相关性，有助于确定是否存在对靶动物的潜在致癌作用。

三、参考文献

1. ICH S1A. Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals, 1995.
2. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物致癌性试验必要性指导原则, 2010.

附件 15

兽用化学药物环境毒性评估（第一阶段）指导原则

一、概述

为评估兽用化学药物使用可能带来的环境风险，制定本指导原则。

本指导原则适用于陆生动物用化学药物。

二、一般要求

根据兽药进入环境及其对环境生物的作用特点，将兽药产品环境影响评估过程分为暴露评估和环境影响评估两个阶段。首先，申请人需按照第一阶段决策树（见附图）依次回答问题，并根据第一阶段评估结果决定是否需要进行第二阶段评估并开展相关研究。

一般认为，对于被有限使用且对环境暴露有限的兽药产品，其对环境的影响也有限，原则上只需进行第一阶段评估。当申请人确定兽药产品已满足至少一项第一阶段条件时，可以制定第一阶段的环境暴露评估报告并提交依据；当申请人在完成决策树问题回答后，认为不能满足第一阶段任意一项条件时，则需要进行第二阶段评估。如果缺少某一问题的信息，申请人可忽略该问题并继续回答下一问题。如果在评估中满足多个条件而认定该兽药产品暴露有限，则在第一阶段环境毒性评估报告中应对各条件进行讨论以增加说服力。

三、具体评估内容

（一）兽药产品是否为法规明确可以免于环境毒性评估的兽药类型

如满足此条件，申请人可不继续进行第一阶段评估，但应遵守有关规定，提供相关文件。

（二）兽药产品的主要成分是否为天然物质，并且其使用不会改变该天然物质在环境中的浓度或分布

已经存在于自然环境中的天然物质，或该天然物质进入环境后迅速分解，使得其环境暴露不发生改变。此类天然物质包括电解质、肽类、蛋白质、维生素和其他在自然环境中存在的化合物。如满足此条件，申请人可不继续进行评估，但需提供证据或合理理由，以证明兽药产品的使用不会改变该天然物质在环境中的浓度或分布。

（三）兽药产品是否仅用于非食品动物

一般情况下，非食品动物不集中饲养，通常为个体给药。此类兽药产品使用量小，涉及更少的环境问题。如满足此条件，申请人可不继续进行评估。

（四）兽药产品是否用于少数物种，且其饲养和用药方式与已完成环境毒性评估的常见物种类似

如该兽药产品已批准用于常见物种，且少数物种（如蜂、蚕、鸽子、赛马等）与常见物种的饲养条件相似、给药途径相同、用于少数物种的给药总剂量不超过常见物种时，可认为用于少数物种的兽药产品对环境的影响有限。如满足此条件，申请人可不继续进行评估。

（五）兽药产品是否仅用于动物群体中的少数个体

如果该兽药产品用于治疗动物群体中的少数个体，通常情况下认为其在环境中的暴露量远低于会对环境产生影响的浓度。如满足此条件，申请人可不继续进行评估，如用于治疗奶牛临床型乳腺炎产品、手术用麻醉药、眼用制剂以及用于个体动物辅助生产的激素等。

（六）兽药产品在用药动物体内是否被充分代谢

一般认为兽药产品在动物体内被充分代谢后则不会进入环境，可以通过对代谢物和排泄物进行放射性标记研究予以证明。当对排泄物的分析表明兽药产品通过常见的生化途径已转化为失去原形药物相似结构的代谢物时，或当单一代谢物或原形药物的总放射物排出不超过 5% 时，可认为该兽药产品已被充分代谢。如满足此条件，申请人可不继续进行评估。

（七）兽药产品的废弃物处理程序是否能阻止其进入陆地环境

一些用于集约化畜牧养殖的兽药产品使用后的废弃物可以被焚化处理或者通过其他能阻止其进入环境的方式进行处理，则认为该兽药产品不会对环境造成影响。如满足此条件，申请人可以仅进行第一阶段评估，但应提供相关文件以证明该兽药产品不会进入环境。

（八）动物是否为放牧饲养

对于圈养动物，排泄物以粪污形式收集、储存，然后洒在农田中，用于这类动物的兽药产品可直接进行问题（十）评估。放牧饲养的动物直接将排泄物排入环境中，用于这类动物的兽药产品可直接进行问题（九）评估；然而某些类型的兽药产品直接进入环境时存在特定问题，对于这些兽药产品，需同时进行问题（九）和问题（十）评估。

（九）兽药产品是否为体外和/或体内驱虫药

体内和体外驱虫药具有特殊的环境毒性，尤其是用于放牧饲养动物的驱虫药。这些药物对于与牧场无脊椎动物存在生物学相关性的生物体具有药理活性。由于原生动物在生物学上与牧场无脊椎动物没有生物学相关性，所以用于防治原生动物的产品不在本问题讨论范围内。用于放牧饲养动物的体外或体内驱虫药，应直接进行第二阶段评估，以阐明需要特别关注的问题（如粪便生物群落）。其他用于牧场饲养动物的兽药产品应当进行问题（十）评估。

（十）土壤中兽药产品的预测环境浓度（PEC_{soil}）是否低于 100μg/kg

计算 PEC_{soil} 时，必须先估算该兽药产品在陆地生态系统中的预期浓度。如果有其他方法更加适合需要测定的特定地区，可使用其他方法计算 PEC_{soil}。

采用总残留的概念计算 PEC_{soil}，包括原形药物和靶动物排泄的所有相关代谢物的总和。除非有数据证明排泄值小于 100%，否则均假设药物以 100% 排泄。总残留法是一种保守的评估方法，因为它在计算环境浓度时结合了原形药物和代谢物，而代谢物通常比原形化合物具有更低的生物活性。粪便和土壤降解研究的结果可用于改进土壤中兽药浓度的估算。当 PEC_{soil} 低于 100μg/kg 时，可以仅进行第一阶段评估。

一些用于集约化养殖动物的兽药产品也可用于牧场放牧的动物，但 PEC_{soil} 的计算可能有所不同。然而，即使在牧场环境中，仍然会有一部分兽药迁移进入土壤中。在估算排入到牧场中的

兽药的 PEC_{soil} 时，假设兽药直接进入土壤且在土壤上层 5cm 的范围内均匀分布。对整个动物群体治疗的估算基于：（1）剂量和动物的关系以 $mg/kg \cdot bw$ 计；（2）用药动物排泄的剂量百分比（如果没有排泄数据，则按 100% 计算）；（3）用药动物的饲养密度（动物数/公顷）；（4）排泄的兽药分布在土壤上层 5cm；（5）土壤的堆密度。（土壤的堆密度为 $1500kg/m^3$ 时，“总剂量/公顷”是指药物分布在 $750000kg$ 土壤中。）

（十一）是否具有能改变 PEC_{soil} 值的缓解措施

可通过标准畜牧业规范管理措施、粪肥管理或其他缓解措施降低土壤中的兽药浓度。其他缓解措施（自然降解和处理措施）也可降低土壤中的兽药浓度，从而减少环境暴露。如果法规对粪肥的最低贮存期有规定，并且有数据表明在贮存期间可发生降解，则可能降低 PEC_{soil} 值。如申请人能够证明存在缓解措施，在计算 PEC_{soil} 时应予以考虑。

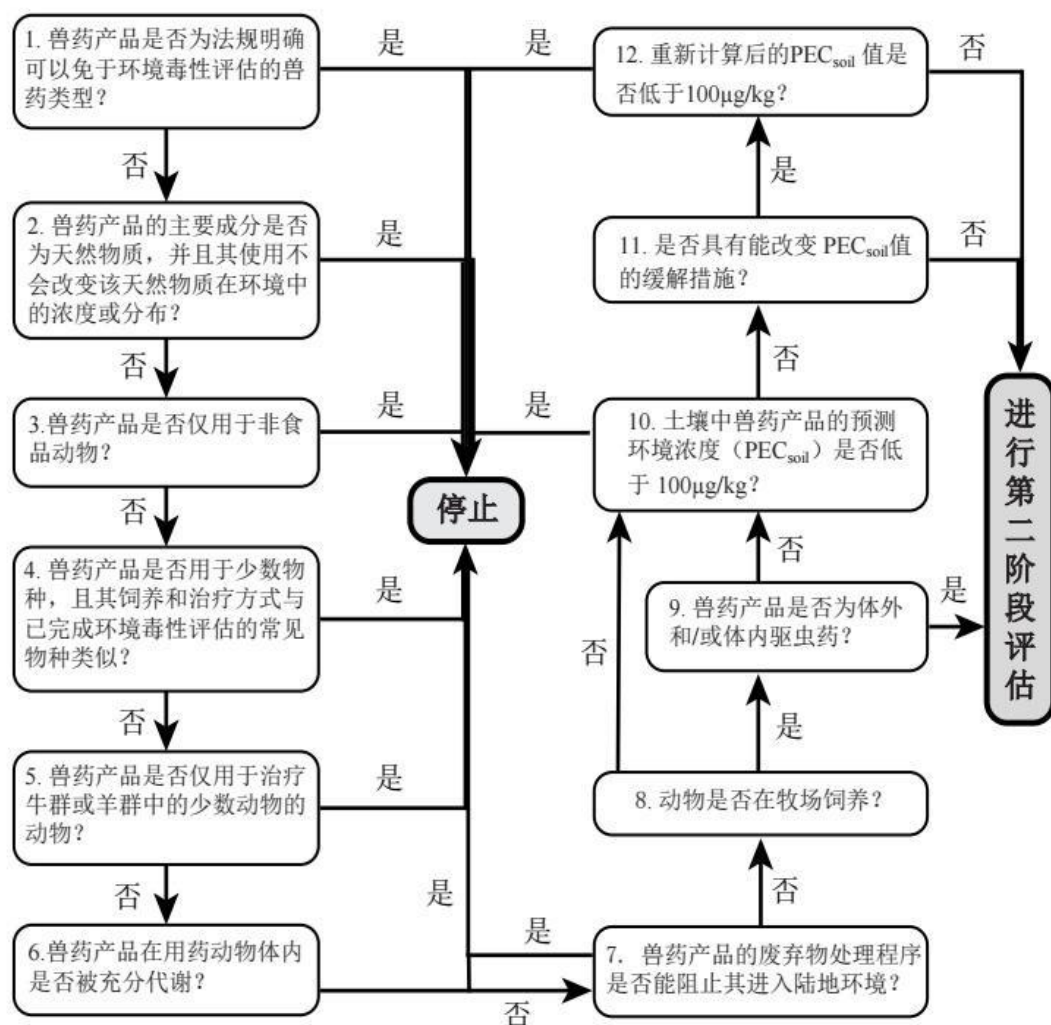
（十二）重新计算后的 PEC_{soil} 是否低于 $100\mu g/kg$

如果重新计算的 PEC_{soil} 低于 $100\mu g/kg$ ，该兽药产品可以仅进行第一阶段评估。

四、参考文献

1. VICH GL6. Environmental Impact Assessments for Veterinary Medicinal Products-Phase I, 2001.
2. EMA/CHMP/SWP/4447/00 Rev.1. Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use, 2018.
3. FDA/CDER/96N-0057. Retrospective Review of Ecotoxicity Data Submitted in Environmental Assessments for Public Display, 1997.
4. EMA/CHMP/SWP/44609/2010 Rev.1. Questions and Answers on 'Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use', 2016.

五、附图



附图 第一阶段决策树

附件 16

兽药重复给药毒性试验技术指导原则

一、概述

重复给药毒性试验是描述动物重复摄入受试物后的毒性反应，是非临床安全性评价的重要内容。重复给药毒性试验的主要目的为：（1）预测受试物可能引起的靶动物临床不良反应，包括不良反应的性质、程度、量效关系、时效关系、可逆性等；（2）判断受试物重复给药的毒性靶器官或靶组织；（3）确定未观察到有害作用剂量（No observed adverse effect level, NOAEL），是制定日允许摄入量（Acceptable daily intake, ADI）和最大残留限量（Maximum residue limit, MRL）的重要依据；（4）为临床试验不良反应监测提供参考。

本指导原则适用于兽用化学药物、兽用中药和兽用天然药物。消毒剂参考使用。

二、基本原则

试验设计要结合受试物理化性质和作用特点，需关注与其他药理毒理试验设计和研究结果的关联性，关注同类药物在靶动物的临床使用情况及适应证等，重复给药毒性试验结果应与其他药理毒理试验研究互为说明、补充或/和印证。

三、基本内容

（一）受试物

兽用化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

兽用中药、兽用天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

如果由于给药容量或给药方法限制，化学药物可使用原料药，中药可使用浸膏或提取物进行试验。试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

（二）实验动物

重复给药毒性试验通常采用两种实验动物，一种为啮齿类（通常首选大鼠），另一种为非啮齿类（通常首选Beagle犬）。特殊情况可选用其他种属或品系动物。动物应对受试物敏感，来源、品系、遗传背景清楚。

实验动物应符合国家对相应等级动物的质量规定要求，具有实验动物质量合格证明。

一般选择正常、健康、性成熟动物，雌雄各半，使用一种性别动物应给出理由，同性别体重差异应在平均体重的20%之内。

动物年龄：应根据试验期限等确定动物年龄，一般大鼠选择6~9周龄，Beagle犬为6~12月龄，动物年龄应尽量接近，应注明开始给药时动物年龄。

动物数量：啮齿类每个剂量组一般不少于30只（每种性别主试验组10只、恢复组5只），非啮齿类每个剂量组一般不少于10只（每种性别主试验组3只、恢复组2只）。如计划在试验过程中定期剖杀动物或伴随开展毒代动力学试验等，则动物数应相应增加。

（三）给药方案

1. 给药剂量：重复给药毒性试验原则上至少应设低、中、高3个剂量组，以及1个溶剂（或辅料）对照组，必要时设立空白对照组和/或阳性对照组；高剂量原则上使动物产生明显的毒性反应，但不造成死亡或严重损害，如果出现死亡，应不超过10%；低剂量组应不引起毒性作用，原则上相当或高于药效剂量或临床使用剂量的等效剂量，中剂量应结合毒性作用机制和特点在高剂量和低剂量之间设立，以考察毒性的剂量—反应关系。

剂量设计应考虑之前进行的各项试验所评价的终点、受试物的理化性质和生物利用度等；局部给药应保证充分的接触时间。高剂量应出现明显毒性反应，或达到最大给药量（Maximum feasible dose, MFD），或系统暴露量达到临床系统暴露量的100~300倍（基于AUC）。如需要在试验过程中改变给药剂量，应说明剂量调整理由，完整记录剂量调整过程。

2. 给药途径：原则上应与临床拟用途径一致，如不一致则应说明理由。用于支持制定ADI的重复给药毒性试验，给药途径为经口给药。

3. 给药频率：原则上，动物应每天给药，特殊类型的受试物就其毒性特点和临床给药方案等原因，可根据具体药物的特点设计给药频率。

4. 试验期限：建议分阶段进行重复给药毒性试验，通过较短试验期限的毒性试验获得的信息，可以为较长试验期限的毒性试验设计提供给药剂量、给药频率、观察指标等方面的参考。试验期限可以根据拟定的临床疗程和用药方式等进行设计，试验期限应与所支持的给药疗程相匹配，如果存在不同疗程的多个适应证，可按最长疗程确定试验期限。具体支持关系见表1。

表1 试验期限与给药疗程的对应关系表

给药疗程	试验期限	
	啮齿类动物	非啮齿类动物
≤2 周	1 个月	1 个月
2 周~1 个月	3 个月	3 个月
1 个月~3 个月	6 个月	6 个月
>3 个月	6 个月	9 个月 ^{1,2}
用于制定 ADI ³	至少包含 3 个月和 12 个月	至少包含 3 个月和 12 个月

注：1. 当免疫原性或耐受性问题使更长期限的试验难以进行时；拟用于危及生命的疾病（晚期肿瘤）时，非啮齿类动物可接受不超过 6 个月期限的试验。

2. 如果用于幼龄动物，且已有药理毒理研究结果提示可能存在发育毒性，应考虑采用幼龄动物进行长期毒性试验。

3. 用于制定 ADI 的经口重复给药毒性试验：是确定 NOAEL 的关键试验，必须包含啮齿类和非啮齿类的 90 天经口毒性试验以及一年口服慢性毒性试验，使用一种动物应给出理由。啮齿类慢性毒性和致癌性合并实施时，小鼠需要 18 个月或公认的转基因小鼠 6 个月，大鼠需要 24 个月。

（四）检测指标

重复给药毒性试验应进行的检测指标详见附录（二）检测指标表。此外，还应结合受试物的特点及其他试验中已观察到的反应或背景信息（如关于处方组成成分毒性的文献等），在不影响正常毒性观察和检测的前提下增加合理的检测指标。实验动物相关指标的历史数据在重复给药毒性试验中具有重要的参考意义。

在试验结束时，对动物进行一次全面检查；当试验期限较长时，应根据受试物的特点及相关信息选择合适的时间点进行阶段性检测；试验期间对濒死或死亡动物应及时采集标本进行检测，分析濒死或死亡的原因；恢复期结束时进行一次全面的检测。

给药前应对动物进行适应性饲养，啮齿类动物应不少于 5 天，非啮齿类动物不少于 2 周。在适应性饲养时，对实验动物进行外观体征、行为活动、摄食情况和体重检查，非啮齿类动物至少应进行 2 次体温、血液学、血液生化学和至少 1 次心电图检测。

给药期间，根据试验期限的长短和受试物的特点确定检测时间和检测次数。原则上应尽早发现毒性反应，并反映出观测指标或参数变化与试验期限的关系。

给药结束，对主试验组动物进行系统的大体解剖，主要脏器称重并计算脏器系数；进行组织病理学检查，首选进行对照组和高剂量组病理学检查，如果高剂量出现病变则降序检测中低剂量组相应器官，应出具完整的病理学检查报告，如发现有异常变化，应附有相应的组织病理学照片。非啮齿类动物对照组和各给药组主要脏器组织均应进行组织病理学检查；啮齿类动物对照组、高剂量组、尸检异常动物应进行详细检查，如高剂量组动物某一组织发生病理改变，需要对其其他剂量组动物的相同组织进行组织病理学检查；通常需要制备骨髓涂片，以便当受试物可能对动物造血系统有影响时进行骨髓检查。

给药结束后，继续观察恢复期动物，以了解毒性反应的可逆性和可能出现的迟发毒性；应根据受试物代谢动力学特点、靶器官毒性反应和恢复情况确定恢复期的长短，28天重复给药毒性试验，一般恢复期不少于2周，90天以上重复给药毒性试验，一般恢复期应不少于4周。

（五）伴随毒代动力学

重复给药毒性试验根据需要可进行伴随毒代动力学试验，具体内容参照《兽药毒代动力学研究技术指导原则》。

四、结果分析与评价

采用合适的统计学方法，对试验数据进行处理。分析重复给药毒性试验结果，判断动物是否发生毒性反应及毒性靶器官，描述毒性反应的性质和程度（包括毒性反应的起始时间、程度、变化规律和消除时间）、性别差异，如果有动物死亡应分析死亡原因，确定安全范围，并探讨可能的毒性作用机制。拟用于食品动物的兽药，其重复给药毒性得到的NOAEL值，是制定ADI时综合评估最重要的参数之一。中毒剂量小于推荐剂量2~3倍的各种原料药一般不能作为兽药使用，蓄积系数小于3的原料药一般不能长期添加使用。

（一）正确理解试验数据的意义

在对试验结果进行分析时，应正确理解均值数据和个体数据的意义。啮齿类动物重复给药毒性试验中组均值的意义通常大于个体动物数据的意义，实验室历史背景数据和文献数据可以为结果的分析提供参考；非啮齿类动物单个动物的试验数据往往具有重要的毒理学意义，是试验动物数量较少、个体差异较大的原因。此外，非啮齿类动物试验结果必须与给药前数据、对照组数据和实验室历史背景数据进行多重比较，要考虑文献数据参考价值有局限性。在分析试验结果时应综合考虑数据的统计学意义和生物学意义，正确利用统计学假设检验有助于确定试验结果的生物学意义，要考虑“具有统计学意义”并不一定代表“具有生物学意义”；在判断生物学意义时要考虑参数变化的剂量—反应关系、其他关联参数的改变、与历史背景数据的比较等因素；分析试验结果时，须对出现的异常数据判断是否由受试物毒性引起并给予科学解释。

（二）正确判断毒性反应

给药组和对照组之间检测结果的差异可能来源于受试物有关的毒性、动物对药物的适应性改变或正常的生理波动，也可能源于试验操作失误和动物应激。在分析试验结果时，应关注参数变化的剂量—反应关系、组内动物的参数变化幅度和性别差异，同时综合考虑多项毒理学指标的检测结果，分析其中的关联和受试物作用机制，以正确判断药物的毒性反应。单个参数的变化往往并不足以判断化合物是否引起毒性反应，可能需要充分分析或进一步进行相关试验。此外，毒代动力学试验可以为毒性反应和毒性靶器官的判断提供重要参考依据。

（三）综合评价

重复给药毒性试验是药物非临床安全性研究的有机组成部分，是药物非临床毒理学研究中综合性最强、获得信息最多和对临床指导意义最大的一项毒理学试验，其NOAEL值也是制定ADI

综合评估最重要的参数之一。对其结果进行评价时，应结合受试物的药学特点，药效学、药代动力学和其他毒理学的试验结果等进行综合评价。

重复给药毒性试验的实验动物毒性反应结果与靶动物安全性试验的靶动物毒性反应可能存在差异，可能的原因有：（1）不同物种、种属或个体之间对某一物质的毒性反应可能存在差异，或者代谢途径及代谢产物存在差异；（2）重复给药毒性试验中通常采用较高的给药剂量，可能存在非线性动力学代谢过程相关的毒性反应。

五、试验报告

按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

六、附录

（一）不同情况中药的试验要求

考虑到中药各类药物处方来源、立题依据等差别，在具体进行试验时可参照以下要求进行。

1. 未在国内上市销售的从中药、动物、矿物等物质中提取的有效成分及其制剂，新发现的药材及其制剂，药材新的药用部位及其制剂，未在国内上市销售的从中药、动物、矿物等物质中提取的有效部位制成的制剂，未在国内上市销售的中药注射剂。以上情况，由于其物质基础较传统中药发生了明显改变，或应用经验较少，采用啮齿类动物进行重复给药毒性试验。

2. 未在国内上市销售的由中药组成的非注射给药的复方制剂，采用啮齿类动物进行重复给药毒性试验。若该类处方中含有毒性药材、无法定标准药材或有十八反、十九畏等配伍禁忌时，则应进行啮齿类和非啮齿类的重复给药毒性试验。

毒性药材：系指收入国务院《医疗用毒性药品管理办法》的中药品种。即：砒石、砒霜、水银、生马钱子、生川乌、生草乌、生白附子、生附子、生半夏、生南星、生巴豆、斑蝥、青娘虫、红娘虫、生甘遂、生狼毒、生藤黄、生千金子、生天仙子、闹羊花、雪上一枝蒿、红升丹、白降丹、蟾酥、洋金花、红粉、轻粉、雄黄。另外，凡在近年来发现的有毒性作用的药材（原材料）或在复方中含有明显有毒组分的，均按毒性药材处理。

(二) 检测指标表

项目类别		指标
1. 临床观察		外观、体征、行为活动、腺体分泌、呼吸、粪便性状、给药局部反应、死亡情况等。
2. 摄食量、体重、眼科检查		/
3. 体温和心电图检测（非啮齿动物）		/
4. 血液学检测		红细胞计数、血红蛋白、红细胞容积、平均红细胞容积、平均红细胞血红蛋白、平均红细胞血红蛋白浓度、网织红细胞计数、白细胞计数及其分类、血小板计数、凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间等。
5. 血液生化检测		天门冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、肌酸磷酸激酶、尿素氮（尿素）、肌酐、总蛋白、白蛋白、血糖、总胆红素、总胆固醇、甘油三酯、 γ -谷氨酰转氨酶、钾离子浓度、氯离子浓度、钠离子浓度。
6. 尿液观察和分析		尿液外观、比重、pH 值、尿糖、尿蛋白、尿胆红素、尿胆原、酮体、潜血、白细胞。
7. 组织病理学检查的脏器组织	(1) 需称重并计算脏器系数的器官	脑、心脏、肝脏、肾脏、肾上腺、胸腺、脾脏、睾丸、附睾、卵巢、子宫、甲状腺（含甲状旁腺） ¹ 。
	(2) 需进行组织病理学检查的组织或器官	肾上腺、主动脉、骨（股骨）、骨髓（胸骨）、脑（至少3个水平）、小肠、大肠、子宫和子宫颈、附睾、食管、眼 ² 、胆囊（如果有）、哈氏腺（如果有）、心脏、肾脏、肝脏、肺脏（附支气管）、淋巴结（一个与给药途径相关，另一个在较远距离）、乳腺、卵巢和输卵管、胰腺、垂体、前列腺、唾液腺、坐骨神经、精囊（如果有）、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾脏、胃、睾丸、胸腺（或胸腺区域）、甲状腺（含甲状旁腺）、气管、膀胱、阴道、所有大体观察到异常的组织、组织肿块和给药部位。

注：1. 仅在非啮齿类动物进行甲状腺（含甲状旁腺）称重。2. 如果眼科检查有变化时，进行眼组织病理学检查。

七、参考文献

1. 农业部公告第 1247 号. 兽药 30 天和 90 天喂养试验指导原则，2009.
2. 农业部公告第 1247 号. 兽药慢性毒性和致癌试验指导原则，2009.
3. 农业部公告第 1247 号. 兽药临床前毒理学评价试验指导原则，2009.
4. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物重复给药毒性研究技术指导原则，2014.
5. VICH GL37. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Repeat-dose Chronic Toxicity Testing, 2006.
6. VICH GL31. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Repeat-dose (90 Days) Toxicity Testing, 2006.
7. OECD TG408. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents, 2018.
8. OECD TG409. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Non-rodents, 1998.
9. OECD TG452. Chronic Toxicity Studies, 2018.

附件 17

兽药慢性毒性和致癌性试验联合研究技术指导原则

一、概述

兽药慢性毒性和致癌性试验联合研究用于评价长期暴露于受试物和/或代谢物时的慢性毒性作用及剂量—反应关系，评价进行性毒性、不可逆毒性和致癌性风险。确定受试物长期重复给药的未观察到有害作用剂量（No observed adverse effect level, NOAEL），作为最终评定受试物能否应用于寿命相当长的动物种类、尤其是食品动物的依据。

关键试验结果（如遗传毒性试验、重复给药毒性试验）显示实验动物发生可疑肿瘤或受试物存在致癌风险，需进行致癌性试验。

本指导原则适用于评价兽用化学药物。兽用天然药物参考使用。

二、试验设计

（一）实验动物

1. 实验动物选择

目前已掌握大鼠和小鼠各品系的特点及诱发肿瘤的敏感性信息，一般选择啮齿类动物进行慢性毒性和致癌性试验联合研究。单独开展的6个月以上的兽药慢性毒性试验可参考《兽药重复给药毒性试验技术指导原则》。

一般选择刚断乳的大鼠或小鼠。大鼠3~4周龄，小鼠3周龄。动物个体体重的变动范围不超过各性别平均体重的20%。

2. 实验动物管理

实验动物分别进行标记编号和称重，随机分组。

试验前，环境适应期至少为5天。

对于啮齿类动物，饲养条件应符合现行国家标准要求。同一处理组的同一性别动物应一起笼养（每笼不超过5只，以不影响动物自由活动或观察动物的症状和测定指标为宜）。若动物单只饲养须有充分的科学依据。笼具的安放应随机安排，尽可能减小位置造成的影响。

3. 肿瘤自发率

实验动物的自然肿瘤发生率原则是控制到越低越好，试验结果评价应在相同条件下观察对照组与各剂量组的肿瘤发生率及其剂量—反应关系是判定依据之一。

（二）受试物

受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。

应注明受试物的名称、来源、批号、生产日期、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶剂和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期及生产单位。

如果由于给药容量或给药方法限制，化学药物可使用原料药进行试验。试验期间应注意受试物的稳定性。在进行正式试验前，应对受试物进行分析，并提供分析报告，重点关注配制后受试物的浓度、在溶剂中的稳定性，以及非溶液体系中的均一性等。

在药物研发过程中，若受试物的工艺发生变化可能影响其安全性的，应进行相应的安全性研究。

（三）试验分组

设3~5个剂量组和1个对照组。高剂量组根据28或90天经口毒性试验确定，一般应引起一些毒性表现或损害作用，但不引起太多动物死亡；低剂量组不引起任何毒性作用；在高剂量和低剂量之间再设1~3个剂量组。对照组除了不给予受试药物外，其他各方面都应与试验组相同。如果受试物使用了某种毒性不明的溶剂，则应同时设未处理对照和溶剂对照。必要时，可设置未处理对照组，用于提供背景数据。

每个剂量组的动物数应满足试验结束时进行统计学处理要求，将慢性毒性试验与致癌试验联合开展时，每组雌性和雄性动物数均各50只以上。如计划在试验过程中定期剖杀动物或伴随开展毒代动力学试验，则动物数应相应增加。

（四）给药方案

通常每日给药一次（或一日内以不超过2~3小时间隔分多次给药）。采用多次给药或其他给药间隔的需提供科学依据。经口给药可采用混饲、混饮或灌胃。具体参考《兽药28天/90天经口毒性试验指导原则》。

试验期限：慢性试验和致癌性试验联合研究时，小鼠为18个月，大鼠为24个月。可使用公认的转基因小鼠开展6个月致癌性试验，替代小鼠18个月试验。

（五）试验指标

1. 一般观察

（1）对实验动物的一般健康状况每天至少进行2次观察和记录。对死亡动物要及时剖检；对有病或濒死的动物需分开放置或处死，并检测各项指标。

（2）动物出现异常，特别注意肿瘤的发生，需详细记录病变特征、时间、部位、大小、外形和发展等情况，对濒死动物要详细描述。

2. 详细观察

对动物详细观察并记录，每周1次。

3. 肿物触诊

试验13周后，每周1次，如采用转基因动物，试验期间每周1次。

4. 体重与摄食量

试验期的前 13 周，每周要对全部动物分别称量体重，记录摄食量，以后每 4 周 1 次。

5. 血液学检测、血液生化检测

给药结束时应采血进行血液学、血液生化检测，试验期间根据需要可适当增加检测次数（重复给药部分已包括3个月、6个月血液学检测指标）。血液学、血液生化检测指标见《兽药重复给药毒性试验技术指导原则》。一般每次每组每一性别检测不少于5只。

6. 尿液检查

试验的第3个月、第6个月及以后每半年1次，如果90天经口毒性试验相当水平剂量尿液未见异常，第3个月时间点可不检查。可在每次采血前一周内采用代谢笼收集固定时间尿液，进行尿液检测，检查项目包括外观、尿蛋白、相对密度、葡萄糖和潜血等。若短期重复给药试验有毒性反应指征，应增加尿液检查项目，如尿沉渣镜检、细胞分析等。每次每组每一性别应不少于5只，且每次检查尽可能为同一动物。

7. 眼部检查

试验前，对动物进行眼部检查（角膜、巩膜、虹膜），试验结束时，对高剂量组和对照动物进行眼部检查，若发现高剂量组动物眼部有变化，则应对其他组动物进行检查。

8. 病理检查

（1）大体剖检

所有实验动物，包括试验过程中死亡或濒死处理的动物以及试验结束处死的动物都应进行解剖和全面系统的肉眼观察。观察到的可疑病变和肿瘤部位均应固定保存，以备进一步做组织学检查。在试验过程中，各组应剖检部分动物进行病理组织学检查。

（2）脏器称量

剖检实验动物的同时，称取体重及重要脏器重，计算脏器比值。需要称重及固定的脏器具体见《兽药重复给药毒性试验技术指导原则》。

（3）组织病理学检查

凡是试验过程中死亡或濒死处理的动物都应进行组织病理学检查。试验期间和试验结束处死的动物先对高剂量组和对照组进行组织病理学检查，发现病变后再对较低剂量组相应器官及组织进行检查。需病理学检查的器官和组织见表1。

表1 需剖检和病理学检查的器官组织信息表

剖检系统	器官组织
消化系统	食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、胰腺、肝
神经系统	脑、脑垂体、周围神经、脊髓、眼
腺体	肾上腺、甲状腺（包括甲状旁腺）、胸腺
呼吸系统	气管、肺、咽、喉、鼻
心血管系统及造血系统	主动脉、心、骨髓、淋巴结、脾
泌尿及生殖系统	肾、膀胱、前列腺、睾丸、附睾、精囊、子宫、卵巢、雌鼠乳腺
其他	大体检查中观察到有损害的组织、肿块、皮肤

（4）电镜检查

需要时可酌情进行。

（六）统计分析

以适当的统计学方法对数据进行分析，比较试验组与对照组之间的差异性。

（七）结果分析

1. 综合试验观察结果，评价受试物作用下大鼠或小鼠的临床表现。
2. 结合数据评价受试物对大鼠或小鼠增重率、饮水量及总体生长情况的影响。
3. 结合数据评价受试物对大鼠或小鼠血液学指标、血液生化指标、尿液分析指标的影响。
4. 评价受试物各剂量对大鼠或小鼠脏器系数的影响。
5. 评价受试物各剂量对大鼠或小鼠组织器官造成的病理变化。
6. 确定受试物的致癌特性：与同期对照组相比，导致肿瘤发病率增加、恶性肿瘤比例增加、肿瘤出现时间缩短、肿瘤种类增加。应同时考虑致癌性相关关键的生物学、药理学和毒理学信息，必要时评估数据权重。
7. 分析偏差及对结果是否造成影响。
8. 综合分析试验结果，判断动物毒性反应及药物毒性靶器官，描述毒性反应的性质（剂量依赖性、时间依赖性、蓄积性、可逆性等）和程度、性别差异，估计慢性摄入的危险性，确定受试物的 NOAEL。评价受试物在临床应用中诱发癌症危险性，具有致癌性的受试物不能用于食品动物。

（八）结果评价

1. 受试物慢性毒性的表现、剂量—反应关系、靶器官、可逆性，得出慢性毒性相应的 NOAEL 和/或最小观察到有害作用剂量（Lowest observed effect level, LOAEL）。
2. 致癌试验阴性结果确定的前提是各组小鼠在18个月的存活率 $\geq 50\%$ ，各组大鼠在24个月的存活率 $\geq 25\%$ 。
3. 参考WHO标准，受试物只要符合以下任何一条，可判定为受试物对受试动物具有致癌性。（1）肿瘤只发生在试验组动物，对照组无肿瘤发生；（2）试验组和对照组动物均发生肿瘤，但试验组发生率高；（3）试验组动物中多发性肿瘤明显，对照组无多发性肿瘤，或只有少数动物有多发性肿瘤；（4）试验组和对照组动物肿瘤发生率虽无明显差异，但试验组中发生时间较早。

三、试验报告

慢性试验和致癌性试验按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求分别撰写2个试验报告。

四、参考文献

1. 农业部公告第1247号. 兽药慢性毒性和致癌试验指导原则，2009.
2. OECD TG453. Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies, 1981.
3. OECD TG116. Guidance Document 116 on the Conduct and Design of Chronic Toxicity and

Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453-2nd Edition, 2012.

4. VICH GL37. Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: Repeat-dose Chronic Toxicity Testing, 2006.

5. ICH S1B (R1) . Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals, 2022.

附件 18

兽药毒代动力学研究技术指导原则

一、概述

毒代动力学研究用于阐述毒性试验中受试物和/或其代谢物的全身暴露，以及与毒性反应的剂量及时间关系；评价受试物和/或其代谢物在不同动物种属、性别、年龄、机体状态（如妊娠状态）的毒性反应；依据暴露量来评价受试物蓄积引起的靶部位毒性（如肝脏或肾脏毒性），有助于为后续安全性评价提供量化的安全性信息；评价非临床毒性研究的动物种属选择和用药方案的合理性。毒代动力学研究目的是获知受试物在毒性试验中不同剂量水平下的全身暴露程度和持续时间，预测受试物在靶动物和/或人体暴露时的潜在风险。

通常情况下，受试物作用部位的浓度—药理作用相关性比给药剂量—药理作用相关性好，受试物的毒性反应与特定毒性靶器官或组织的受试物浓度相关性较好。但有时分析结果发现，受试物系统暴露量与毒性反应缺乏良好相关性，其原因可能是分析物（如受试物和/或其代谢物）不是毒性的物质基础，系统暴露量与靶部位暴露量之间的变化不平行，应进行慎重分析。此时，需测定靶部位暴露量评价毒性或者借助数学模型揭示全身暴露量与毒性靶器官暴露量之间的关系，从而间接反映全身暴露量—毒性关系。

本指导原则为一般性指导原则，并不是每个毒性试验均需伴随毒代动力学研究，应根据试验目的和药物特点具体问题具体分析。

本指导原则适用于兽用化学药物。兽用天然药物参考使用。

二、基本原则

毒代动力学研究须执行《兽药非临床研究质量管理规范》或《药物非临床研究质量管理规范》。

毒代动力学试验的设计，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、适应证和适用靶动物特点、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。

毒代动力学试验通常伴随毒性试验实施，常被称为伴随毒代动力学试验。开展研究时，可采用主试验的适当数量动物和剂量组开展研究，当预计样品收集可能会影响毒性试验评价时，试验设计时需设立亚组或卫星组。

三、基本内容

（一）暴露量评估

由于毒性试验中通常采用两种性别动物，暴露测定也应包括两种性别的动物。选择单性别动物时应说明理由。毒性试验中应采用合适的动物数和剂量组数对全身暴露量进行估计。一般情况

下，建议受试物的每个剂量组至少每种性别 4 只动物。若有证据提示受试物毒性反应存在明显性别差异，试验中可选择敏感性别的动物。

为了更好地用“受试物体内暴露”建立“给药剂量”与“受试物毒性”之间的关系，在讨论毒代动力学结果时，应了解以下内容：受试物的毒性反应是因其药效作用随剂量升高而产生的，还是因与药效作用机制不同的其他原因而产生的；受试物的毒性反应是来自受试物和/或其代谢物；血浆蛋白结合与受试物毒性反应的关系；受试物的血药浓度与其在产生毒性反应的脏器中浓度之间的关联性等。暴露评估应考虑以下因素：血浆蛋白质结合、组织摄取、受体性质、代谢特征的种属差异、代谢物药理活性、免疫原性和毒理学作用。在血浆药物浓度相对较低时，特殊的组织或器官也可能会有较高水平的受试物和/或其代谢物。对于血浆蛋白结合率高的化合物，用游离（未结合）浓度来表示暴露更为合适。

暴露评估中需关注血浆或体液中代谢物浓度情况：1. 受试物为“前体化合物”且其转化生成的代谢物为主要活性成分；2. 受试物可被代谢为一种或多种具有药理或毒理活性代谢物，且代谢物可导致明显的组织/器官反应；3. 受试物在体内被广泛代谢，毒性试验仅可通过测定血浆或组织中的代谢物浓度来进行暴露评估。

（二）毒代动力学参数

毒代动力学研究通过测定合适时间点的样品浓度计算动力学参数。暴露程度可用受试物和/或其代谢物的血浆（血清或全血）浓度或 AUC 来表示。某些情况下，如长半衰期受试物、不完全清除、出现非预期的毒性靶器官等，可选择测定组织中的受试物浓度。

毒代动力学参数通常包括： AUC_{0-t} 、 C_{max} 、 $C_{(time)}$ 。

根据试验目的进行毒代动力学监测（Monitor）或毒代动力学特征（Profile）研究。毒代动力学监测是指在给药间期内一般采血 1~3 时间点，用以估算 $C_{(time)}$ 或 C_{max} ，常在给药开始和结束时取样，单剂量毒性给药试验或较短期的重复给药毒性试验可考虑开展暴露量监测。毒代动力学特征是指在给药间期一般采血样 4~8 时间点，用以估算 C_{max} 和/或 $C_{(time)}$ 和 AUC 等。

（三）给药方案

毒代动力学试验给药方案设计应完全参照毒性试验研究方案，包括给药剂量、给药途径、动物种属选择和给药频率、给药周期等。为达到毒性反应的最大暴露，应评估高剂量水平下受试物和/或其代谢物的暴露程度。当毒代动力学数据表明受试物的吸收特性限制了原型受试物和/或其代谢物暴露，且无其他剂量限制因素存在时，该化合物能达到最大暴露的最低剂量将被认为是可采用的最高剂量。当增加剂量导致非线性动力学时，应特别注意其与毒性研究中毒性反应的关联性，非线性动力学并不意味着剂量不可以递增，也不意味着不会有新毒性反应出现。某些情况下，非临床试验中可能会采用与临床拟用药方式不同的给药方式（如不同的给药途径、不同制剂）开展毒性试验，此时应依据暴露量评估全身暴露是否充分。

（四）样品采集

毒代动力学研究中，样品采集的时间点应尽量达到暴露评价所需的频度，但不可过于频繁，避免干扰毒性试验的正常进行并引起动物过度的生理应激反应。每项研究中的时间点数量应满足暴露评价的要求，时间点的确定应以早期毒性试验、预试验或剂量探索毒性试验以及在相同动物模型或可以合理外推的其他动物模型上获得的动力学数据为基础。

若血液中受试物暴露量无法反映靶组织或器官的毒性反应时，则可能需要考虑采用尿液、其他体液、靶组织或器官来测定受试物浓度。

（五）分析方法

毒代动力学的分析方法应基于早期建立的分析物和生物基质（生物体液或组织）的分析方法，且要根据代谢和种属差异而定。分析方法应具有特异性，并且有足够的准确度和精密度，定量限应满足毒代动力学研究时预期的浓度范围。分析物和生物基质分析方法的选择应排除样本中内源性物质可能引起的干扰。

如果分析物是消旋体或对映异构体的混合物，应予以说明。

生物样品中受试物的分析方法可参考《生物样品定量分析方法验证技术指导原则》进行验证。

（六）数据分析与评价

暴露评价的数据需有代表性。由于动力学参数多存在个体差异，且毒代动力学资料多来源于小样本的动物，因此通常难以进行高精度的统计学处理。统计分析时应注意求算平均值或中位数并评估变异情况。某些情况下，个体动物的数据比经整理、统计分析过的成组数据更为重要。

如果进行了数据转换（如对数转换），应提供理由。

在评估连续给药是否引起体内蓄积时，不仅要观察是否出现蓄积现象，还可结合受试物半衰期长短、受试物暴露对关键代谢酶或转运体的影响等方面进行分析，并注意种属差异。

完整的毒代动力学资料应包括对毒代动力学研究结果的自身评价和对毒性反应的相关解释，并报告分析方法，说明分析中所选生物基质和分析物的理由。毒代动力学的结果分析中，应比较分析受试物和/或其代谢物的药效、毒性、药代和临床拟定用药的暴露量，采用暴露量来评估受试物的安全范围。

（七）试验报告

按照《兽药非临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

四、毒代动力学在不同毒性试验中的应用

毒代动力学研究在不同毒性试验中的内容，如暴露监测和特征描述的频度，可根据研究需要有所增减。不同毒性试验的毒代动力学研究考虑如下：

（一）急性毒性试验

急性毒性试验的毒代动力学研究结果有助于评价和预测剂型选择和给药后暴露速率和持续时间，也有助于后续研究中选择合适的剂量水平。

（二）重复给药毒性试验

毒代动力学研究内容一般应纳入重复给药毒性试验设计中，包括首次给药到给药结束全过程的定期暴露监测和特征研究。后续毒性试验所采用的方案可依据前期试验的毒代研究结果修订或调整。当早期毒性试验出现难以解释的毒性问题时，可能需要延长或缩短对该受试物和/或其代谢物的毒性监测和特征研究的时间，或修订研究内容。

（三）遗传毒性试验

当体内遗传毒性试验结果为阴性时，需结合暴露量数据来评估遗传毒性风险，尤其是当体外试验显示为明确的阳性结果或未进行体外哺乳动物细胞试验时。

体内暴露的评估应采用与遗传毒性试验相同的动物种属、品系和给药途径，在最高剂量或其他相关剂量中进行。体内暴露可通过试验中所显示的体内细胞毒性（如微核试验中所检测组织的未成熟红细胞占红细胞总数的比例发生显著变化）或暴露情况（测定血液或血浆中的受试物和/或其代谢物的暴露，或直接测定靶组织中的受试物和/或其代谢物的暴露）来证明。

若体外遗传毒性试验结果为阴性，可采用上述方法或者为其他目的进行的啮齿类动物药代/毒代试验结果，结合体内暴露进行评估。

（四）生殖毒性试验

生殖毒性毒代动力学研究主要目的在于分析生殖毒性试验的结果，有助于确定生殖毒性试验中不同阶段的不同剂量是否达到了充分暴露。应考虑妊娠期与非妊娠期动物的动力学特征的可能差异。

毒代动力学数据可以来自生殖毒性试验的全部动物或部分动物。胎仔/幼仔数据用于评价受试物和/或其代谢产物能否通过胎盘屏障和/或乳汁分泌。

五、参考文献

1. 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物毒代动力学研究技术指导原则，2014.
2. ICH S3A. Toxicokinetics: A Guidance for Assessing Systemic Exposure in Toxicology Studies, 1995.
3. OECD TG417. Toxicokinetics, 2010.

附件 19

兽用化学药物非临床药代动力学试验指导原则

一、概述

非临床药代动力学研究是指通过实验动物（有时还有靶动物）体内、外及靶动物体外的试验，获取基本的药代动力学参数，从而阐明药物吸收、分布、代谢、排泄过程与特点。

药物在体内的动态过程受药物的理化性质、剂型等影响。理化性质包括解离常数、脂溶性、溶解性、粒度、晶型和稳定性（如在胃肠道）等。剂型因素包括制剂、制备工艺、给药途径等。

非临床药代动力学是药物非临床有效性和安全性研究的重要内容，在新药研究开发中占有重要地位。药物或其代谢物的体内、外浓度及其药代动力学参数，能帮助确定剂量、定量阐明药物的作用（药效或毒性）及机理、认识药物相互作用的规律，是药理学研究的主要内容之一；能帮助选择剂型、评价制剂的特点和质量，是药剂学的基本数据；能为临床研究方案的设计与优化提供必要信息，是临床有效性和安全性研究的前提与基础；能揭示药物代谢及动力学参数的种属差异，是兽药残留及动物源食品安全性研究的重要内容。

本指导原则适用于兽用化学药物。兽用天然药物参考使用。

二、分析方法

（一）分析方法选择

合适、可靠的分析方法是药代动力学研究的关键。全血、血浆、血清、尿、粪、各种组织等样品的取样量少，药物浓度低，内源性物质（如无机盐、脂质、蛋白质、代谢物以及其他药物）干扰大，个体差异明显，影响样品中活性成分含量的测定。因此，必须根据被测物的结构、性质、浓度范围和样品介质等具体情况，建立相应的分析方法。

生物样品中药物测定法有色谱法，如高效液相色谱法（HPLC），气相色谱法（GC）；色谱—质谱联用法，如液相色谱—质谱联用法（LC-MS），液相色谱—串联质谱法（LC-MS/MS），气相色谱—质谱联用法（GC-MS），气相色谱—串联质谱法（GC-MS/MS）；放射性同位素标记法，免疫学法，如酶免疫分析法，荧光免疫分析法，放射免疫分析法；微生物学法。应根据被测物的性质选择特异、灵敏、可靠的方法。

在需要同时测定多种化合物的情况下，应首选色谱法。色谱法将分离和定量同步进行，特异性好，检测器的灵敏度也能满足要求。在需要同时测定原形和代谢物以解决药物的质量平衡或体内转归问题时，放射性同位素标记法灵敏度最好，配色谱法具有良好的特异性。色谱—质谱联用法在特异性、灵敏度和分析速度上有优势。

抗生素可用微生物学法。蛋白质或多肽类物质可用免疫学法。

为保证方法的可靠性，还须对方法的性能做确证，以考察从样品采集到分析测试的全过程中环境、介质、材料和操作对测定的影响。确证分全面确证和部分确证两种。首次建立的分析方法

应做全面确证，其他方法视情况可做部分确证。

（二）分析方法建立及验证

全血、血清、血浆、尿中受试物的分析方法可参考《生物样品定量分析方法验证技术指导原则》；各种组织中受试物的分析方法可参考《兽药残留消除试验指导原则》。

三、试验设计

（一）药一时曲线和药动力学参数研究

1. 受试物

应提供受试物的名称、剂型、批号、来源、纯度、保存条件、配制方法及研制单位的质检报告。剂型应与药效学研究所用的相一致。

2. 试验动物

动物品种有小鼠、大鼠、兔、豚鼠、犬等。

选择原则：一般用成年、健康、清醒（不麻醉）的动物。首选动物要尽可能与药效学及毒理学的研究一致，创新药应使用两种或两种以上动物（一种为啮齿类，另一种为非啮齿类），其他类药可只用一种动物。同一动物应能多次采样。

以药一时曲线每个时间点不少于 5 只动物的数据为限计算所需动物数。应尽量从同一动物多次取样，避免用多只动物合并的数据。采用多只动物合并数据的，应增加动物数，以减少个体差异的影响。受试动物宜雌雄各半。如发现药动力学存在明显的性别差异，应增加动物数。对于单一性别用药物，可选择与临床用药一致的性别开展试验。

3. 给药方案

给药途径、方式和次数，应尽可能与临床用药一致。口服给药的，动物一般在给药前禁食 12 小时以上。给药后的禁食时间，应根据具体情况统一规定，以避免数据波动和食物的影响。

试验剂量至少用 2~3 个，以便考察药物的体内过程是否会出现非线性。高剂量最好接近最大耐受剂量，中、小剂量取有效剂量的上、下限。

对于消除半衰期长（如给药间隔短于 4 个 $t_{1/2}$ ）、有蓄积倾向且临床需重复给药的药物，应进行多次给药的药代动力学研究。多次给药的药动力学一般用一种剂量（有效剂量）试验。根据药效学和单次给药的药代动力学结果，确定给药剂量、间隔和疗程。

4. 采样

采样点的安排对完整药一时曲线和药动力学参数获得影响很大。采样点应覆盖药物的吸收相、平衡相和消除相。吸收相不少于 3 个点，血药峰浓度（ C_{max} ）附近至少 3 个点，消除相 4~6 个点。对于血管外给药吸收快的药物，应避免第一个采样点是峰浓度。采样时间至少应持续到 3~5 个消除半衰期（ $t_{1/2}$ ）或 C_{max} 的 $1/20 \sim 1/10$ 。给药前采空白样品。正式试验前应通过预试验确定合理的采样点。

5. 数据处理与分析

要选用合适的数据处理及统计学方法。计算机程序要注明名称、版本和来源。

应由每个动物的血药浓度—时间数据分别计算药代动力学参数。静脉注射给药，要求计算 $t_{1/2}$ 、表观分布容积（Vd）、血药浓度—时间曲线下面积（AUC）和清除率（CL）等。可同时用统计矩法计算平均滞留时间（MRT）和药时曲线下面积（ AUC_{0-t} ， $AUC_{0-\infty}$ ）。血管外给药，除上述参数外，尚须得出 C_{max} 、达峰时间（ t_{max} ）和吸收速率常数（ K_a ）等，以反映药物吸收的规律。

（二）吸收与生物利用度研究

对于经口给药的创新药，应同时开展动物血管内给药试验，确定绝对生物利用度。如有必要，可做在体或离体肠道吸收试验，揭示药物吸收的特性及影响因素。

对于血管外给药和其他改变剂型的药物，应尽可能提供绝对生物利用度。

（三）分布及血浆蛋白结合研究

1. 分布研究

一般用大鼠或小鼠，选择一个剂量（有效剂量）开展试验。给药后，一般测定药物在心、肝、脾、肺、肾、胃肠、生殖腺、脑、体脂、骨骼肌等组织的浓度，以了解药物在体内的主要分布组织。要特别注意药物浓度高、蓄积时间长的组织和器官，以及药效或毒性靶器官中药物的分布情况。若药物对造血系统有影响，应考察其在骨髓的分布。参考血药浓度—时间曲线，选取 3 个时间点分别代表分布相（或吸收相）、平衡相和消除相，以定量考察药物在各个时刻每个组织中的分布。药物浓度较高的组织应增加观测点，以进一步研究消除情况。每个时间点，至少应有 5 个动物的数据。做分布实验，必须注意取样的代表性，如取 1/2 或 1/4 个肾应对称。

以下情况应考虑做重复给药的组织分布研究：药物原形或代谢物在组织中的消除半衰期明显大于其血浆消除半衰期，并且是毒性研究给药间隔的两倍；重复给药的药代动力学或毒代动力学发现，血中药物或代谢物的稳态浓度显著高于单次给药药代动力学预期的浓度；在短期毒性、单次给药的组织分布和药效学等研究中观察到未预料的、有重要意义的组织病理学改变；定位靶向释放药物。

采用放射性同位素标记法做组织分布试验的，应说明标记物的放化纯度、标记率（比活性）、标记位置、给药剂量等；放射性分析方法，如分析仪器、本底计数、计数效率、校正因子、样品制备过程等；放射性示踪生物学试验的详细过程，生物样品测定时对放射性衰变进行校正的方程。要尽可能提供给药后不同时相的整体放射自显影图像。

2. 血浆蛋白结合研究

一般情况下，只有游离的药物才能通过生物膜向组织扩散、被肾小管滤过或肝脏代谢。药物与血浆蛋白结合会影响药物的分布及消除动力学过程，降低药物在靶位的浓度和作用强度。药物的血浆蛋白结合率试验方法，有平衡透析法、超过滤法、分配平衡法、凝胶过滤法和光谱法等。要根据药物的理化性质和实验室条件，选择一种方法做至少 3 个浓度（包括有效浓度）的血浆蛋白结合率试验，每个浓度至少重复试验 3 次。要说明血浆蛋白结合率是否存在浓度依赖性。

对于血浆蛋白结合率高于 90% 的药物，建议开展体外药物竞争结合试验，以考察临床上可有可

能合用的高血浆蛋白结合率的药物在蛋白结合上的相互作用。

为预测和解释实验动物、靶动物在药效学及毒性反应方面的差异性和相关性，建议同时开展实验动物和靶动物的血浆蛋白结合率比较试验。

（四）代谢与排泄研究

1. 代谢研究

创新药要确定主要代谢途径和主要代谢物的结构及活性性质，创新的前药还应系统地开展原药和活性代谢物的药代动力学研究。

对于主要以代谢消除的新药（原形的排泄量 $<50\%$ ），代谢研究可分成两个阶段进行：临床前阶段采用色谱、放射性同位素标记或色谱—质谱联用等方法，分离、分析和确证主要的代谢物；临床阶段，对临床Ⅱ期证明具有进一步研究开发前景的药物，应尽早对活性较强的代谢物展开研究，包括代谢物的动力学参数、代谢途径等。

创新药应观察药物对实验动物和靶动物微粒体细胞色素 P450 的诱导或抑制作用，以了解药物在代谢上的潜在相互作用。酶的抑制作用可用底物法测定，诱导作用可在整体动物多次给药后观察肝 P450 活性的变化。

实验动物和靶动物肝的组织匀浆、细胞悬液、微粒体及灌流器官等，可方便、经济地用来研究药物的代谢途径、动力学特点、代谢酶对动力学参数影响、药物或代谢物与蛋白质或 DNA 结合等，是体内药代动力学研究的补充，对深入阐明药物的药效和毒性机理有重要价值。

2. 排泄研究

（1）经尿和粪排泄 一般用小鼠或大鼠。将动物置代谢笼内，用一个有效剂量给药后，按事先设计的时间间隔分段收集全部尿液和粪样，直至药物排尽为止。给药前应采取空白尿液和粪样。试验前应做预试，使设计的采样时间点能覆盖药物及其主要代谢物从尿粪中排泄的起始、达峰和基本结束等全过程。

尿样要记录体积，混匀，量取一部分测定药物及其代谢物浓度。粪样凉干后称重。注意：不同动物的粪便，干湿不同。用合适的溶剂，按一定比例将粪样制成匀浆，记录总体积，量取一部分测定药物及其代谢物的浓度。最后，计算药物和代谢物经粪和尿排泄的量和速率。每个时间点应至少有 5 只动物的数据。

（2）经胆汁排泄 一般用大鼠在乙醚麻醉下做胆管插管引流，待动物清醒后，经多种途径给药，并以合适的时间间隔分段收集胆汁，测定药物及其主要代谢物的含量，计算排泄的量和速率。

四、试验报告

研究报告应注明试验的单位、负责人、日期、人员（并签名盖章）、项目编号。正文前应有简短摘要，缩略语列表，文后附参考文献，标准操作规程列表。正文包括以下内容：

1. 目的意义

项目的重要性、必要性及立项依据。

2. 分析方法

分析方法类型、编号，仪器设备、分析条件，确证简化的理由，方法学详细描述，对照品（被测药物、代谢物、内标物）的纯度和来源，稳定性实验描述及相关数据，选择性、准确度、精密度、回收率、定量限、标准曲线的实验数据，代表性图谱。用于计算结果的回归方程，样品测定时标准曲线列表，各分析批 QC 样品测定结果及其精密度、准确度综合列表，任何可能偏离分析方法建立条件的情况。

样品编号、采集日期，运输前保存及运输情况，分析前保存情况。分析批的编号、分析日期、分析方法、分析人员、起止时间、主要设备和材料，标准曲线和 QC 样品图谱复印件，各分析批待测样品浓度计算结果，20%样品测定图谱的复印件。

缺失样品的原因，重复测试的结果。应对舍弃的任何数据、报告选择的数据说明理由。

3. 试验设计

受试品来源，参比品及选用理由。受试动物背景资料，动物数及分组设计，给药剂量及方法，采样时间安排。试验期间动物的日粮性质，喂饮方式与频率，禁食等。给药后动物的临床不良反应，受试动物中途退出、脱落的记录及原因说明。从文献提供药物的红细胞摄取和蛋白结合的特点，包括蛋白结合的程度和结合蛋白的类型。

4. 数据与参数

以药时曲线和药动力学参数研究为例，其他参考执行。数据处理与统计学方法。单次给药，提供每个动物及全部动物汇总的血药浓度—时间数据、曲线图、主要参数，临床前药代动力学规律和特点的讨论与评价。多次给药，提供每个动物及全部动物汇总的首次给药后的血药浓度—时间数据、曲线图、药代动力学参数，至少 3 次给药的谷浓度、平均稳态浓度、波动系数，末次给药后的稳态血药浓度—时间数据、曲线图，比较首次与末次给药的药—时曲线的药代动力学参数。

5. 总结与评价

对所获取的数据要做科学、全面的分析，阐明药物吸收、分布和消除的特点，经尿、粪和胆汁排泄的情况，与血浆蛋白结合的程度，体内蓄积的程度和主要蓄积的器官或组织。创新药还应阐明在体内代谢、消除的过程和质量平衡规律。

要对结果做综合评价，把药物的药代动力学特点与其制剂、有效性和安全性等有机联系起来，找出相关性，为药物的整体评价和以后的临床研究提供更有价值的资料。

对于改变酸根、晶型的药物，要根据药物的特点及改变的具体情况确定是否做改变前后的药代动力学比较研究。

对映异构体的物理性质（旋光性除外）和化学性质（在手性环境中除外）相同，但可能具有不同的药代动力学性质和药理、毒理特点（质的，量的）。研究者应建立适用于对映体选择性分析的定量方法，研究对映体之间相互转化的可能性和每种对映体吸收、分布、代谢和排泄的规律。如果是外消旋体且两对映体的药代动力学性质不同，研究者应分别研究各对映体的剂量线性关系、代谢/排泄性质和药物相互作用的影响。若两对映体的药代动力学曲线相同或它们的血浆

浓度保持恒定比值，则非手性分析或只对其中一个对映体做研究即可。如果是开发单一对映体，则应研究说明该对映体转化为另一对映体的程度、该对映体的药动学性质与其作为外消旋体组分时的药代动力学性质是否一致。应将单一对映体在实验动物体内的药一时曲线与其在靶动物体内的药时曲线进行比较，以确定对映异构体在不同动物体内的相互转化和处置的特点。

对于新的复方制剂，应比较复方和单方的药代动力学特点，考察药物间的相互影响，阐明组方的合理性。

附件 20

兽用化学药物临床药代动力学试验指导原则

一、概述

新兽药的临床药代动力学是研究药物在靶动物体内的吸收、分布、代谢和排泄的规律，对药物在动物体内随时间变化而发生的量变规律进行测定，其目的是通过试验获取新兽药在靶动物的药动学参数。药动学参数是评价兽药质量的重要指标之一，是药物制剂学研究的主要依据和工具，也是制定合理的给药方案（包括剂量、疗程、给药途径、给药间隔等）的重要理论和实践依据。

本指导原则适用于兽用化学药物在靶动物进行临床药代动力学试验。各试验单位可根据不同药品的特点，参考本技术指导原则，科学合理地进行试验设计，并对试验结果进行综合评价。

二、分析方法

由于生物样品一般来自全血、血清、血浆、尿液或其他组织，具有取样量少、药物浓度低、内源性物质的干扰多（如激素、维生素、胆汁以及可能同服的其他药物）以及个体差异大等特点，因此必须建立灵敏、专一、精确、可靠的生物样品定量分析方法，并对方法进行确证。

（一）常用分析方法

目前常用的分析方法主要有：

1. 色谱法 气相色谱法（GC）、高效液相色谱法（HPLC）、色谱—质谱联用法（LC-MS、LC-MS-MS、GC-MS、GC-MS-MS）等，可用于大多数药物的检测。从目前发展看，生物样品的分析一般首选色谱法，如HPLC、GC法或LC-MS、GC-MS法，这类方法灵敏度、特异性、准确性一般都能适应临床药代动力学试验的需要，大约90%的药物浓度测定可以用色谱法来完成。具体选用何种分析方法应根据药物的化学结构、理化性质、仪器条件以及借鉴文献方法多方面因素来考虑确定。

2. 免疫学方法 放射免疫分析法、酶免疫分析法、荧光免疫分析法等，多用于蛋白质多肽类物质的检测。

3. 微生物学方法 主要用于抗生素或部分抗寄生虫药的检测，如果抗微生物药的代谢产物仍有抗菌活性的，则不宜选用微生物法。

（二）方法学验证

全血、血清、血浆、尿中受试物的分析方法可参考《生物样品定量分析方法验证技术指导原则》；各种组织中受试物的分析方法可参考《兽药残留消除试验指导原则》。

三、试验设计

本试验在临床阶段进行，目的是探讨药物在成年靶动物体内吸收、分布和消除（代谢和排泄）的特点。由于各种疾病的病理状态均可不同程度的对药物的药代动力学产生影响，为了客观

反映药物在动物体的药代动力学特征，故多选择健康成年靶动物。

健康成年靶动物的药代动力学试验包括静脉注射给药、内服给药、肌肉（或皮下）注射给药、其他途径（如透皮剂、气雾剂）给药的药代动力学试验。

供内服给药的药物，需进行静注和内服给药的药动学试验；可供内服和注射的药物，则还须增加肌肉（或皮下）注射给药的药动学试验；其他途径给药的药物，则需进行静注和其他途径给药的药动学试验。不能静注的药物，可测定相对生物利用度。

（一）单次给药的药代动力学试验

1. 试验动物及数量

应为健康成年靶动物。每个剂量组：大动物5~6头，中动物6~8头，小动物8~10头，禽12~15只。

2. 受试药物

供试药品应与临床验证的药品一致，应提供受试药品的名称、批号、来源、纯度、保存条件及配制方法。在试验前应对药品的质量进行检查测定。给药剂量、途径与临床应用一致。

（1）药物质量 试验药品应当在符合《兽药生产质量管理规范》条件的车间制备，并经检验符合质量标准。

（2）药品保管 试验药品应有专人保管，记录药品使用情况。试验结束后剩余药品和使用药品应与记录相符。

3. 药物剂量

一般选用低、中、高三种剂量。剂量的确定主要根据临床耐受性试验的结果，并参考在实验动物的药效学、药代动力学及毒理学试验的结果，以及经讨论后确定的拟在临床试验时采用的治疗剂量推算。高剂量组剂量必须小于或等于靶动物最大耐受的剂量，但一般应高于治疗剂量。

应能够根据试验结果对药物的药代动力学特性做出判断，如该药呈线性或非线性药代动力学特征等，以及剂量与体内药物浓度的关系，为临床合理用药提供有价值的参考信息。

4. 给药

每头动物给药剂量（一般按每千克体重计算）、途径、方法、部位、速度均应一致。

5. 采样

一般采用血浆或血清，必要时也可采用尿液或其他样品。

（1）采血途径 一般采用静脉血液，牛、马、羊可由颈静脉采血，猪由前腔静脉或耳静脉采血，禽由翼下静脉采血。

（2）采样点的确定

采样点的安排对完整药一时曲线和药动学参数获得影响很大。采样点应覆盖药物的吸收相、分布相和消除相。吸收相不少于3个点，血药峰浓度（ C_{max} ）附近至少要3个点，消除相4~6个点。对于血管外给药吸收快的药物，应避免第一个点是峰浓度。采样时间至少应持续到3~5个消除半衰期（ $t_{1/2}$ ）或 C_{max} 的1/20~1/10。给药前采空白样品。例如，某待测药物的峰时预试结果约

为1小时，消除半衰期为3~4小时，则采血点可设计为10、15、30、45、60分钟和1.5、2、4、8、16、24小时。一般最后一个点的血药浓度应等于或在定量限以下。

如果同时收集尿样时，则应收集给药前尿样及给药后不同时间段的全部尿样。取样点的确定可参考在实验动物的药代动力学试验中药物排泄过程的特点，应包括开始排泄时间，排泄高峰及排泄基本结束的全过程。

为保证最佳的采样点，建议在正式试验前进行预试验工作，然后根据预试验的结果，审核并修正原设计的采样点。

6. 参数计算

用药代动力学计算软件处理每一动物的血药浓度—时间数据，获得药代动力学参数，对其进行分析，说明其临床意义，并对临床给药方案提出建议，如剂量（首次剂量、维持剂量）、途径、给药间隔时间、疗程等。

药代动力学计算软件主要用于数据处理、计算药代动力学参数、模型判断、统计学分析及图形显示等。目前国内外常用的药代动力学软件有MCPKP、3P97、WinNonlin、NONMEN、PKBP-N1、NDST及ABE等，在实际工作中可根据需要合理选用。

试验中测得的每头靶动物的血药浓度—时间数据，绘制每头靶动物的药-时曲线及平均药—时曲线，一般可用房室模型或非房室模型分析，进行药代动力学参数的计算，求得药物的主要药代动力学参数，以全面反映药物在靶动物体内吸收、分布和消除的特点。主要药代动力学参数有： K_a 、 K_e 、 V_d 、 t_{max} 、 C_{max} 、AUC、 F 、 $t_{1/2}$ 、MRT和CL等， t_{max} 、 C_{max} 、 K_a 、 F 主要反映药物吸收速率和程度； V_d 主要反映理论上药物在体内占有的分布容积；而 K_e 、 $t_{1/2}$ 、MRT和CL等主要反映药物从血液循环中消除的特点。

从尿药浓度估算药物经肾排泄的速率和总量。

（二）多次给药的药代动力学试验

当药物在临床上将连续多次应用时，需明确多次给药的药代动力学特征。根据试验目的，应考察药物多次给药后的稳态浓度（ C_{ss} ），达到稳态浓度的速率和程度，药物谷、峰浓度之间的波动系数（DF），是否存在药物蓄积作用，明确 C_{ss} 和临床药理效应（药效和不良反应）的关系。

1. 试验动物与数量

均同单次给药的药代动力学试验。

2. 受试药物

同单次给药的药代动力学试验。

3. 药物剂量

采用临床试验拟订的一种治疗剂量，并根据单次给药的药代动力学参数中消除半衰期和临床试验给药方案中制订的给药间歇以及给药日数，确定总给药次数和总剂量。

4. 采样点的确定

根据单剂量药代动力学求得的消除半衰期，估算药物可能达到稳态浓度的时间。一般采样点最好安排在早上空腹给药前，以排除饲料、时辰以及其他因素的干扰。应连续测定3次（一般为连续3天的）谷浓度（给药前）以确定已达稳态浓度。当确定已达稳态浓度后，在最后1次给药后，采集一系列血样，时间点包括各时相（同单次给药），以测定各时间点的血药浓度，获得稳态血药浓度—时间曲线。

5. 参数计算

根据试验中测定的3次谷浓度及稳态血药浓度—时间数据，绘制多次给药后药—时曲线，求得相应的药代动力学参数，包括峰时间（ $t_{\max}$ ）、峰浓度（ $C_{\max}$ ）、消除半衰期（ $t_{1/2}$ ）、清除率（CL）、平均稳态血药浓度（ C_{av} ）、稳态血药浓度—时间曲线下面积（ AUC_{ss} ）及DF（波动系数）等。

说明多次给药时药物在体内的药代动力学特征，同时应与单剂量给药的相应药代动力学的参数进行比较，观察它们之间是否存在明显的差异，特别在吸收和消除等方面有否显著的改变。

（三）长效制剂（包括缓释、控释制剂）的药代动力学试验

长效制剂与普通制剂的药代动力学行为明显不同，因此须进行与参比制剂相比较的单次药代动力学试验（必要时应做多次给药的药代动力学试验），以证实制剂的长效特征。

1. 试验动物、数量要求、受试药物的要求

均同单次给药的药代动力学试验和多次给药的药代动力学试验。

2. 参比制剂的选择及受试药物剂量

根据产品的不同以及试验目的的差别，试验中所选择的参比制剂以及用药剂量的选择都会有所不同。一般而言，其参比制剂应选择普通制剂或其他已经上市的长效制剂。而受试制剂和参比制剂每次用药的剂量和每日用药的次数，则应该按照各自临床用药的方案来制订，但两者每日用药总量通常应该是相同的。

3. 试验设计

采用随机交叉设计。

4. 采样点的确定

参考单次给药的药代动力学试验和多次给药的药代动力学试验。

5. 药代动力学参数的估算

根据试验中测定的血药浓度—时间数据，绘制单次给药和多次给药后药—时曲线，求得相应的药代动力学参数，单次给药主要药代动力学参数有： K_a 、 $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、 AUC 、 K_e 、 $t_{1/2}$ 、MRT和CL、相对生物利用度等。多次给药主要药代动力学参数有：达峰时间（ $t_{\max}$ ）、峰浓度（ $C_{\max}$ ）、消除半衰期（ $t_{1/2}$ ）、清除率（CL）、平均稳态血药浓度（ C_{av} ）、稳态血药浓度—时间曲线下面积（ AUC_{ss} ）及DF（波动系数）等。参数的估算方法参照前面内容。

6. 药代动力学参数的统计分析

说明长效制剂在靶动物体内的药代动力学特征，同时应与参比制剂给药的相应药代动力学的

参数进行比较，观察它们之间是否存在明显的差异，特别在吸收和消除或有效血药浓度维持时间等方面有否显著的改变。药动力学参数差异的显著性检验一般采用单双侧t检验。

（四）数据分析与评价

应提供各项实测具体数据，说明数据处理的统计方法。如用计算机处理数据，应指出所用程序的名称。

对所获取的数据进行科学和全面的分析。应对药物在靶动物体内的药代动力学特点进行综合性论述：包括吸收、分布和消除的特点；经尿、粪和胆汁的排泄情况；与血浆蛋白结合的程度；并提供药物在体内蓄积的程度及主要蓄积的器官或组织；如为创新药，还应阐明其在体内的代谢、消除过程及物质平衡情况。

在评价的过程中注意进行综合评价，即把药代动力学特点与药物的制剂选择、有效性和安全性进行横向联系，找出其中的相关性，为药物的整体评价和临床试验提供更多有价值的信息。

四、试验报告

试验报告应注明试验的单位、负责人、日期、参加试验的人员（签名盖章）、项目编号。正文前应有简短摘要，缩写词列表，文后附参考文献，附录（如色谱图等）。正文包括下列内容。

（一）目的意义

说明项目的重要性、必要性及立项依据。

（二）分析方法

分析方法的有效性应通过实验证明。在试验报告中，应提交成功完成这些实验工作的相关资料。建立一般性和特殊性标准操作规程、保存完整的实验记录是分析方法有效性的基本要素。生物分析方法建立中产生的数据和QC样品测试结果应全部记录并妥善保存，并提交足够的可供评价的方法学建立和样品分析的数据。

提交的数据至少包括：

1. 方法建立数据

分析方法的详细描述；仪器设备、分析条件，该方法所用对照品（被测药物、代谢物、内标物）的纯度和来源；描述测定选择性、准确度、精密度、回收率、定量限、标准曲线的实验并给出获得的主要数据列表；列出日内日间精密度和准确度的详细结果；描述稳定性考察及相关数据；根据具体情况提供代表性的色谱图或质谱图并加以说明。

2. 样品分析数据

样品处理和保存的情况，分析样品时标准曲线列表，用于计算结果的回归方程，各分析批QC样品测定结果综合列表并计算批内和批间精密度、准确度，各分析批包括的未知样品，浓度计算结果。

提交20%受试样品测试的色谱图复印件，包括相应分析批的标准曲线和QC样品的色谱图复印件。

3. 其他相关信息

注明缺失样品的原因，重复测试的结果。对舍弃任何分析数据和选择所报告的数据说明理由。

（三）实验设计

受试品来源，参比品及选用理由。受试靶动物背景资料，动物数及分组设计，给药剂量及方法，采样时间安排。试验期间动物的日粮性质，喂饮方式与频率，禁食等。给药后动物的临床不良反应，受试动物中途退出试验、血样破损、脱落等的记录及原因说明，从文献提供药物的红细胞摄取和蛋白结合的特点，包括蛋白结合的程度和结合蛋白的类型。

（四）血药浓度数据和药代动力学参数

数据处理与统计学方法。单次给药，提供每头动物及全部动物汇总的血药浓度—时间数据、曲线图、药代动力学参数，临床药代动力学规律和特点的讨论与评价。多次给药，提供每头动物及全部动物汇总的首次给药后的血药浓度—时间数据、曲线图、药代动力学参数，至少3次给药的谷浓度、平均稳态浓度、波动系数，末次给药后的稳态血药浓度—时间数据、曲线图，比较首次与末次给药的药—时曲线和药代动力学参数。

附件 21

抗菌药物Ⅱ、Ⅲ期临床药效评价试验指导原则

一、概述

抗菌药物Ⅱ、Ⅲ期临床药效评价试验是指在一定条件下，科学地考察和评价新药对特定的感染性疾病治疗、预防的有效性作出评价。抗菌药物临床药效评价试验指导原则是为新兽用抗菌药物进行Ⅱ、Ⅲ期临床试验制定的。本指导原则规定了各项技术标准及有关研究方法的要求。

抗菌药物（抗生素和合成抗菌药）临床药效评价以靶动物为主要对象，其目的是为了评价一种新兽药是否具有治疗或预防动物疾病的价值，有无危险性或不良反应。

临床试验开始前，必须具备以下条件：（1）试验必须在能够进行细致观察并能够对紧急情况采取及时和必要的措施的环境和条件下进行。（2）负责临床研究的兽医必须经过临床药理学培训。（3）研究者必须事先充分了解临床前药理的各项研究资料。（4）有各期临床试验的设计与具体执行计划。

本指导原则适用于各类新抗菌药物进行Ⅱ、Ⅲ期临床试验。

二、Ⅱ期临床试验

初步评价兽药对靶动物目标适应证的防治作用 and 安全性，确定合理的给药剂量方案。试验设计内容如下：

（一）试验动物

1. 品种

应与受试药物的拟推荐应用范围相一致，靶动物的种类、品系、体重和年龄相一致。不同靶动物和不同适应证应分别进行临床试验。

2. 来源

应从有试验动物资质证明的饲养单位购买，如果采用没有资质证明的动物，应来源清楚，并经检疫合格后才能用于试验。如果没有实验动物并且实验条件能得到有效控制，也可使用自然感染的动物。

3. 每组动物数

人工攻毒病例：小动物不能低于 30 只，中动物不能低于 10 头，大动物不能低于 6 头；

自然感染病例：小动物不能低于 50 只，中动物不能低于 30 头，大动物不能低于 15 头。

（二）试验材料

1. 受试药物及来源

受试药物应与拟上市的制剂完全一致、同一剂型，有完整的产品质量标准，有符合规定格式的说明书。受试药物应来源于同一批号，由申报单位自行研制并在 GMP 验收合格的车间生产的样品，并提供产品检验合格报告。

2. 对照药物及来源

对照药物应当是已经在我国批准上市，与受试药物作用相似、适应证相同的药物。来源可以从市场购买或由申报单位提供，并提供产品检验合格报告。

3. 菌（毒）种及实验室检查

应采用国家鉴定的菌（毒）种，如果采用自然病例分离的菌（毒）株，应详细记录其来源，并应经国家权威部门鉴定方可用于试验。

对攻毒用菌（毒）株以及临床分离到的致病菌（毒）株，需要集中进行 MIC 测定。如需要证明试验药物是否为耐酶抗菌药物或酶抑制剂，还应同时对所分离菌（毒）株作产酶鉴定。

必要时测定攻毒菌（毒）种或自然分离菌（毒）株对受试药物和对照药物的 MBC。

（三）试验分组

临床试验的组数取决于抗菌药物的类型和疾病的特性，也取决于评价防治结果的方法和是否要进行有效剂量的筛选，但均应采用随机原则分组。具体要求如下：

1. 人工诱发感染试验

根据受试药物的药物动力学和体外抑菌试验结果初步确定给药剂量，至少设高、中、低三个剂量组；药物对照组（阳性对照组）的剂量应为临床推荐剂量；并设感染不给药对照组（阴性对照组）和不感染不给药对照组（健康对照组）。

2. 自然感染试验

条件不允许人工诱发感染试验时，可选择自然病例进行试验。根据受试药物的药物动力学和体外抑菌试验结果初步确定给药剂量，一般设高、中、低三个剂量组，并设药物对照组（阳性对照组）和感染不给药对照组（阴性对照组）。

3. 如果受试药物是复方制剂，药物对照组应根据组方中各主要成分，分别设单方临床推荐剂量对照组。

（四）感染和病例的确诊

1. 人工诱发感染

在正式试验前进行预备试验，确定感染途径和感染量，感染量至少应为受试动物的最小致死量或 80%以上感染动物出现明显的发病症状。

2. 自然感染病例

通过发病过程、临床症状、病理剖检、致病菌的分离和鉴定以及血清学诊断确诊为试验所需致病菌感染的发病动物才能作为试验病例，各组试验病例的发病严重程度应基本一致。如果是预防试验，可用同一饲养单元内的发病动物和未发病动物作为试验病例，但各组之间的发病动物数、未发病动物数和发病严重程度应基本一致。

（五）给药方案

根据药代动力学的研究结果和疾病的特点选择拟推荐的给药途径和给药方案，包括开始给药时间、给药剂量、时间间隔和持续时间等。

1. 治疗试验：一般要求在感染后出现典型临床症状才开始给药；自然感染病例在病因确诊后开始给药。

2. 预防试验：一般可在感染前或感染同时开始给药，自然病例在试验开始后就可开始给药。

（六）观察时间和指标

1. 观察时间：预防和治疗试验在停止给药后继续观察不得少于 14 天。

2. 观察临床症状：应详细观察和记录试验开始后、给药前、给药后和停药后各组动物的一般临床症状和特殊症状的表现以及症状的发生、发展、转归和消失情况，并尽量用定量指标（如症状记分、体温、症状出现百分率等）来评估。

3. 计算发病率、死亡率、有效率、治愈率和保护率：试验开始后详细观察和记录各组动物开始发病时间、发病数、死亡数、死亡时间以及用药后症状好转动物数和症状消失动物数，并计算各组动物的发病率、死亡率、有效率、治愈率和保护率。其计算公式如下：

发病率=发病动物数/试验动物数

死亡率=死亡动物数/试验动物数

治愈率=症状消失动物数/发病动物数

有效率=症状好转动物数/发病动物数

保护率=未发病的动物数/试验动物数

4. 病理剖检：对全部死亡的动物应进行病理剖检，并进行病变记分，必要时取相关组织进行组织病理学检查；对没有死亡动物的试验，在试验结束时各组可取部分或全部存活动物进行剖检、记分和组织病理学检查。病理剖检结果应附有照片。

5. 致病菌分离培养：在人工诱发感染试验后，在自然感染病例给药前、后，各组分别抽取部分动物（一般不能低于 5 头），每天取其排泄物、分泌物或体液进行致病菌分离鉴定，连续进行不得少于 5 天；必要时对死亡动物和剖检动物取其血液或组织进行致病菌分离鉴定，以确诊致病原因和死亡原因。

6. 生理生化指标测定：必要时各组取部分动物的血液、尿液或分泌物进行血常规、尿常规、肝功能和肾功能等生理生化指标的测定，特殊病例应进行特殊指标的检测。一般防治试验不进行此项检查。

7. 增重和饲料转化情况：在试验开始和试验结束应分别称各组动物的体重，并记录饲料消耗，计算各组的增重和饲料转化情况。

（七）结果判断

1. 试验的可靠性：在整个试验中，药物对照组必须有效，否则试验需重做。

2. 治疗试验：可用死亡率、治愈率、有效率、无效率和/或生产性能进行判断，并与各对照组进行比较及统计学分析。

3. 预防试验：可用保护率、发病率、死亡率、症状和病变记分、病程长短、生产性能等进行判断，并与各对照组进行比照及统计分析。

4. 结论：确定受试药物对本适应证的有效剂量和推荐剂量；并提出临床应用该药物的注意事项、不良反应以及药物的相互作用等。

三、Ⅲ期临床试验

本试验目的是进一步验证兽药对靶动物目标适应证的防治作用 and 安全性。具体试验设计内容如下：

（一）试验动物

1. 品种

应与实验临床试验所选择的品种相一致，包括靶动物的种类、品系、体重和年龄相一致。不同靶动物和不同适应证应分别进行Ⅲ期临床试验。

2. 来源

Ⅲ期临床试验应在动物来源清楚，饲养规范、实验条件能得到有效控制的饲养场进行。

3. 试验动物数

Ⅲ期临床试验用自然感染的动物进行试验，每组动物数：大动物不能低于 30 头，中动物不能低于 60 头，小动物不能低于 100 只，禽不能低于 200 只。

（二）试验材料

1. 受试药物及来源

受试药物应是同一批号，且与上市产品完全一致的产品，并有符合规定的说明书，是由申报单位自行研制并在 GMP 验收合格的车间生产的样品，并提供农业农村部认可的检验机构出具的合格检验报告。

2. 对照药物及来源

对照药物应当是已经在我国批准上市，与受试药物属同一类或适应证相同的药物，来源可从市场购买或由申报单位提供，并提供农业农村部认可的检验机构出具的合格检验报告。

（三）试验分组

Ⅲ期临床试验的组数取决于抗菌药物的类型和疾病的特性，亦可根据实验临床试验的结果来确定；具体要求如下：

一般要求设 1 个受试药物组和 1 个药物对照组；如果推荐剂量是一个范围的试验，选择中间剂量为受试药物组，必要时选择推荐剂量的上限和下限各设 1 个剂量组。在可能情况下，也可设阴性对照组，动物数量可根据具体情况设定。

（四）病例的确诊

Ⅲ期临床试验一般选择自然感染病例，通过发病过程、临床症状、病理剖检、致病菌的分离和鉴定以及血清学诊断确诊为试验所需致病菌感染的发病动物才能作为试验病例，各组试验病例的发病严重程度应基本一致。如果是预防试验，可用同一饲养单元内的发病动物和未发病动物作为试验病例，但各组之间的发病动物数、未发病动物数和发病严重程度应基本一致。

（五）给药方案

根据Ⅱ期临床试验的推荐的给药途径和给药方案进行，包括开始给药时间、给药剂量、时间间隔和持续时间等。

（六）观察时间和指标

1. 观察时间：预防和治疗试验在停止给药后继续观察不得少于7天。

2. 观察临床症状：应详细观察和记录试验开始后、给药前、给药后和停药后各组动物的一般临床症状和特殊症状的表现以及症状的发生、发展、转归和消失情况，并尽量用定量指标（如症状记分、体温、症状出现百分率等）来评估。

3. 计算发病率、死亡率、有效率、治愈率和保护率：试验开始后详细观察和记录各组动物开始发病时间、发病数、死亡数、死亡时间以及用药后症状好转动物数和症状消失动物数，并计算各组动物的发病率、死亡率、有效率、治愈率和保护率。其计算公式如下：

发病率=发病动物数/试验动物数

死亡率=死亡动物数/试验动物数

治愈率=症状消失动物数/发病动物数

有效率=症状好转动物数/发病动物数

保护率=未发病的动物数/试验动物数

4. 病理剖检：对全部死亡的动物应进行病理剖检，必要时取相关组织进行组织病理学检查。必要时在试验结束时各组可取部分存活动物进行剖检、记分和组织病理学检查。病理剖检结果应附有照片。

5. 增重和饲料转化情况：在试验开始和试验结束应分别称各组动物的体重，并记录饲料消耗，计算各组的增重和饲料转化情况。

（七）结果判断

1. 试验的可靠性：在整个试验中，药物对照组必须有效，否则试验需重做。

2. 治疗试验：可用死亡率、治愈率、有效率、无效率 and/或生产性能进行判断，并与药物对照组进行比较及统计分析。

3. 预防试验：可用保护率、发病率、死亡率、病程长短、生产性能等进行判断，并与药物对照组进行比照及统计分析。

4. 结论：确认受试药物对本适应证的推荐剂量；并提出临床应用该药物的注意事项、不良反应以及药物的相互作用等。

四、试验报告

为公正、科学地评价药物的临床疗效，对试验报告内容做如下要求：

1. 试验目的。

2. 试验时间与地点。

3. 试验设计者、负责人、参加者及电子邮箱。

4. 受试药物需注明兽药名称、生产厂家、规格、生产批号及用法与用量。

5. 试验动物的品种与品系、体重、日龄或月龄、健康状况、检疫情况等。
6. 归纳总结该药物的试验结果，确认受试药物的推荐剂量、不良反应及注意事项等。
7. 参考文献。
8. 试验数据，应有详细的试验原始记录。原始资料保存处、联系人、电话。
9. 试验单位（加盖公章）。

附件 22

兽药小鼠精子畸形试验指导原则

一、概述

小鼠精子畸形试验是通过观察精子在药物影响下出现畸变，以评价药物对生殖细胞的致突变作用的一种毒理学评价方法。小鼠精子畸形受基因控制，具有高度遗传性，许多常染色体及X、Y性染色体基因直接或间接地决定精子形态。精子的畸形主要是指形态的异常，已知精子的畸形是决定精子形成的基因发生突变的结果。因此形态的改变提示有关基因及其蛋白质产物的改变。小鼠精子畸形试验可检测药物对精子生成、发育的影响，而且对已知的生殖细胞致突变物有高度敏感性。

为了确保小鼠精子畸形试验结果的真实性、可靠性和可追溯性，根据新兽药研究的规律，结合国内兽药毒理学评价的实际情况制定了本指导原则。

本指导原则适用于兽用化学药物、兽用中药、消毒剂及饲料药物添加剂对哺乳动物雄性生殖细胞的遗传毒性检测。

二、试验设计

（一）材料与方法

1. 实验动物

SPF级雄性小鼠，6~8周龄，体重25~35g，数量60只左右。

2. 试剂

（1）致突变阳性对照物

可选用环磷酰胺40~60mg/(kg·d)或甲基磺酸甲酯(MMS)50mg/(kg·d)或丝裂霉素C(MMC)1.0~1.5mg/(kg·d)，经口给予。所有致突变阳性对照物要求分析纯以上，含量不低于98.5%。

（2）其他试剂

氯化钠：分析纯；

甲醇：分析纯；

伊红：分析纯。

3. 生理盐水配制

称取NaCl 0.90g置烧杯内，加适量蒸馏水溶解，移入100ml容量瓶内，混匀并用蒸馏水定容。转移至试剂瓶内贴标签备用。

4. 2%伊红水溶液配制

称取伊红2.00g置烧杯内，加适量蒸馏水溶解，移入100ml容量瓶内，混匀并用蒸馏水定容。移至试剂瓶内贴标签备用。

5. 仪器

- (1) 生物显微镜（带滤光片及 100×物镜）
- (2) 细胞计数器
- (3) 其它实验室常用仪器

(二) 试验步骤

1. 剂量分组

设3个剂量组，即1/2、1/4和1/8 LD₅₀剂量组；当受试药物LD₅₀大于5000mg/kg（或ml/kg）时，试验组高剂量设为5000mg/kg（或ml/kg），将2500mg/kg（或ml/kg）和1250mg/kg（或ml/kg）分别设为中剂量和低剂量。另外设1个阳性对照组和1个阴性（溶剂）对照组。每个剂量组10只小鼠，确保给药后每组至少存活5只动物供采样、制片。

2. 受试药物溶液配制

根据受试药物理化性质，选定溶剂，将受试药物配制成水溶液（或乳化剂、混悬液、糊状物等）。必要时加入增溶剂或助悬剂（如吐温-80、淀粉、羧甲基纤维素钠等）。

各剂量组受试药物溶液可采用2倍递次稀释法配制。根据受试药物小鼠LD₅₀，按小鼠0.1～0.2ml/10g体重受试药物给予体积要求，先确定1/2 LD₅₀剂量组（即高剂量组）受试药物溶液需配制的浓度以及各剂量组所需受试药物溶液体积，再拟定1/2 LD₅₀剂量组受试药物初始溶液需配制的体积，计算需称取/量取受试药物的量。

用天平或移液管，称取或量取受试药物，置烧杯内，加入适量选定的溶剂溶解或稀释，转入容量瓶内，混匀并定容，即获得1/2 LD₅₀剂量组（高剂量组）所需浓度的受试药物溶液。分取一半供1/2 LD₅₀剂量组给药，再向原溶液中加入同体积的溶剂，混匀后溶液正好是1/4 LD₅₀剂量组（中剂量组）所需的浓度；分取一半供1/4 LD₅₀剂量组给药，又加入同体积的溶剂，混匀后溶液正好是1/8 LD₅₀剂量组（低剂量组）所需的浓度，可供其给药用。

3. 试验动物称重、标记编号和分组

试验前对购置的小鼠饲养观察1周。选择50只健康雄性小鼠进行个体称重和标记编号，采用完全随机法，将小鼠分为5组，每组10只。

4. 给药

按受试药物要求，采用灌胃（或注射）给药，1次/d，连续5d。每次给药先称取小鼠体重，按小鼠0.1～0.2ml/10g体重剂量要求计算各小鼠应给予的受试药物体积。用注射器吸取受试药物溶液进行给药。

5. 采样与制片

在第一次给药后35d进行采样、制片，每个剂量组采样不小于5只小鼠。操作如下：

- (1) 用颈椎脱臼法处死小鼠，剪开腹腔，分离并摘取两侧附睾，放入盛有2ml生理盐水的平皿中；

(2) 以眼科剪将附睾纵向剪1~2刀（不宜过碎），用吸管吸取其中的生理盐水吹打数次，静置3~5min；

(3) 用4层擦镜纸过滤除去组织碎片，吸取滤液滴1~2滴于载玻片上，推片，每只小鼠样制片4张；

(4) 空气中推片自然干燥后，用甲醇固定5~10min，干燥；

(5) 用2%伊红染色45min~1h，用水轻轻洗去染液，自然晾干后镜检。

6. 阅片

先用低倍镜（加绿色滤光片）在片中找到背景清晰、精子重叠较少的部位，再用高倍镜检查精子形态。精子有头无尾（轮廓不清）、或头部与其他精子及碎片重叠、或明显是人为剪碎者均不进行计数。判断双头、双尾畸形时，要注意与二条精子的部分重叠相鉴别，判断无定形时要与人为剪碎及折叠相鉴别。每只小鼠涂片检查计数正常精子200条以上，每个剂量组至少检查1000条精子。在检查计数正常精子时，检查同一视野中的畸形精子，并对它们进行分类计数（分无钩、香蕉形、无定形、双头、胖头、尾折叠、双尾7类）。

（三）数据整理与分析

1. 统计各剂量组小鼠的正常精子检查数、畸形精子数及各类畸形精子数。记录入下表：

组别	正常精子检查数	畸形精子数	各类畸形精子数						
			无钩	香蕉形	无定形	胖头	尾折叠	双头	双尾
.....									
阴性（溶剂）对照组									
阳性对照组									

2. 计算各剂量组小鼠的精子畸形率（%）及各类畸形精子百分率（%），并计算各剂量组小鼠精子畸形率的标准差，将结果列入下表。计算公式如下：

$$\text{畸形率}(\%) = \frac{\text{畸形精子数}}{\text{正常精子检查数} + \text{畸形精子数}} \times 100\%$$

$$\text{畸形精子百分率}(\%) = \frac{\text{单类畸形精子数}}{\text{畸形精子数}} \times 100\%$$

小鼠精子畸形率

组别	动物数	正常精子检查数	畸形精子数	畸形率 (%)	差异显著性
.....					
阴性 (溶剂) 对照组					
阳性对照组					

各类畸形精子百分率

组别	畸形精子数	各类畸形精子百分率（%）						
		无钩	香蕉形	无定形	胖头	尾折叠	双头	双尾
.....								
阴性（溶剂）对照组								
阳性对照组								

3. 每个剂量组的小鼠精子畸形率分别与阴性 (溶剂) 对照组的小鼠精子畸形率进行统计比较。用 Wilcoxon 秩和检验 (非参数等级秩和检验) 计算各剂量组精子畸形率的差异显著性。

(四) 结果评价

1. 首先观察阳性对照组和阴性对照组的试验结果。要求阳性对照组精子畸形率增高应在质控范围 (实验历史记录) 之内, 阴性对照组的畸形精子率也应在质控范围 (一般为 0.8%~3.4%) 之内, 并且阳性对照组的畸形精子率与阴性对照组的畸形精子率有显著性差异 ($P < 0.01$), 否则所得结果不可靠, 试验应重做。

2. 当试验组小鼠的精子畸形率为阴性对照组的 2 倍或 2 倍以上, 或经统计有显著差异, 并且有剂量—反应关系, 试验结果也能重复, 可判断试验结果为阳性, 即受试药品为精子畸形诱变剂。

3. 如果试验组的给药剂量已使动物发生死亡, 而精子畸形仍未见增加, 则可判定试验结果阴性。

(五) 注意事项

1. 除特别注明外, 试验用水为蒸馏水, 试剂为分析纯试剂, 动物为 SPF 实验动物。
2. 实验动物饲养环境要求达到 SPF 级。
3. 镜检时要注意鉴别人为造成的精子损伤, 特别要注意由于精子重叠和交叉所造成的如多头、双头、双尾及多尾等畸形精子假象。
4. 结果判定时, 要注意排除机体缺血、变态反应、感染和体温增高等导致精子畸形率增高的因素, 以免造成假阳性结果。

三、试验报告

为公正、科学地评价药物的特殊毒性，对试验报告内容做如下要求：

1. 试验目的。
2. 试验时间与地点。
3. 试验设计者、负责人、参加者及电子邮箱。
4. 受试药物需注明兽药名称、生产厂家、规格、生产批号及用法与用量。
5. 试验动物的品种与品系、体重、日龄或月龄、健康状况、检疫情况等。
6. 归纳总结该药物的试验结果，评价受试药物对生殖细胞的致突变作用。
7. 参考文献。
8. 试验数据，应有详细的试验原始记录。原始资料保存处、联系人、电话。
9. 试验单位（加盖公章）。

四、附录



附图 小鼠正常精子及常见畸形精子类型模式图

图例说明：

- 1——正常精子；
- 2——无钩（头顶未见弯形钩）；
- 3——香蕉形（头部上下粗细悬殊不大，形似香蕉）；
- 4、5、6——无定形；
- 7——胖头（头比正常大约 $1/2 \sim 1$ 倍，着色较浅）；
- 8——尾折叠（仅指伴有头部畸形者）；
- 9——双头；
- 10——双尾。

附件 23

兽用中药、天然药物临床试验技术指导原则

一、概述

临床试验是指在一定控制条件下科学地考察和评价兽药治疗或预防靶动物特定疾病或证候的有效性和安全性的过程。充分、可靠的临床研究数据是证明所申报产品安全性和有效性的依据。

兽用中药、天然药物的研制过程，与西兽药相比，既有相同点，也有其特殊性。首先，中药新药的发现或立项，多来源于临床的直接观察及经验获得的提示；其次，中药内在成分及其相互作用的复杂性致使其药性、药效及毒理的研究面临更多的困难；再者，影响研究结论客观性和准确性的因素也相对较多。因此，临床试验对中药有效性和安全性的评价具有更加特殊的意义。

为了保证兽用中药、天然药物临床试验结论的确实可靠，规范临床研究行为，根据《兽药注册办法》和《新兽药研制管理办法》制定本指导原则。本指导原则旨在阐述兽用中药、天然药物临床试验设计和实施过程中应把握的一般性原则及关键性问题，为兽用中药、天然药物新产品研发提供技术指导。

二、兽用中药、天然药物临床试验的基本内容

根据试验目的的不同，兽用中药、天然药物的临床试验一般包括靶动物安全性试验、实验性临床试验和扩大临床试验。申请注册新兽药时，应根据注册分类的要求和具体情况的需要，进行一项或多项临床试验。

（一）靶动物安全性试验

靶动物安全性试验是观察不同剂量受试兽药作用于靶动物后从有效作用到毒性作用，甚至到致死作用的动态变化的过程。该试验旨在考察受试兽药使用于靶动物的安全性及安全剂量范围，为进一步临床试验给药方案的制定提供依据。

（二）实验性临床试验

实验性临床试验是以符合目标适应证的自然病例或人工发病的试验动物为研究对象，确证受试兽药对靶动物目标适应证的有效性、安全性，同时为扩大临床试验合理给药剂量及给药方案的确定提供依据。实验性临床试验的目的在于对新兽药临床疗效进行确证，保证研究结论的客观性和准确性。

（三）扩大临床试验

扩大临床试验是对受试兽药临床疗效和安全性的进一步验证，一般应以自然发病的动物作为研究对象。

三、兽用中药、天然药物临床试验的共性要求

（一）以中兽医学理论为指导

中药用于防治动物疾病及提高生产性能有着悠久的历史，并已形成了一套完整的理论体系。

基于对生命活动规律和疾病发生学的整体观，中兽医学对疾病的治疗通常立足于通过调节脏腑、经络、气血等机能建立机体内环境的稳态，维持机体气机出入升降、功能活动的有序性，提高机体对外环境的适应能力。因此，中药的特点和优势在于“整体调节”，这与化学药品“对抗疗法”有着本质的不同。

兽用中药、天然药物临床试验中评定治疗结局指标的确立，不应只从单纯生物医学模式出发，仅着眼于外来致病因子，或生物学发病机理的微观改变和局部征象，而应从整体水平上选择与功能状态、证候相关的多维结局指标。在中药临床试验设计时，将治疗效能定位于对病因或某一疾病环节的直接对抗，或仅仅对用药后短期内的死亡率等极少指标的考察，显然是不合理的。

对适应证疗效的定位，除了治疗或预防作用外，也完全可定位于配合使用的层面，如辅助治疗、缓解病情或对某类药物的增效作用等。

（二）试验设计原则

兽用中药、天然药物临床试验的设计应遵循随机、对照和重复的原则。

1. 随机原则

随机是指每个受试动物以机会均等的原则随机地分配到试验组和对照组，目的在于使各组非实验因素的条件均衡一致，以消除非实验因素对试验结果的影响。

2. 对照原则

对照是比较的基础，为了评价受试兽药的安全性和有效性，就必须有可供比较的对照。合理设置对照可消除或减少实验误差，直观地判断出受试动物治疗前后的变化（如体征、症状、检测指标的改变以及死亡、复发、不良反应等）是由受试兽药，而不是由其他因素（如病情的自然发展或机体内环境的变化）引起的。

试验组和对照组动物应来自同一个受试群体，二者的基本情况应当相近。试验组与对照组的唯一区别是，试验组接受受试兽药治疗，而对照组接受对照兽药治疗或不给药。

3. 重复原则

试验组与对照组应有适当的样本含量，过小或过大都有其弊端。样本含量过小，检验效能偏低，导致总体中本来具有的差异无法检验出来，但也并非样本愈大愈好。如果无限地增加样本含量，无疑将加大实验规模，延长实验时间，浪费人力物力，还有可能引入更多的混杂因素。

决定样本含量（病例数）的因素不外乎几个方面。首先，与样本所包含个体的差异程度有关。个体之间差异越大，所需观察的病例数越多；反之，若个体之间差异较小，所需观察的病例数就较少。其次，与组间效应差异的程度有关。组间效应差异越大，所需观察病例数就较少；反之，则所需观察的病例数较多。再者，还与统计资料的性质有关。以计数资料或等级资料作组间效应比较时，所需的样本含量，较以计量资料要大。除此之外，统计推断的严格程度（即以显著性检验为基础所进行的统计推断，所得出的结论与真实性相符合的程度）也影响样本含量的大小。

一般来说，临床试验的样本含量至少应达到最低临床试验病例数规定（见表1~3），而实

际情况下，应根据统计学的要求科学而灵活地确定样本含量。

表 1 靶动物安全性试验每组最低动物数

受试动物种类	动物数
马、牛等大动物	5
羊、猪等中动物	8
兔、貂、狐等小动物	10
犬、猫等宠物	8
家禽	15

表 2 实验性临床试验每组最低动物数

受试动物种类	动物数	
	自然病例	病症模型
马、牛等大动物	10	5
羊、猪等中动物	20	10
兔、貂、狐等小动物	20	15
犬、猫等宠物	15	10
家禽	30	15

表 3 扩大临床试验每组最低动物数

受试动物种类	动物数	
	散发病例	群发模型
马、牛等大动物	20	30
羊、猪等中动物	30	50
兔、貂、狐等小动物	30	50
犬、猫等宠物	20	30
家禽	50	300

（三）试验方案

1. 试验方案的制定

临床试验应制定切实可行的试验方案。一般情况下，临床试验方案应包括以下内容：（1）临床试验的题目和目的；（2）临床试验承担单位和主要负责人；（3）进行试验的场所；（4）试验预期的进度和完成时间；（5）临床试验用兽药和对照用兽药；（6）病例选择或人工发病的依据和方法；（7）试验设计；（8）主要观测指标的选择；（9）数据处理与统计；（10）疗效评定标准；（11）病例记录表。

2. 受试兽药

一般情况下，受试兽药包括临床试验用兽药和对照用兽药。

临床试验用兽药应为中试或已上市产品，其含量、规格、试制批号、试制日期、有效期、中试或生产企业名称等信息应明确，且应注明“供临床试验用”字样。

对照用兽药应采用合法产品，选择时应遵循同类可比、公认有效的原则。在试验方案及报告中应阐明对照兽药选择的依据，对二者在功能以及适应证上的可比性进行分析，并明确其通用名称、含量、规格、批号、生产企业、有效期及质量标准推荐的用法用量等。对照用药物使用的途径、用法、用量应与质量标准规定的内容一致。

临床试验用兽药和对照用兽药均需经省级以上兽药检验机构检验，检验合格的方可用于临床试验。

3. 菌（毒、虫）种

人工发病使用的菌（毒、虫）种应明确，一般需采用已被认可的标准株。采用其他来源的菌（毒、虫）种，应提供详尽的背景资料，包括来源、权威部门鉴定报告和主要生物学特性等。

4. 效应指标的选择

正确选择效应指标是观察并做出判断的基础，对保障研究结论的客观、准确至关重要。主要效应指标一般应具有关联性、客观性、精确性、灵敏性和特异性。

关联性：所选指标与研究目的有本质的联系，应与疗效和安全性密切相关，并能确切反映试验兽药引起的效应。

客观性：临床试验应选择具有较强客观性的指标，或建立对定性指标或软指标观测的量化体系，以减少或克服观测过程中因研究者主观因素造成的偏倚。客观性包括两个方面的含义，一是指标本身应具有客观特性，能通过适当的手段和方法被客观地度量和检测，并以一定的量值表述其观测结果；二是指度量、观测的客观性，即度量、观测的结果应能恰当地真实地反映其状态及程度。

精确性：包括准确性和可靠性，前者反映观测值与真实值接近的程度，后者表示观测同一现象时，多次结果取得一致或接近一致的程度。

灵敏性：灵敏性高可以提高观测结果的阳性率，但需注意灵敏性过高所导致的假阳性结果。

特异性：选择的指标应能反映效应的专属性，且不易受其他因素干扰。

除此之外，应该看到许多疾病往往表现为机体功能、代谢、组织结构等多方面的综合改变，对所使用兽药的反应也可能是多方面的，因而评价药物效应的指标也必需是综合性的。一般来说，如果有必要而且可能，应从临床症状、体征指标、功能或代谢指标、病原学和血清学等多方面地设置观测指标，以便能对疗效做出全面综合的判定。

5. 疗效判定

对疗效的判定必须有客观、明确、操作性强的标准。疗效等级通常划分为痊愈、显效、有效和无效。应该注意的是，不同的疾病有不同的临床过程，对治疗药物的反应也不尽相同，因而疗效的等级划分也不是一概而论的。

（四）试验记录

临床试验承担单位应对所有数据和整个试验过程做详尽的记录，并按规定保存及管理，以备审核人员进行检查。

（五）统计方法

对试验数据的分析处理，一般要借助适宜的统计方法。选用的统计方法是否正确，直接关系到统计推断的合理性及结论的科学性。

临床研究统计资料一般可分为计量资料和计数资料。不同类型的数据资料，须采用不同的统

计分析方法，不可混淆。

（六）结论推导

结论的外推是一个建立在对资料、数据的分析，统计学显著性检验的基础上，由样本的信息推及总体的过程。结论外推时须以研究样本的同质性为基础。

结论的推导应兼顾差异的统计学意义和实际临床意义。如果某种新的防治措施，既具有临床意义，又具有统计学意义，这将是我们所期望的。若疗效的比较，其差异具有临床意义，但却达不到统计学显著水平，此时应考虑试验样本是否足够大。

（七）临床试验报告

临床试验报告是反映兽药临床试验研究设计、实施过程，并对试验结果做出分析、评价的总结性文件，是正确评价兽药是否具有临床应用价值的重要依据。

临床试验单位应对其出具的临床试验报告盖章确认，并对试验报告的真实性负责。临床试验负责人和主要参与人员需在临床试验报告上签字，并负有职业道德和法律责任。

临床试验承担单位应符合农业农村部规定的相关资质要求。负责新兽药临床试验的研究者应具有兽医师以上资格和相关试验所要求的专业知识和工作背景。

四、靶动物安全性试验

应选用健康的靶动物进行试验，一般采用与临床应用相同的给药途径、间隔时间和疗程。

以推荐的临床用药剂量为基础设置不少于三个剂量组，一般为 1、3、5 倍剂量组，必要时设置 10 倍剂量组。

观察指标一般应包括临床体征、血液学指标、血液生化指标、二便等，有条件或必要时可进行剖检和组织病理学检查。

五、实验性临床试验

（一）一般性原则

在试验设计和具体实施过程中，应严格控制试验条件，将可能影响试验结果准确性的因素降低至最低限度。保证试验各组处于相同的试验环境下，并有可靠的隔离措施。试验各组的处置方法应明确，包括给药剂量、给药途径及方式、给药时间及间隔、给药周期、观察时间和动物的处置等。给药剂量的选择、单次给药剂量的设定、给药周期的确定等都应应以药效学试验和安全性试验的数据为依据。对不同试验个体应做到给药剂量科学准确均等。

（二）人工发病或复制病证模型

1. 受试动物

一般采用健康动物。对动物的饲养管理应达到一级或一级以上实验动物的管理要求。受试动物来源、品种、日龄、性别、体重、健康状况、免疫接种、日粮组成及饲养管理等背景资料应清楚，同一试验应尽可能使用背景相对一致的动物。

2. 发病或造模方法

人工发病或造模，一般应采纳被广泛认可的方法。采用新方法的，应说明新方法的优势及其

建立的依据，包括菌（毒、虫）种、药物、人工环境等致病因素的选择，染毒或给药途径的选择，剂量筛选过程，染毒后的生物学效应，应附具研究数据和必要的文献资料。

应清晰、详尽地描述发病的方法和过程，并对发病是否成功做出评价。

3. 试验分组

试验各组的设置取决于所考察兽药的特性，也与是否要进行有效剂量的筛选相关。一般应设置不少于三个剂量的试验组（即高、中、低剂量组，中剂量为拟推荐剂量）和三个对照组（即兽药对照、阳性对照和阴性对照组）。

（三）自然病例的临床试验

以自然发病的动物作为受试对象时，病例选择的准确性至关重要。为此，研究者应制定病例选择的诊断标准、纳入标准、排除标准以及病例剔除和脱落的条件。在确定合格受试动物时，诊断标准、纳入标准和排除标准互为补充、不可分割，以避免产生选择性偏倚。

1. 诊断标准

诊断标准是指能够准确诊断一个疾病或证候的标准。选择或制定的诊断标准应符合特异性、科学性、客观性和可操作性原则，一般可考虑采用：（1）国家统一标准：由政府主管部门、全国性学术组织制定的诊断标准。（2）高等农业院校教科书记载的有关诊断标准。（3）地方性学术组织制定的诊断标准。采纳诊断标准时应说明标准来源或出处。没有现行标准或现行标准存在缺陷时，应自行制定或完善相关诊断标准。诊断标准的内容，不仅包括临床诊断或辨证，还应有必要的病理剖检、生理生化指标检测、血清学、病原学诊断等数据作为佐证，保证病例纳入的准确性。

主治病证定位为中兽医证候的，除了以中兽医理论进行辨证，制定病例诊断的证候标准外，一般还应在对病证实质进行分析的基础上，尽可能采用适当的现代兽医学诊断指标（生理生化、病理变化、血清学、病原学等）。某些疾病临床有不同分型或分期，且不同型、期有其明显的临床特征者，应明确分型或分期。

2. 病例纳入标准

纳入标准是指合格受试动物所应具备的条件。在一项具体的研究中，被纳入研究的对象，除应符合诊断标准外，研究者还必须根据具体的研究目的及实施的可行性，对研究对象的其他条件同时做出规定。一般包括病型、病期、病程、品种、年龄、性别、体质、胎次以及其他情况。选择的病例可以来自不同养殖场或兽医诊疗单位，但各动物个体不能有太大的差异。

3. 病例排除标准

排除标准指不应该被纳入研究的条件，如同时患有其他病证或合并症者，已接受有关治疗可能影响对效应指标观测者，伴有影响效应指标观测及结果判断的其他生理或病理状况（如生殖周期），以及其他偶然性因素。

4. 病例记录表

病例记录表是收集、记录第一手临床数据的表格。临床试验的成功与否可取决于病例记录表

的设计，蹩脚的表格可能导致填写的内容不可靠，收集的数据不完整。在设计病例记录表时，应仔细对照试验设计中的观测指标，力求周密细致，简明清晰。

研究者应确保将任何观测结果和发现准确而完整地记录在病例记录表上，记录者应在表上签名并加注日期。

5. 试验分组

一般设置高、中、低 3 个剂量组和阳性药物对照组，预防试验还应设置阴性对照组。

六、扩大临床试验

（一）一般性原则

一般采用健康动物或自然发病的病例，对病例的选择应有确切的诊断标准和恰当的纳入标准，以降低品种、体格、性别等因素对试验结果的影响。

（二）试验设计

1. 试验分组

治疗试验一般设置推荐剂量组和药物对照组，预防试验设置推荐剂量组、兽药对照组和不处理对照组。推荐剂量应有试验依据。

2. 给药方案

推荐剂量、给药方法和疗程等应与标准、说明书草案中的推荐用法相一致。

附件 24

兽用中药、天然药物临床试验报告撰写原则

一、概述

兽药临床试验报告是反映兽药临床试验研究设计、实施过程，并对试验结果作出分析、评价的总结性文件，是正确评价兽药是否具有临床实用价值的重要依据，是兽药注册所需的重要技术资料。报告撰写者负有职业道义，报告出具单位负有法律责任。

临床试验报告不仅要试验结果进行分析，还需重视对临床试验设计、试验管理、试验过程进行完整表达，以阐明试验结论的科学基础，这样才能对兽药的临床效应作出合理评价。一个设计科学、管理规范试验只有通过科学、清晰的表达，它的结论才易于被接受。兽药临床试验报告的撰写表达方法、方式直接影响着受试兽药的安全性、有效性评价，因此，试验报告的撰写方法和方式十分重要。

真实、完整地描述事实，科学、准确地分析数据，客观、全面地评价结局是撰写试验报告的基本准则。只有可靠真实的试验结论才能经得起重复检验，而经得起重复检验是科学品格的基本特征。

本指导原则适用于兽用中药和天然药物的临床试验报告的撰写。中药的临床试验报告应该分析和重视描述受试兽药在适应证、靶动物、使用方法等方面的中医中药特色。

本指导原则仅对一般临床试验报告的结构框架和内容要点进行了说明。由于临床试验的复杂性，报告结构和内容需根据研究的具体情况进行适当的调整，而且随着临床试验研究水平的不断提高，临床试验报告撰写的方法也将不断改进与完善。

二、临床试验报告的结构与内容

（一）报告封面或扉页

1. 报告题目。

2. 临床试验单位盖章及日期。

申明已阅读了该报告，并对报告的真实性的负责。

3. 主要研究者签名和日期。

4. 临床试验实施单位盖章及日期。

5. 主要研究者对研究试验报告的声明。

申明已阅读了该报告，确认该报告准确描述了试验过程和结果。

6. 执笔者签名和日期。

（二）报告目录

每个章节、附件、附表的页码。

（三）缩略语

正文中首次出现的缩略语应规范拼写，并在括号内注明中文全称。应以列表形式提供在报告中所使用的缩略语、特殊或不常用的术语定义或度量单位。

（四）报告摘要

报告摘要应当简洁、清晰地说明以下要点，通常不超过 600 字。

1. 试验题目。
2. 试验目的及设计、方法。
3. 研究结果。
4. 有效性和安全性结论。

（五）报告正文

1. 试验题目

2. 前言

一般包括：受试兽药研究背景；研究单位和研究者；目标适应证和试验动物或病例、治疗措施；受试动物样本量；试验的起止日期；临床试验审批；制定试验方案时所遵循的原则、设计依据；申请人与临床试验单位之间有关特定试验的协议或会议等应予以说明或描述。简要说明临床试验经过及结果。

3. 试验目的

应提供对具体试验目的的陈述（包括主要、次要目的）。具体说明本项试验的受试因素、受试对象、研究效应，明确试验要回答的主要问题。

4. 试验方法

4.1 试验设计

概括描述总体研究设计和方案。如试验过程中方案有修正，应说明原因、更改内容及依据。对试验总体设计的依据、合理性进行适当讨论，具体内容应视设计特点进行有针对性的阐述。

提供样本含量的具体计算方法、计算过程以及计算过程中所用到的统计量的估计值及其来源依据。

4.2 随机化设计

详细描述随机化分组的方法和操作，包括随机分配方案如何随机隐藏，并说明分组方法，如中心分配法，各试验单位内部分配法等。

4.3 研究对象

应描述受试动物的选择标准，包括所使用的诊断标准及其依据，所采用的纳入标准和排除标准、剔除标准。注意描述方案规定的疾病特定条件；描述特定检验、分级或体格检查结果；描述临床病史的具体特征，如既往治疗的失败或成功等；选择研究对象还应考虑其它潜在的预后因素和年龄、性别或品种因素。应对受试动物是否适合试验目的加以讨论。

以疾病与病证结合方式进行研究的，既要明确疾病诊断标准，又要列出中兽医证的诊断标

准。

人工发病或人工复制模型的临床试验，应描述试验动物的来源、种类、品种或品系、日龄、体重、性别分布、健康及免疫接种状况等。同样也应对受试动物是否适合试验目的加以讨论。

4.4 对照方法及其依据

应描述对照的类型和对照的方法，并说明合理性。

应说明对照用兽药与临床试验用兽药在功能和适应证方面的可比性。

4.5 试验过程

应描述受试兽药的名称、来源、规格、批号、包装和标签。提供对照用兽药的说明书。

如果涉及菌、毒、虫种，应说明来源，毒力大小，染毒途径，染毒剂量以及染毒后发病的情况等。

具体说明用药方法（即给药途经、剂量、给药次数和用药持续时间、间隔时间），应说明确定使用剂量的依据。

4.6 疗效评价指标与方法

应明确主要疗效指标和次要疗效指标。

对于主要指标，应注意说明选择的依据。应描述需进行的实验室检查项目、时间表（测定日，测定时间，时间窗及其与用药的关系）及测定方法。

适应证为中兽医证候的，应注意描述对相关证候疗效的评价方法和标准。

4.7 安全性评价指标与方法

应明确用以评价安全性的指标，包括症状、体征、实验室检查项目及其时间表、测定方法、评价标准。

明确预期的不良反应；描述临床试验对不良反应观察、记录、处理、报告的规定。说明对试验用药与不良事件因果关系、不良事件严重程度的判定方法和标准。

4.8 质量控制与保证

临床试验必须有全过程的质量控制，应就质量控制情况作出简要描述。在不同的试验中，易发生偏倚、误差的环节与因素可能各不相同，应重点陈述针对上述环节与因素所采取的质控措施。

4.9 数据管理

临床试验报告必须明确说明为保证数据质量所采取的措施，包括采集、核查、录入、盲态审核、数据锁定等措施。

4.10 统计学分析

描述统计分析计划和获得最终结果的统计方法。

重点阐述如何分析、比较和统计检验以及离群值和缺失值的处理，包括描述性分析、参数估计（点估计、区间估计）、假设检验以及协变量分析（包括多中心研究时中心间效应的处理）。应当说明要检验的假设和待估计的处理效应、统计分析方法以及所涉及的统计模型。处理效应的

估计应同时给出可信区间，并说明计算方法。假设检验应明确说明所采用的是单侧检验还是双侧检验，如果采用单侧检验，应说明理由。

5. 试验结果

建议尽可能采用全数据集和符合方案数据集分别进行疗效分析。对使用过受试兽药但未归入有效性分析数据集的受试动物情况应加以详细说明。

应对所有重要的疗效指标（分主要和次要疗效指标、证的指标等）进行治疗前后的组内比较，以及试验组与对照组之间的比较。多中心研究的各中心应提供多中心临床试验的各中心小结表。该中心小结表由该中心的主要研究者负责，须有该单位的盖章及填写人的签名。内容应包括该中心受试动物的入选情况、试验过程管理情况、发生的严重和重要不良事件的情况及处理、各中心主要研究者对所参加的临床试验的真实性的承诺等。

临床试验报告需要进行中心效应分析。

应描述严重的不良事件和其他重要的不良事件。应注意描述因不良事件（不论其是否被否定与药物有关）而提前退出研究的受试动物或死亡动物的情况。严重不良事件和主要研究者认为需要报告的重要不良事件应单列开进行总结和分析。应提供每个发生严重不良事件和重要不良事件的受试动物的病例报告，内容包括病例编号、发生的不良事件情况（发生时间、持续时间、严重程度、处理措施、结局）和因果关系判断等。

6. 讨论

在对试验方法、试验质量控制、统计分析方法进行评价的基础上，综合试验结果的统计学意义和临床意义。对受试药物的疗效和安全性结果以及风险和受益之间的关系做出讨论和评价。其内容既不应是结果的简单重复，也不应引入新的结果。

围绕受试兽药的治疗特点，提出可能的结论、开发价值，讨论试验过程中存在的问题及对试验结果的影响。鼓励探讨中兽医理论对临床疗效和安全用药的指导作用，提倡通过病证结合进行疗效分析。

7. 结论

说明本临床试验的最终结论，重点在于安全性、有效性最终的综合评价，明确是否推荐申报注册或继续研究。

8. 参考文献

列出有关的参考文献目录。

（六）附件

1. 所在省兽医行政管理部门出具的临床研究批件。
2. 最终的病例记录表（样张）。
3. 对照用兽药的说明书、质量标准，临床试验用兽药（如为已上市药品）的说明书。
4. 严重不良事件及主要研究者认为需要报告的重要不良事件的病例报告。
5. 多中心临床试验的各中心小结表。

附件 25

兽用中药、天然药物通用名称命名指导原则

兽药通用名称是兽药的法定名称，也是兽药质量标准中收录的名称。

为了使兽用中药、天然药物的通用名称更科学、明确、简短，使每个具有不同特性的兽药产品具有唯一的通用名称，特制定本指导原则。

一、基本原则

兽用中药、天然药物的通用名称应科学、明确、简短。

兽用中药、天然药物的命名应避免采用可能给使用者以暗示的有关药理学、解剖学、生理学、病理学或治疗学的名称，并不得用代号或容易误解和混同的名称命名。

对于沿用已久的药名，一般不要轻易变动，如必须改动，可列出其曾用名作为过渡。

兽用中药、天然药物通用名称不得采用商品名（包括外文名和中文名），也不得作为商品名或用以组成商品名，也不得用于商标注册。

二、命名细则

（一）药材命名

药材系指用于兽用中药饮片、提取物、成方制剂原料的植物、动物和矿物药。药材名称应包括中文名（附汉语拼音）和拉丁名。

1. 药材中文名

一般应以全国多数地区习用的名称命名；如各地习用名称不一致或难以定出比较合适的名称时，可选用植物名命名。

药材的主要成分与化学药品一致，应以药材名为正名，化学名为副名。如：“芒硝（含水硫酸钠）”。

增加药用部位的药材中文名应明确药用部位。如：白茅根。

药材的人工方法制成品、制取物，其名称应与天然品的名称有所区别。如：人工牛黄。

2. 药材汉语拼音名

按照中国文字改革委员会的规定拼音，第一个字母须大写，并注意药品的读音习惯。如：黄芪 Huangqi。

拼音不用音标符号。如在拼音中有的字母与前一字母合拼能读出其他音的，要用隔音符号。如：牛膝地耳草 Di'ercao 在“i”和“e”之间用隔音符号。

药名较长的（一般在四个字以上），按音节尽量分为二组拼音。如：珍珠透骨草 Zhenzhu Tougucao。

3. 药材拉丁名

药材拉丁名一般采用属种名或属名命名。

除少数药材可不标明药用部位外，需要标明药用部位的，其拉丁名先写药名，用第一格，后写药用部位，用第二格，如有形容词，则列于最后，所有单词的字母均用大写。如：远志 POLYGALAE RADIX。

以属种名命名：同属中有几个品种来源，分别作为不同中药材使用的，按此法命名。如：当归 ANGELICAE SINENSIS RADIX，独活 ANGELICAE PUBESCENTIS RADIX，白芷 ANGELICAE DAHURIOAE RADIX。

以属名命名：在同属中只有一个品种作药用，或这个属有几个品种来源，但作为一个中药材使用的。如：白果 GINKGO SEMEN（一属只一个植物种作药材用），麻黄 EPHEDRAE HERBA（一属有几个植物种作同一药材用）。有些中药材的植（动）物来源虽然同属中有几个植物品种作不同的中药材使用，但习惯已采用属名作拉丁名的，一般不改动。如属中出现其他品种作不同的药材使用，则把同属其他品种的药材加上种名，按属种命名，使之区分。如：细辛 ASARI RADIX ET RHIZOMA（已习惯采用属名作拉丁名），杜衡 ASARI FORBESII HERBA（与细辛同属的该品种用属种名作拉丁名）。

一种药材包括两个不同药用部位时，如果同时采收，则把主要的或多数地区习用的药用部位的拉丁名列在前面，另一药用部位的拉丁名列在后面，两者之间用“ET”连接。如：大黄 RHEI RADIX ET RHIZOMA。

如果不同时采收，则各药用部位单独定名，两个拉丁名并列，主要的排在上面。如：金荞麦 FAGOPYRI CYMOSI HERBA FAGOPYRI CYMOSI RHIZOMA。

一种药材的来源为不同科、属的两种植（动）物或同一植（动）物的不同药用部位，须列为并列的两个拉丁名。如：大蓟 CIRSII JAPONICI HERBA CIRSII JAPONICI RADIX。

一种药材的来源为同科不同属的两种植物时，则各属名单独定名，两个拉丁名并列，主要的排在上面。如：老鹳草 ERODII HERBA GERANII HERBA。

以种名命名：为习惯用法，应少用。如：石榴皮 GRANATI PERICARPIUM。

以有代表性的属种名命名：同属几个品种来源同作一个药材使用，但又不能用属名作药材的拉丁名时，则以有代表性的一个属种名命名。如：辣蓼，有水辣蓼 *Polygonum hydropiper* L.与旱辣蓼 *Polygonum flaccidum* Meissn.两种；而蓼属的药材还有何首乌、水炭母等药材，不能以属名作辣蓼的药材拉丁名，而以使用面较广的水辣蓼的学名为代表，定为 POLYGONI HYDROPIPERIS HERBA。

国际上已有通用的名称作拉丁名的药材，且品种来源与国外相同的，可直接采用。如：全蝎 SCORPIO，不用 BUTHUS。

（二）饮片命名

饮片系指药材经过净制、切制或炮制后的加工品，其名称应与药材名称相对应。

净制、切制的生用饮片，按原药材命名；特殊管理的毒性药材，在名称前应加“生”字，如：生草乌、生天南星等；鲜品饮片在名称前应加上“鲜”字，如：鲜鱼腥草。

以炒、蒸、煨等方法炮制的饮片，在药材名前冠以炮制方法或后缀以炮制后的形态名。加辅料炮制的饮片，应冠以辅料名。如：炒山楂（炮制方法）、地榆炭（炮制后的形态名）、酒白芍（冠以辅料名）。

（三）提取物命名

中药提取物系指净药材或炮制品经适宜的方法提取、纯化制成的供中药制剂生产的原料。

提取物的名称一般以药材名称加提取物构成。必要时标注用途、工艺、有效成分含量。如：连翘提取物。

已提纯至某一类成分的应以药材名加成分类别命名，必要时可以加副名。如：穿心莲内酯。

（四）成方制剂命名

成方制剂系指以药材、饮片或中药提取物及其他药物，经适宜的方法制成的各类制剂。成方制剂名称包括中文名、汉语拼音名，单味制剂应有拉丁名。

1. 成方制剂中文名

成方制剂中文名称中应明确剂型类别，一般放在名称后部。

不应采用人名、地名、企业名称。

不应采用名人名字等固有特定含义名词的谐音。

不应采用夸大、自诩、不切实际的用语。如“宝”、“灵”、“乐”、“必治”、“速效”、“特效”等。

不应采用封建迷信色彩及不健康内容的用语。

一般不采用“复方”二字命名。

一般字数不超过8个字。

2. 单味制剂的命名

单味制剂一般应采用药材、饮片或中药提取物加剂型命名。如“柴胡注射液”。

含提取物单味制剂的命名，必要时可用药材拉丁名或其缩写命名。

3. 复方制剂的命名

根据处方组成的不同情况可按下列方法命名：

采用处方主要药材名称的缩写并结合剂型命名，药材名称的缩写不能组合成违反其它命名要求的含义。如由苍术、木香、黄连三味药材组成的制剂可命名为“苍术香连散”。

采用主要药材名和功能结合并加剂型命名。如“龙胆泻肝散”等。

采用处方中的药味数、药材名称、药性、功能等并加剂型命名。如“六味地黄散”。

源自古方的品种，如不违反命名原则，可采用古方名称。如“四逆汤”。

某一类成分或单一成分的复方制剂的命名，应采用成分加剂型命名。

采用主要功能加剂型命名。如“止痢散”。

采用药味数与主要药材名或药味数与功能并结合剂型命名。如“七清败毒颗粒”。

采用象形比喻结合剂型命名。如“金锁固精散”，主治肾虚滑精，形容固精作用像金锁一

样。

必要时可加该药临床所用的对象。如“健猪散”。

必要时可在命名中加该药的用法。如“擦疥散”。

4. 中药与其它药物组成的复方制剂的命名，应符合中药复方制剂命名基本原则，兼顾其它药物名称。

5. 成方制剂的汉语拼音命名

按照中国文字改革委员会的规定拼音，第一个字母须大写；药名较长的按音节尽量分为两到三组拼音，每一组拼音第一个字母须大写。如“泰山盘石散（Taishan Panshi San）”。

6. 兽用中药注射剂命名。粉针剂称为“注射用×××”，液体针剂称为“×××注射液”。

7. 提取物制剂命名。一般以“药材名+剂型”或“成分+剂型”进行命名。

附件 26

兽用中药、天然药物质量控制研究技术指导原则

一、概述

兽药质量控制是贯穿于兽药研发、生产、贮运全过程的系统工程，需要从原料、工艺、质量标准、稳定性、包装等多方面进行研究。

为了保证兽用中药、天然药物质量的稳定、可控，有效控制原辅料、中间体及最终制成品的质量，特制定兽用中药、天然药物质量控制研究技术指导原则。

兽用中药、天然药物的质量控制研究的基本内容包括：处方及原料、制备工艺、质量研究及质量标准、稳定性研究等。

鉴于中药自身成分的复杂性，提倡对具体问题做具体分析，鼓励根据自身产品的特点进行有针对性的研究。

二、处方及原料

（一）处方中的药材应符合法定药材标准的要求。若无法定标准的药材，应研究建立相应的药材标准，并附鉴定报告。新的药用植物，其基原鉴定需国家级植物研究单位出具鉴定报告。

（二）处方中的提取物应符合法定标准的要求。如无法定提取物标准，则应建立相应的提取物标准。

（三）中西复方制剂处方中的化学药品应符合法定标准，并应使用合法来源的原料。

（四）处方中含有毒性药材时，应根据处方量和制成总量进行折算，将折算后的用量与毒性药材法定标准中规定的日用剂量比较，若超过剂量的，应提供相关研究及文献资料说明其安全性。

（五）已有国家标准更改剂型的，其处方药味、处方剂量比例应当与国家标准一致。

（六）所用药材应尽可能明确品种、产地等。

三、制备工艺

（一）应按照《兽用中药、天然药物制剂研究技术指导原则》、《兽用中药、天然药物提取纯化工艺研究技术指导原则》、《兽用中药、天然药物中试研究技术指导原则》等指导原则进行研究。

（二）应进行至少 3 批、1000 个制剂单位的 10 倍以上的中试试验，以考察中试放大规模后工艺的稳定性及可操作性，并提供相应中试试验和检测数据，以反映工艺放大后的基本情况。

（三）所用辅料应符合药用辅料标准要求。如辅料的使用对其安全性或有效性可能产生较大影响的，应提供研究资料，以证实其安全性或有效性。

（四）工艺无质的改变的产品，其生产工艺应与国家标准基本一致，并不得变更工艺路线等工艺参数和制成品量。

四、质量研究及质量标准

（一）质量研究的文献资料

应提供处方中各药味所含主要化学成分，特别是主要药效成分的相关文献资料，内容包括主要成分或类别成分的理化性质、鉴别、检测方法及含量测定等内容。

（二）质量研究的试验资料

质量研究的试验资料包括原辅料质量研究和制剂质量研究两部分。

1. 原辅料质量研究的试验资料

原料质量研究包括来源及鉴定依据、有效部位筛选、产地加工、性状、组织特征、理化性质、鉴别、检查、含量测定等研究资料（方法、数据、图片和结论）及文献资料。提取物还应包括工艺筛选研究。法定标准中收载的品种，应符合相关标准规定；无法定标准的，应研究建立相应的标准，其标准应符合《中国兽药典》现行版的格式。毒性药材用量和涉及濒危物种药材的使用应符合国家的有关规定。

辅料的研究包括理化性质、用量、质量要求及相容性研究等。

2. 制剂质量研究的试验资料

制剂质量研究的试验内容包括制剂的性状、鉴别、检查、浸出物或含量测定等，资料中应将研究的结果写明。

（三）质量标准草案及起草说明

一个科学、完整的兽药质量标准应能全面地反映兽药评价的各个方面，除药学评价的结果外，药理学、毒理学、药物动力学以及临床试验的资料都是制定兽药质量标准草案的重要依据，是多种学科研究工作的综合，包括质量规格、检测方法和临床应用等方面。

1. 质量标准制定前提

安全、有效是兽药成立的前提，必须在研究成熟后的处方、原辅料及制备工艺的条件下，制备中试产品，进行质量研究和制定标准，因此制定标准有以下三个先决条件：

（1）处方固定

在制定质量标准之前，必须要求处方固定，各原料的数和量，确实无误，毫无保留，才可以进行质量标准的研究和实验设计。

（2）原料（药材、饮片、提取物）及辅料稳定

药材除药用部位、产地、采收和加工涉及质量优劣外，重要的是药材的真伪与地区习惯用药品种的鉴别与应用。

（3）制备工艺稳定

2. 质量标准内容及起草说明

（1）原料药的质量标准及起草说明

原料药质量标准应包括名称、汉语拼音、药材拉丁名、来源、性状、鉴别、检查、浸出物、含量测定、炮制、性味与归经、功能、主治、用法与用量、注意及贮藏等项。书写格式与术语参

照现行版《中国兽药典》。如国家标准或省、市、自治区标准有收载者，应写明其基原、药用部位、主要产地及引用标准来源等。药材来源应包括原植（动、矿）物的科名、中文名、拉丁学名、药用部位、采收季节和产地加工等，矿物药应包括矿物的类、族、矿石名或岩石名、主要成分及产地加工。药材均应固定其产地。原植（动、矿）物需经有关单位鉴定。性状包括药材的外形、颜色、表面特征、质地、断面及气味等描述，一般以完整的干药材为主，易破碎的还须描述破碎部分。检查包括杂质、水分、灰分、酸不溶性灰分、重金属、砷盐、农药残留量、有关的毒性成分等项目。炮制应制订合理的加工炮制工艺，明确辅料用量和炮制品的质量要求。鉴别、含量测定同制剂鉴别、含量测定项。

起草说明应说明制订质量标准中各个项目的理由，规定各项目指标的依据、技术条件和注意事项等，既要有理论解释，又要有实践工作的总结及试验数据。

（2）制剂的质量标准及起草说明

拟定的质量标准应确实反映和控制最终产品质量。其内容一般包括中文名称、汉语拼音、处方、制法、性状、鉴别、检查、浸出物、含量测定、功能、主治、用法与用量、注意、规格、贮藏、有效期等项目。书写格式与术语参照现行版《中国兽药典》。

起草说明应对标准草案中所设定项目的研究方法与方法验证等内容进行说明。包括制定各个项目的理由，规定各项目指标的依据、技术条件和注意事项等。具体内容涉及到实验原理解释、试验数据的获得和实验结果的评述等。具体要求如下：

①名称：应按《兽用中药、天然药物通用名称命名指导原则》进行。

②处方：应列出全部药味和用量，全处方量应以制成 1000 个制剂单位的成品量为准。药味的排列顺序应根据组方原则按君、臣、佐、使顺序或重要性的顺序排列。炮制品需注明。兽药典未收载的炮制品，应说明炮制方法，明确辅料用量和炮制品质量要求。

③制法：应写明制备工艺的全过程，列出关键工艺的技术条件、参数及技术要求等。主要叙述处方共多少味、各药味处理的关键工艺及与质量控制相关的参数，如浸膏的相对密度、辅料的名称、用量和标准、制成品的总量等。起草说明中应描述详细的操作过程；说明关键工艺的各项技术指标和关键半成品的质量标准，及确定最终制备工艺及其技术条件的理由。

④性状：一般应描述剂型及除去包装或包衣后的色泽、形态、气味等。注射剂应描述颜色、状态等物理性状。注射剂由于其原料的影响，允许有一定的颜色，但同一批号成品的颜色必须保持一致；在不同批号的成品间，应控制在一定的色差范围内，注射剂的颜色不宜过深，以便于澄明度检查。

⑤鉴别：鉴别方法包括显微鉴别（组织切片、粉末）、理化鉴别、光谱鉴别、色谱鉴别等。要求专属性强、灵敏度高、重现性较好。显微鉴别应突出描述易察见的特征。理化、光谱、色谱鉴别，叙述应准确，术语、计量单位应规范。色谱法鉴别应选择适宜的对照品或对照药材。可根据处方组成及研究资料确定建立相应的鉴别项目，原则上应对处方中的所有药味进行鉴别研究，研究建立具有专属性的鉴别项，特别首选君药、贵重药、毒性药及混淆品较多的药味，对处方中

用量小或者干扰大，而不能检出者应用实验结果予以说明。重现性好、确能反映组方药味特征的特征色谱或指纹图谱鉴别也可选用。

起草说明应说明鉴别方法的依据及试验条件的选定（如薄层色谱法的吸附剂、展开剂、显色剂的选定等），理化鉴别和色谱鉴别应列出阴性对照试验结果，以证明其专属性，并提供3批以上样品检测结果，以证明其重复性。鉴别方法与所鉴别的对象一一对应，并做详细说明。兽药典未收载的试液，应注明配制方法及依据。显微鉴别应附粉末特征图谱，薄层色谱应附彩色图片，光谱、色谱等应附图谱，图谱、彩色图片应清晰、真实。特征图谱或指纹图谱需有足够的实验数据和依据，确认其可重复性。色谱鉴别所用对照品及对照药材，应符合标准物质研究技术要求。

⑥检查：应说明各检查项目的理由及其试验数据，阐明确定该检查项目限度指标的意义及依据，并制订相应的限量范围。对制剂中的重金属、砷盐也应进行检查。工艺中使用了第一、二类有机溶剂的，应建立相应有机溶剂残留量检查项。注射液除按《中国兽药典》现行版附录注射剂项下规定的检查项目进行检查外，还应根据不同给药途径的要求，对颜色、pH值、蛋白质、鞣质、树脂、草酸盐、钾离子、热原、重金属、砷盐、炽灼残渣、水分、异常毒性、溶血试验、刺激性试验、过敏试验、总固体量测定等项目进行相关的研究考察。

⑦浸出物：根据所含化学成分及指标性成分建立浸出物测定方法和限度。应说明规定该项目的理由，所采用溶剂和方法的依据，列出实测数据，各种浸出条件对浸出物量的影响，制订浸出物限度的依据，并提交试验数据。

⑧含量测定：应建立处方中主要药味所含成分的含量测定项目，优先研究处方中君臣佐使所含成分、已知有效成分的含量测定方法，并进行方法学考察，根据实验检测结果制定合理的含量限度。一般应对处方中主药、贵重药等制订相应的含量测定项目。含有毒性药（如马钱子等）的制剂，应建立含量测定方法和含量限度。对于既是毒性成分又是有效成分的含测指标，应规定含量范围（制订上下限）。中西复方制剂中的化学药物应建立含量测定方法。有效部位制剂，一般应建立有效部位及主要代表成分的含测方法，并规定有效部位的含量范围。有效成分制剂，应明确有效成分的标示量，规定其含量范围。其含量限度应依据至少10批、20个样品的检测结果、药材的含量状况、稳定工艺条件下的转移率、稳定性研究结果的含测数据等进行确定。必要时可在质量标准中建立多个含测指标，以提高产品质量的可控性。含量测定方法的线性关系、精密度、重现性和回收率试验等应遵循《兽用中药、天然药物质量标准分析方法验证指导原则》。

亦可建立相应的图谱测定或生物测定等其他方法进行质量控制。

起草说明中应说明含量测定对象和测定成分选择的依据。根据处方工艺和剂型的特点，选择相应的测定方法，并阐明含量测定方法的原理，确定该测定方法的方法学参考资料和相关图谱。含量测定所用标准物质应符合要求。

⑨功能、主治、用法与用量、注意、贮藏及有效期等：根据制剂的研究资料，叙述其需要说明的问题，包括各种禁忌、孕畜、幼畜及其他疾患的禁忌等。

⑩规格：制剂单位的重量、装量或标示含量等。

3. 标准物质内容及要求

质量标准中所需标准物质，如为现行国家标准收载并由中国兽医药品监察所或中国药品生物制品检定所提供者，可直接按类别采用，但应注明所用标准物质的批号、类别等。其它来源的品种则应按以下要求提供材料和标准物质标定方法，并报中国兽医药品监察所审核确认。

(1) 对照品

①来源：由植、动物提取的需要说明原料的科名、拉丁学名和药用部位及有关具体的提取、分离工艺、方法；化学合成品注明供应来源及其工艺方法。

②确证：验证已知结构的化合物需提供必要的参数及图谱，并应与文献值或图谱一致，如文献无记载，则按未知物要求提供足以确证其结构的参数。如元素分析、熔点、红外光谱、紫外光谱、核磁共振谱、质谱等。

③纯度：化学对照品应进行纯度检查。纯度检查可依所用的色谱类型，如为薄层色谱法，点样量应为所适用检验方法点样量的 10 倍量，选择三个以上溶剂系统展开，并提供彩色照片。色谱中应不显杂质斑点。

④含量：含量测定用对照品，含量（纯度）应在 98% 以上，供鉴别用的化学对照品含量（纯度）应在 90% 以上，并提供含量测定的方法和测试数据及有关图谱。

⑤稳定性：依法定期检查，申报生产时，提供使用期及其确定依据。

⑥包装与贮藏：根据稳定性试验结果确定贮藏条件。

(2) 对照药材

①品种鉴定：经过准确鉴定并注明药材来源，多品种来源的对照药材，须有共性的鉴别特征。

②质量：选定符合国家兽药标准或药品标准规定要求的优质药材。

③均匀性：必须粉碎过筛，取均匀的粉末分装应用。

④稳定性：应考察稳定性，提供使用期及其确定依据。

⑤包装与贮藏：置密闭容器内，避光、低温、干燥处贮藏。

(3) 标准物质使用说明

对照品应注明中英文名称、分子式、批号、使用期及适用于何种检测方法，含量测定用化学对照品应注明含量。对照药材应注明中文名、拉丁学名、批号、使用期及贮存条件。

五、制剂稳定性试验要求

兽药稳定性是兽药质量的重要评价指标，是确定兽用中药、天然药物制剂有效期的主要依据。考察制剂稳定性的指标为该制剂所建立的质量标准中的性状、鉴别、检查、浸出物、含量测定、卫生学检查等项目，必要时可根据需要增加敏感的考察指标，以全面反映产品的稳定性。稳定性考察样品应采用中试生产的样品、拟上市的包装。稳定性试验设计、研究方法应按照《兽用中药、天然药物稳定性试验技术指导原则》进行。有效成分制剂或所含有效成分对光、热、湿敏感的制剂，应进行稳定性影响因素试验，以全面考察产品对光、热、湿等的稳定性，为包装材料

料、贮存条件选择提供依据。产品的有效期、贮存条件，以稳定性研究结果确定。

附件 27

奶牛乳头消毒剂安全性和有效性试验技术指导原则

一、概述

奶牛乳头消毒剂安全性和有效性试验旨在推荐使用条件下，评价奶牛乳头消毒剂对奶牛乳头皮肤的刺激性，以及预防奶牛乳房炎的有效性。

本指导原则适用于奶牛乳头消毒剂。

二、安全性试验（即乳头皮肤刺激性试验）

应在自然条件下通过乳头皮肤刺激性试验评价拟上市奶牛乳头消毒剂的安全性。

（一）试验动物

1. 动物选择标准

选择 4 个乳区均完整、健康的初产奶牛和经产奶牛，应详细记录每头试验牛年龄、胎次等信息。

2. 动物数量

可用于统计分析的初产奶牛和经产奶牛至少各 6 头（共计 48 个乳区）。

（二）受试药物

受试药物应与拟上市的制剂完全一致，有完整的产品质量标准草案及符合规定格式的说明书草案，经检验合格后方可用于试验。

（三）试验分组

可仅设置受试药物组。

（四）给药

按照正常挤奶操作流程在每次挤奶前和/或挤奶后，根据受试药物推荐的用法与用量使用。

（五）观察指标和时间

每日观察试验牛乳头健康情况及整体临床表现，如有异常，应详细记录。至少应在第 1 天、第 14 天和第 28 天的给药前进行乳头皮肤评分，评分标准可参考表 1。

表 1 乳头皮肤评分表

参数	乳头状况	分值
皮肤干燥度（上杯前评估）	光滑	0
	轻度粗糙	1
	非常粗糙	2
皸裂（上杯前评估）	无	0
	轻度	1
	严重或多处皸裂	2
红斑和结痂形成（脱杯后评估）	无红斑	0
	极轻微红斑（隐约可见）	1
	边界清楚的红斑	2
	中度至重度红斑	3
	重度红斑（紫红色至轻微焦痂形成）	4
水肿形成（脱杯后评估）	无水肿	0
	极轻微水肿（隐约可见）	1
	轻微水肿（通过明确的凸起界定边缘或区域）	2
	中度水肿（凸起约 1mm）	3
	重度水肿（凸起超过 1mm 并超出暴露区域）	4

（六）结果评价

评估试验前和试验期间奶牛整体临床表现。对乳头皮肤评分数据进行统计分析，将第 14 天和第 28 天的数据分别与第 1 天的数据进行比较，根据统计结果判定奶牛乳头消毒剂对奶牛乳头皮肤的安全性（刺激性）。如果产品可能用于低温地区，应在相应的田间条件下开展相应评价试验。

（七）试验报告

按照《兽药临床试验质量管理规范》要求撰写试验报告。

应提供试验牛基础信息及观察指标的详细数据；证明试验期间挤奶设备功能正常的资料，以及试验期间当地气候环境条件资料。

三、有效性试验

应在田间条件下对拟上市的奶牛乳头消毒剂进行预防奶牛乳房炎有效性评价。

（一）试验动物

1. 动物选择标准

对目标牛群进行调查和检查，选择胎次、泌乳阶段、产奶量、乳区健康状况（体细胞计数、感染情况）等基础信息清晰的初产奶牛和经产奶牛，应排除试验前一个月内发生过临床型乳房炎及使用过相关药物的奶牛。应详细记录每头试验牛的基础信息。

2. 动物数量

每组初产奶牛和经产奶牛至少各 60 头。

（二）试验药物

1. 受试药物

同安全性试验。

2. 对照药物

对照药物应为我国批准上市、与受试药物作用相似的兽药，经检验合格后方可用于试验。

（三）试验分组

一般设置受试药物组、对照药物组。

（四）给药

根据牧场挤奶程序，按照正常挤奶操作流程在每次挤奶前和/或挤奶后，根据药物推荐的用法与用量使用。连续给药至少 12 周。

（五）观察指标和时间

1. 临床观察

试验期间应每日观察试验牛乳房健康情况及整体临床表现，如有异常，应详细记录。

临床型乳房炎的判定方法：眼观乳汁异常和/或乳区有炎症表现，则判定为临床型乳房炎。

应在给药前、给药后至少每 4 周一次，对每个乳区进行乳头皮肤评分，评分标准可参考上表（表 1）。

2. 采样与实验室检查

应在给药前及给药后至少每 2 周一次采集奶样，每个乳区采集平行样本送至实验室保存，分别用于体细胞计数和细菌分离培养。使用精确方法检测每个乳区的体细胞计数，将体细胞计数 ≥ 10 万个/ml 的初产奶牛乳区和体细胞计数 ≥ 20 万个/ml 的经产奶牛乳区奶样进行微生物培养和鉴定。

对于患临床型乳房炎的乳区，应当在使用抗菌药治疗前采集奶样，进行微生物培养和鉴定。

3. 新发乳区感染判定

满足下列条件之一者，应判定为新发乳区感染：

- （1）治疗期间发生临床型乳房炎；
- （2）培养检测到新的病原微生物，且初产奶牛乳区体细胞计数 ≥ 10 万个/ml 或经产奶牛乳区体细胞计数 ≥ 20 万个/ml。

（六）伴随治疗

试验期间发生感染需使用抗菌药治疗的试验牛应作详细记录，如为乳区感染，结果记录为新发乳区感染。治疗牛退出试验，退出前数据仍需纳入有效性或安全性统计分析。

（七）结果评价

以新发乳区感染率作为主要药效评价指标，以临床型乳房炎发病率、病原微生物检出情况、乳头皮肤评分作为次要药效评价指标。将试验组与对照组的各药效评价指标进行统计分析，确定奶牛乳头消毒剂的有效性。

（八）试验报告

按照《兽药临床试验质量管理规范》要求撰写试验报告。

应提供试验牛基础信息及各药效评价指标的详细数据；证明试验期间挤奶设备功能正常的资料，以及试验期间当地气候环境条件资料。

四、术语

乳房炎（Mastitis）：通常是由一种或多种病原微生物感染引起的乳腺组织炎症，以乳腺上皮细胞发生病理学改变为特征，继而出现炎性反应和乳汁变性，感染乳区白细胞增多。

临床型乳房炎（Clinical mastitis）：奶牛乳汁性状改变（凝乳块或絮状物、水样外观、颜色变化），一个或多个乳区有临床症状（肿胀、发热、疼痛、潮红），并可能伴有全身性症状（发热、食欲减退）的乳房炎。

亚临床型（隐性）乳房炎（Sub-clinical mastitis）：有病原微生物感染、无临床症状的乳房炎，乳汁理化性质发生变化，乳中体细胞计数显著升高，培养存在病原微生物。

体细胞计数（Somatic cell count, SCC）：每毫升乳汁中体细胞的数量，体细胞主要包括白细胞、上皮细胞和少量其他细胞。体细胞计数是奶牛乳房健康状况的重要指标，当奶牛乳房受到病原微生物感染或发生炎症时，体细胞计数显著升高。

新发乳区感染（New intramammary infection, NIMI）：健康乳区因病原微生物（如细菌）入侵乳腺组织导致的首次感染或细菌学治愈后感染新的病原微生物。通常伴随体细胞计数升高，且可以通过临床表现或微生物培养来确诊。

五、参考文献

1. National Mastitis Council. National Mastitis Council Guidelines: Testing of Teat Disinfectants for Efficacy in Preventing Intramammary Infections, 2016.
2. National Mastitis Council. Guidelines for Evaluating Teat Skin Condition, 2007.
3. FDA/CVM GFI#50 Target Animal and Human Food Safety, Drug Efficacy, Environmental and Manufacturing Studies for Teat Antiseptic Products, 2021.
4. Mein G A, *et al.* Evaluation of Bovine Teat Condition in Commercial Dairy Herds: 1. Non-Infectious Factors, 2001.
5. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Guidelines for Data to Support Efficacy and Safety of Teat Disinfectants, 2020.

附件 28

兽用内服制剂适口性试验技术指导原则

一、概述

兽用内服制剂适口性试验是在田间试验过程中评价靶动物经内服途径给药时受试药物适口性的方法。应按照兽药临床试验质量管理规范（兽药 GCP）要求进行适口性评估。本指导原则旨在为兽用内服剂型的适口性研究提供试验设计、实施和评价方法建议。

本指导原则适用于评价以下兽用内服制剂适口性。

声称具有适口性的新兽药、对现有兽药处方作出改变且旨在改善适口性的兽药，以及仿制声称具有适口性的兽药。如果仿制兽药在原辅料种类和质量上与原研药相当，且申请人能够证明处方差异不会对适口性产生影响，则可免于开展此研究。

二、试验设计

（一）试验动物

1. 受试动物 应与申报兽药适用的靶动物条件一致，且所申请的适应证不影响适口性判定。
2. 数量 适口性研究可作为田间试验的一部分，动物数量需符合田间试验要求。若单独开展，单次给药试验的每组动物总数不少于 50，多次给药试验的每组动物总数不少于 25。
3. 入选标准 试验动物入选前经临床兽医检查味觉、嗅觉、咀嚼能力应无明显异常，若适口性研究作为田间试验的一部分，还应符合田间试验动物入选标准。
4. 排除标准 试验前两周内给予同类药物治疗的动物不应入选。味觉、嗅觉、咀嚼能力有异常的动物，存在影响适口性判定的患病动物不应入选。
5. 剔除标准 因伴发其他疾病影响消化道功能或需要联合用药且影响适口性评估的动物应予以剔除。

（二）受试药物

受试药物应与田间试验样品的相关要求一致。

（三）试验分组

应根据标签说明书中拟采用的给药方式开展试验，可分别按照单独投喂给药、饮水或拌料给药开展。单独投喂给药试验可仅设置受试药物组；饮水或拌料给药试验可设不给药对照组（阴性对照组）或药物对照组（阳性对照组）和受试药物组。

（四）给药方案

试验开始前应将试验动物置于相同条件下正常喂养，不得在试验前禁食或禁水。

1. 单独投喂给药

受试药物应按拟推荐的用法用量给药，包括给药方法、给药剂量、多次给药的时间间隔等。受试药物不应与食物同时服用，避免试验结果受进食影响。

将受试药物置于食具中（视动物种属行为而定），评估动物在给药后 1 分钟内的自愿接受程度，如给药失败，可用手再喂食 1 分钟，总投喂时间不超过 2 分钟。试验中可根据动物种属和药物剂型（如溶液、糊剂、粉剂、片剂等）对以上给药方式进行适当调整，动物个体间应保持一致。

2. 饮水或拌料给药

应估算确保药物可全部被摄入的最低饮水量或饲料摄入量，并对受试药物组动物的饮水量或饲料摄入量与不给药对照组（阴性对照组）或对照药物组（阳性对照组）动物的饮水量或饲料摄入量进行比较，采用平行或交叉试验设计。

（五）试验周期

受试药物的给药天数至少应涵盖拟推荐给药疗程。对于说明书中建议连续给药超过 14 天的药物，本试验一般连续给药 7 天。如果说明书中建议给药间隔较长，如每月给药一次或两次，则至少给药两次。

（六）观察指标

1. 单独投喂给药

应观察动物对受试药物的接受程度，如在投喂时间（如给药后 2 分钟）内自愿全部摄入则定义为接受，记为给药成功。

如至少发生以下一种情况，则定义为不接受，记为给药失败：

- （1）虽然完全摄入，但摄入延迟（即超过 2 分钟）；
- （2）部分摄入；
- （3）反流或吐出药物；
- （4）拒绝摄入。

2. 饮水或拌料给药

应评估所有动物饮水量或饲料摄入量的基础水平和给药后水平。在整个试验期间，对每个试验组动物饮水量或饲料摄入量进行不少于 3 次的重复测量，以准确评估摄入量及其变化的具体情况。对于单次给药产品，在保证受试动物安全条件下，可选择一定间隔时间进行至少 3 次重复测量。

（七）试验终点指标

1. 单独投喂给药

对给药成功和给药失败的发生率进行统计分析。

（1）试验主要终点以给药成功为基础，以个体动物为统计单位，计算各试验组总体自愿接受率，在整个时间段内按动物总数计算，公式如下：

每组总体自愿接受率（%）= 每组动物给药成功总次数 / 每组动物给药总次数 × 100%

（2）试验次要终点为每只动物在整个试验期间的个体自愿接受率，公式如下：

个体自愿接受率（%）= 每只动物给药成功次数 / 每只动物给药总次数 × 100%

应对整个试验期间每个时间点的平均自愿接受率进行计算。对于长期治疗，接受率随时间变化的情况揭示了给药方案的总体依从性。

2. 饮水或拌料给药

试验主要终点以动物房或畜舍为统计单位，计算每日平均饮水量或饲料摄入量。在不影响动物福利的前提下，也可对单独饲养的动物饮水量或饲料摄入量进行测量，同时以每日实际给药量和用药期间所有相关试验数据作为参考。

（八）结果评价

若试验结果证明受试药物具有适口性，则可在其说明书中注明本品具有适口性，若为仿制类产品，则可注明与原研药物适口性相当。

药物适口性试验结果评价标准如下：

1. 具有适口性

（1）单独投喂给药

给药后，受试组动物总体自愿接受率不小于 70%。

（2）饮水或拌料给药

若以个体动物为统计单位，则应确定组平均值，计算其差异的 95%置信区间，并将其与预先定义且合理的非劣效性界值进行比较，非劣效性界值小于等于对照组（阳性或阴性对照）平均值的 15%，即差异不显著记为给药成功。

若以动物房或畜舍为统计单位，则治疗组动物房或畜舍平均摄入量的 95%置信下限应高于阈值，该阈值为对照组（阳性或阴性对照组）内各动物房或畜舍平均摄入量的 95%。

2. 不具适口性

（1）单独投喂给药

给药后，受试动物总体自愿接受率小于 70%。

（2）饮水或拌料给药

若以个体动物为统计单位，非劣效性界值大于对照组（阳性或阴性对照）平均值的 15%，即差异显著记为给药失败。

若以动物房或畜舍为统计单位，治疗组动物房或畜舍平均摄入量的 95%置信下限应低于或等于阈值，该阈值为对照组（阳性或阴性对照组）内各动物房或畜舍平均摄入量的 95%。

三、试验报告

按照《兽药临床研究质量管理规范》要求撰写试验报告。

四、参考文献

EMA/CVMP/EWP/206024/2011 Rev.1. Guideline on the Demonstration of Palatability of Veterinary Medicinal Products, 2021.