

健康食品安全性評估方法

880802 衛署食字第 88037803 號公告

壹、前言

為評估健康食品之安全性，依健康食品管理法第三條第二項規定訂定本方法。本方法規定健康食品安全性評估資料及毒性試驗項目及方法。

貳、毒性試驗之規範

一、試驗操作規範

研發所需進行之非臨床試驗請參考衛生署 87 年 6 月 29 日公告之「藥品非臨床試驗優良操作規範」進行，並妥善保存所有觀察結果、原始數據及文書紀錄，以確保各項試驗數據之品質及試驗之完整性與可信度。

二、安全性評估之分類

健康食品之安全評估分為四個類別，主要係針對以往長期食用及製造加工之安全性作考量，故食用目的、方式、製造加工方法、流程、最終產品形式及攝食量等均為分類之考慮因素。各類之安全評估項目如下：

第一類：屬下列二種情形之一者，得免再進行毒性測試。

- (一) 產品之原料為傳統食用且以通常加工食品形式供食者。
- (二) 產品具有完整之毒理學安全性學術文獻報告及曾供食用之紀錄，且其原料、組成成分及製造過程與所提具之學術文獻報告完全相符者。

第二類：產品之原料為傳統食用而非以通常加工食品形式供食者，應檢具下列項目之毒性測試資料。

- (一) 基因毒性試驗
- (二) 28 天餵食毒性試驗

第三類：產品之原料非屬傳統食用者，應檢具下列項目之毒性測試資料。

- (一) 基因毒性試驗
- (二) 90 天餵食毒性試驗
- (三) 致畸試驗

第四類：產品之原料非屬傳統食用且含有致癌物之類似物者，應檢具下列項目之毒性測試資料。

- (一) 基因毒性試驗
- (二) 90 天餵食毒性試驗
- (三) 致畸試驗
- (四) 致癌性試驗
- (五) 繁殖試驗

三、毒性試驗之方法

毒性試驗之方法包括下列六項：

- (一) 基因毒性試驗
 - (二) 28 天餵食毒性試驗
 - (三) 90 天餵食毒性試驗
 - (四) 致畸試驗
 - (五) 致癌性試驗
 - (六) 繁殖試驗
- 基因毒性試驗(Genotoxicity study)

基因毒性試驗可分為體內(in vivo)與體外(in vitro)測試，其目的為偵測試驗物質直接或間接引發的基因傷害及程度。一般基因毒性試驗有助於預測試驗物質的致癌性，且有助於致癌性試驗的結果分析。試驗物質須進行三種以上的基因毒性測試，包括：微生物基因突變分析，體外哺乳類細胞基因毒性分析，及動物體內基因毒性分析。依試驗物質的性質可增加其他的基因毒性測試(說明 1)。

1、微生物基因突變分析

一般使用細菌基因突變測試法 (gene mutation in bacteria)。

(1) 菌株

需使用下列 5 種菌株：

1. *S. typhimurium* TA98
2. *S. typhimurium* TA100
3. *S. typhimurium* TA1535
4. *S. typhimurium* TA1537、TA97、或 TA97a
5. *S. typhimurium* TA102、*E. coli* WP2 uvr A、或 *E. coli* WP2 uvr A (pKM101)

註：4 與 5 所列之三種菌株，分別擇一使用。

(2) 劑量範圍

進行五個以上劑量組，最高劑量須足以產生明顯的毒性。毒性之產生可由初步試驗中逆突變的菌落 (revertants) 數量的減少測得。若試驗物質為高溶解度低毒性物質，最高劑量為 5 mg/plate，若試驗物質具有明顯的抗菌活性，則以產生抗

菌活性的劑量作為最高劑量。若試驗物質為低溶解度物質，則以產生最少沈澱物的濃度作為測試的最高濃度，但不超過 5 mg/plate。

(3) 對照組

對照組包含陰性對照組及陽性對照組(說明 2)。

(4) 代謝活化 (Metabolic activation)

進行含有及不含有 S9 混合物的測試(說明 3)。

(5) 測試方法

1. 前置培養法 (Preincubation method)， 或
2. 平板混合試驗法 (Plate incorporation method)

(6) 試驗結果

每盤培養皿中突變菌落的數量，須以各測試點之平均值，再以表格方式詳細記錄。

2、體外哺乳類細胞基因毒性分析

一般使用體外哺乳類細胞的染色體異常分析法 (In vitro Chromosomal aberration test with mammalian cells in culture) 或體外鼯鼠淋巴瘤 tk 分析法 (In vitro mouse lymphoma tk assay)。

(1) 體外哺乳類細胞的染色體異常分析法 (Chromosomal aberration test with mammalian cells in culture)

細胞

使用哺乳類細胞株或初代哺乳類細胞。

劑量範圍

進行三個以上劑量組，劑量間隔可為 2 倍或自然對數對半(half-log)。依據初步試驗結果決定最高劑量，以試驗物質會造成 50%以上之細胞生長抑制的濃度為最高劑量。若無觀察到細胞毒性，則以 5 mg/ml 或 10 mM (以較低者為準) 作為最高劑量。若試驗物質為低溶解度物質，則以產生最少沈澱物的濃度作為測試的最高濃度，但不超過 5 mg/ml 或 10 mM。

對照組

對照組包含陰性對照組及陽性對照組 (說明 2)。

代謝活化

進行含有及不含有代謝活化系統的測試，如 S9 混合物 (說明 3)。

實驗步驟

- i. 細胞在試驗物質處理後之適當時機，製備染色體玻片。由於試驗物質可能會造成細胞週期延長，故須在一個適當間隔製備檢品。
- ii. 每個劑量組製備兩片玻片，每片至少觀察 100 個分裂中期細胞，檢查染色體結構變異與多套染色體 (polyploid) 的數目。在描述細胞形態異常時，須註明染色體或染色分體的結構變異種類。

試驗結果 以表格方式描述染色體變異的種類及數量，並計算含染色體結構變異細胞之頻率。(2) 體外鼯鼠淋巴瘤 tk 分析法

細胞

使用 L5178Y TK+/- 小鼠淋巴瘤細胞株。

劑量範圍

進行三個以上劑量組，劑量間隔可為 2 倍或自然對數對半。

依據初步試驗結果決定最高劑量，以試驗物質會造成 80% 以上之細胞死亡的濃度為最高劑量。若無觀察到細胞毒性，則以 5 mg/ml 或 10 mM (以較低者為準) 作為最高劑量。若試驗物質為低溶解度物質，則以產生最少沈澱物的濃度作為測試的最高濃度，但不超過 5 mg/ml 或 10 mM。

對照組

對照組包含陰性對照組及陽性對照組 (說明 2)。

代謝活化

進行含有及不含有 S9 混合物的測試 (說明 3)。

實驗步驟

- i. 細胞在試驗物質處理後之適當時機，清洗去除試驗物質後，細胞繼續培養以測定其存活率，同時使細胞表現因試驗物質引發之致突變表現型 (mutant phenotype)。
- ii. 細胞經過適當的培養時間 (足以表現引發之致突變表型)，細胞分別培養於含及不含嘧啶類似物培養液中，以測定其致突變數量 (numbers of mutants) 及細胞複製之效率 (cloning efficiency)。嘧啶類似物如 bromodeoxyuridine (BrdU)、fluorodeoxyuridine (FdU) 或 trifluorothymidine (TFT) 等。

試驗結果

以表格方式描述每劑量組之細胞突變及存活之數目，同時計算細胞之存活率、複製效率及細胞致突變之頻率。

3、動物活體基因毒性分析

一般使用齧齒類動物造血細胞的染色體傷害分析法 (In vivo test for chromosomal damage using rodent hematopoietic cells)。

(1) 動物

一般使用雄性小鼠。若雄性與雌性動物在代謝或毒性上有明顯的差異時，則須同時使用雄、雌動物進行試驗。若試驗物質為特別針對某種性別時，則應使用該性別動物進行試驗。

(2) 動物數量

每組至少五隻動物。

(3) 試驗物質給予途徑

以腹腔注射或強迫餵食給予。

(4) 劑量範圍

測試三個以上劑量組。

若試驗需要，可由短期試驗之單一（或重覆）劑量投予試驗物質決定最高容許劑量，最高容許劑量即該劑量可引發骨髓毒性或其他明顯之毒性症狀，如抑制體重增加等，一般以最高容許劑量作為最高劑量。

(5) 對照組

一般以試驗物質使用之溶劑作為陰性對照組，陽性對照組則給予會引發致突變物質。

(6) 試驗物質給予頻率

單一或重覆劑量均可。

(7) 測試方法

嚙齒類骨髓細胞染色體異常測試法 (Chromosomal aberrations in bone marrow cells of rodents)

嚙齒類骨髓細胞之微核測試法 (Micronuclei in bone marrow cells of rodents)

嚙齒類周邊血液之微核測試法 (Micronuclei in peripheral blood of rodents)

(8) 實驗步驟

嚙齒類骨髓細胞之染色體異常測試法

i. 經試驗物質處理的動物在適當時間犧牲，製備染色體玻片。由於試驗物質可能會造成細胞週期延長，故須在一個適當間隔製備檢品。

ii. 每個劑量組製備兩片，每片至少觀察 100 個分裂中期細胞，檢查染色體結構變異與多套染色體的數目。在描述細胞形態異常時，須註明染色體或染色分體的結構變異種類。

嚙齒類骨髓細胞或周邊血液之微核測試法

i. 經試驗物質處理的動物在適當時間犧牲，並製備骨髓或血液抹片。一般動物經試驗物質處理後一段時間（18 到 30 小時）即犧牲並收集檢品，或在 24 到 72 小時內進行多次採樣製作樣本。若試驗需要，可經由短期預備試驗結果，選擇反應最明顯的時間採樣。

ii. 每隻動物至少觀察 1000 個多染性紅血球 (polychromatic erythrocytes) 或網狀紅血球 (reticulocytes)，記錄微核發生的數目，同時計算多染性紅血球或網狀紅血球佔全部紅血球的比例。可採用 Giemsa 或 Acridine orange 螢光染劑之染色方法。可以觀察網狀紅血球的產生取代多染性紅血球。

(9) 試驗結果

嚙齒類骨髓細胞之染色體異常測試法

以表格方式描述染色體變異的細胞總數，或每個細胞變異的頻率。

嚙齒類骨髓細胞或周邊血液之微核測試法

以表格記錄多染性紅血球或網狀紅血球中微核發生的數目，及多染性紅血球或網狀紅血球佔全部紅血球的比例。說明

1. 基因毒性測試方法有：

(1) 以基因突變為參考指標的測試方法

1. Gene mutation test with bacteria

2. Gene mutation test with mammalian cells in culture
3. Test with *Drosophila melanogaster*
4. Spot test with mice
5. Specific locus test with mice

(2) 以染色體變異做為參考指標的測試方法

1. Chromosomal aberration test with mammalian cells in culture
2. Chromosomal aberration test with bone marrow cells of rodents
3. Micronucleus test with rodents
4. Chromosomal aberration test with genocytes of rodents
5. Dominant lethal test with rodents
6. Reciprocal translocation test with mice

(3) 以基因受損為參考指數的測試

1. Phage induction test with bacteria
2. DNA repair test with bacteria
3. Unscheduled DNA synthesis test (UDS) with mammalian cells
4. Sister chromatid exchange (SCE) test with mammalian cells

(4) 其他測試

1. Mitotic recombination and gene conversion test with yeast
2. Sperm abnormality test

2. 一般以試驗物質使用之溶劑作為陰性對照組，而陽性對照組則依試驗具代謝活化與否之測試，加入適當的致突變劑 (mutagens)。 3. 使用 S9 混合物 (S9 及 coenzymes 等)。 S9 製備方法為哺乳類動物 (鼠) 經藥物誘發代謝酵素處理後，自其肝臟萃取並經 9000 X g 離心而得的肝臟酵素。

(二) 28 天餵食毒性試驗(28-day feeding toxicity study)

28 天餵食毒性試驗之目的是測試試驗物質經重覆給予 28 天後對哺乳類動物可能產生之毒性影響，了解毒性變化之產生，同時測定無毒性顯示之劑量 (no-observed-adverse-effect level, NOAEL)。

1、動物品種及性別

齧齒類，最常使用的動物為鼠，雄、雌兩性動物的數量須相同，給予試驗物質之週齡為 5-6 週。

2、動物數量

每個劑量組使用雄、雌至少各 10 隻動物；若須進行試驗中期解剖或復原測試，動物數量須視解剖的次數適量增加。試驗終結需有足夠數量存活之動物以進行適當之毒性評估。

3、試驗物質給予途徑

一般採用胃管經口餵食(gavage)，必要時得混入飼料或飲水中。採用胃管經口餵食時之餵食體積應在 10 ml/kg 動物體重以下，若餵食體積過高，可採多次餵食方式，但須在 6 小時內完成。

4、試驗物質給予期間

每天固定時間給予試驗物質，連續 28 天。

5、劑量範圍

為使毒性試驗能夠顯示試驗物質的毒性影響，了解劑量與毒性間的關係，並預估無毒性顯示之劑量(NOAEL)。試驗中至少要有三個劑量組：(1) 高劑量為該劑量足以使試驗動物產生毒性症狀，但不造成死亡；(2) 低劑量為不會引起毒性的劑量；(3) 中間劑量為足以引起最低毒性作用（如血中酵素值改變或體重成長速度下降）。此外，還要包括載體對照組或空白對照組，若試驗需要可加入參考對照組。劑量選擇之依據應加以說明。

若試驗物質混入飼料或飲水中，則濃度不得超過 5% (w/w)。當以胃管強迫餵食，若在技術上可給予之最大劑量(但不得超過 1000 mg/kg)，而未顯現任何毒性徵兆，則以此劑量做為最高劑量。

6、觀察與檢驗

(1)臨床觀察

1. 每天觀察動物至少二次(兩次時間間隔不得少於六小時)，以確定死亡情形。
2. 每天觀察試驗動物的臨床症狀一次以上，記錄試驗動物顯示的毒性作用，包括作用之開始及過程。

(2) 體重與食物消耗量

定期測量動物的體重及食物消耗量。

1. 體重：試驗開始給予試驗物質前，測量動物體重；試驗期間每週至少測量一次。
2. 食物消耗量：試驗開始給予試驗物質前，測量食物消耗量；試驗期間每週至少測量一次。食物消耗量之測量可以每隻或每組為單位。

若試驗物質是以混入飼料或飲用水的方式給予，則須以每隻或每組為單位，定期測量飲食或飲水的消耗量，同時測量食物的掉落量，換算成實際的試驗物質消耗量。在試驗開始前及在適當時機進行試驗物質之穩定性與純度的量與質之測量。

(3) 臨床病理檢驗

1. 血液檢驗 (Hematology) 試驗動物須在試驗結束前採樣以進行血液檢驗，一般而言，全部動物均須進行血液檢驗，但可因實際情形考量，齧齒類動物每個劑量組至少選擇雄、雌各 10 隻動物進行檢測。血液檢驗項目應包括：hematocrit、hemoglobin、erythrocyte count、total and differential leukocyte counts 及凝血因子 (例如 clotting time、prothrombin time、activated partial thromboplastin time 或 platelet count) 等之測量。視試驗需要而定。
2. 血清生化檢驗 (Clinical Chemistry) 試驗動物須在試驗結束前採樣以進行血清生化檢驗。一般而言，全部動物均須進行血清生化檢驗，但可因實際情形考量，每個劑量組選擇雄、雌至少各 10 隻動物進行檢測。血清生化檢驗內容應包括電解質的平衡、醣類的代謝、及肝與腎功能等。血清生化檢測項目包含 alkaline phosphatase、alanine aminotransferase、aspartate aminotransferase、gamma-glutamyl transferase、albumin、bilirubin (total)、creatinine、urea nitrogen、glucose、phosphorus、calcium、chloride、potassium、sodium、protein (total) 等。
3. 尿液檢驗 (Urinalysis) 視試驗需要進行。每個劑量組選擇雄、雌至少各 10 隻動物，在試驗物質給予前後進行尿液檢驗一次以上。尿液檢驗項目：顯微鏡觀察尿沈渣，測量尿液之量、酸鹼值與比重，並測量尿液中之 protein、glucose、ketones、bilirubin 與 occult blood 等的含量。
4. 眼睛檢查 (Ophthalmological examination) 眼睛檢驗包括肉眼檢驗與鏡檢眼睛的外部及內部構造。最高劑量組及對照組的動物在試驗開始給予試驗物質前及試驗結束時進行眼睛檢查一次以上。若發現眼睛異常，則全部動物均須進行眼睛檢查。

(4) 組織病理檢驗

1. 試驗期間死亡的動物須儘快進行解剖，肉眼檢查器官與組織之變化。若許可，主要臟器分別稱重並進行組織病理檢查，以尋求死亡的原因及毒性變化的性質（如嚴重程度）。
2. 為獲得更充足的毒性資料，垂死的動物均行安樂死。動物在犧牲之前須記錄臨床觀察之結果，若許可，收集血液樣品以進行血液及血清生化分析。動物進行屍體解剖，以肉眼觀察其器官與組織，並進行組織病理檢驗，以了解毒性變化的性質（嚴重程度），若試驗需要，記錄主要臟器的重量。
3. 試驗(試驗物質給予期間) 結束，全部存活的動物行安樂死後，在剖檢前先收集血液樣品，以進行血液與血清生化分析。屍體解剖時，肉眼觀察及記錄動物的器官與組織之變化，並測量主要臟器重量。最高劑量組與對照組須進行組織病理檢驗，若最高劑量組中某種器官及/或組織發現病變現象，則全部動物的該器官及/或組織，及其他劑量組中發現任何組織病變，均應進行組織病理檢驗。
4. 一般器官與組織的組織病理檢驗及稱重之項目如下，但可依試驗性質之特性及肉眼檢查發現之異常變化而有所增減：
i. 臟器稱重：liver、adrenals、kidneys、gonad 等分別稱重。
ii. 組織病理檢驗：adrenals、heart、kidneys、liver、spleen、及目標器官。

(三) 90天餵食毒性試驗 (90-day feeding toxicity study)

90天毒性試驗之目的是測試試驗物質經重覆餵食90天後對哺乳類動物可能產生之毒性影響，且提供更長期試驗劑量設定之依據。

一般而言，試驗之期間為三個月，在試驗前須先進行一個月的短期重覆劑量毒性試驗。此短期試驗可為長期毒性試驗決定適當的劑量範圍，同時可了解該試驗物質的早期毒性變化，再配合長期毒性試驗的結果，則可了解該試驗物質的毒性影響。

1、動物品種及性別

啮齒類，最常使用的動物為鼠，雄、雌兩性動物的數量須相同，給予試驗物質之週齡為5-6週。

2、動物數量

每個劑量組使用雄、雌至少各10隻動物。若須進行試驗中期解剖或復原測試，動物數量須視解剖的次數適量增加。試驗終結需有足夠數量存活之動物以進行適當之毒性評估。

3、試驗物質給予途徑

一般採用胃管經口餵食(gavage)，必要時得混入飼料或飲水中。採用胃管經口餵食時之餵食體積應在 10 ml/kg 動物體重以下，若餵食體積過大，可採多次餵食方式，但須在 6 小時內完成。

4、試驗物質給予期間

每天固定時間給予試驗物質，連續 90 天。

5、劑量範圍

參考（二）5.28 天餵食毒性試驗之劑量範圍。

6、觀察與檢驗

(1) 臨床觀察

1. 每天觀察動物至少二次，以確定死亡情形。
2. 每天觀察試驗動物的臨床症狀一次以上，記錄試驗動物顯示的毒性作用，包括作用之開始及過程。若發現腫瘤生長，則記錄每個肉眼可觀察到或觸摸到的腫瘤發現時間、部位、大小、外觀及成長過程。並同時觀察動物行為的改變、自主官能管制失調、及其他神經系統毒性徵象。

(2) 體重與食物消耗量

定期測量動物的體重及食物消耗量。

1. 體重：試驗開始給予試驗物質前，測量動物體重；試驗期間每週至少測量一次。
2. 食物消耗量：試驗開始給予試驗物質前，測量食物消耗量；試驗期間每週至少測量一次。食物消耗量之測量可以每隻或每組為單位。若試驗物質是以混入飼料或飲用水的方式給予，則須以每隻或每組為單位，定期測量飲食或飲水的消耗量，同時測量食物的掉落量，換算成實際的試驗物質消耗量。在試驗開始前及在適當時機進行試驗物質之穩定性與純度的量與質之測量。

(3) 臨床病理檢驗

血液檢驗 (Hematology)

試驗動物須在試驗結束前採樣以進行血液檢驗，一般而言，全部動物均須進行血液檢驗，但可因實際情形考量，齧齒類動物每個劑量組至少選擇雄、雌各 10 隻動物進行檢測。血液檢驗項目應包括：hematocrit、hemoglobin、erythrocyte

count、total and differential leukocyte counts 及凝血因子 (例如 clotting time、prothrombin time、activated partial thromboplastin time 或 platelet count) 等之測量。視試驗需要而定。

血清生化檢驗 (Clinical Chemistry)

試驗動物須在試驗結束前採樣以進行血清生化檢驗。一般而言，全部動物均須進行血清生化檢驗，但可因實際情形考量，每個劑量組選擇雄、雌至少各 10 隻動物進行檢測。血清生化檢驗內容應包括電解質的平衡、醣類的代謝、及肝與腎功能等。

i. 血清生化檢測項目包含血清生化檢測項目包含 alkaline phosphatase、alanine aminotransferase、aspartate aminotransferase、gamma-glutamyl transferase、albumin、bilirubin (total)、creatinine、urea nitrogen、glucose、phosphorus、calcium、chloride、potassium、sodium、protein (total) 等。

ii. 若需更深入研究試驗物質之毒性機轉，其他生化分析方法可視試驗物質之特性及試驗需要列入，如 acid/base balance、cholinesterases、hormones、lipids、methemoglobin 等項目。

尿液檢驗 (Urinalysis)

視試驗需要進行。每個劑量組選擇雄、雌至少各 10 隻動物，在試驗物質給予期間進行尿液檢驗一次以上。

尿液檢驗項目：顯微鏡觀察尿沈渣，測量尿液之量、酸鹼值與比重，並測量尿液中之 protein、glucose、ketones、bilirubin 與 occult blood 等的含量。

眼睛檢查 (Ophthalmological examination)

眼睛檢驗包括肉眼檢驗與鏡檢眼睛的外部及內部構造。最高劑量組及對照組的動物在試驗開始給予試驗物質前及試驗結束時進行眼睛檢查一次以上。若發現眼睛的改變是因試驗物質引起，則全部動物均須進行眼睛檢查。

(4) 組織病理檢驗

試驗期間死亡的動物須儘快進行解剖，肉眼檢查器官與組織之變化。若許可，主要臟器分別稱重並進行組織病理檢查，以找出死亡的原因及毒性變化的性質 (如嚴重程度)。

為獲得更充足的毒性資料，垂死的動物均行安樂死。動物在犧牲之前須記錄臨床觀察之結果，若許可，收集血液樣品以進行血液及血清生化分析。動物進行屍體解剖，以肉眼觀察其器官與組織，並進行組織病理檢驗，以了解毒性變化的性質 (嚴重程度)，若試驗需要，記錄主要臟器的重量。

試驗 (試驗物質給予期或復原期) 結束，全部存活的動物行安樂死後，在剖檢前先收集血液樣品，以進行血液與血清生化分析。屍體解剖時，肉眼觀察及記錄動物的器官與組織之變化，並測量主要臟器重量。嚙齒類動物之最高劑量組與對照組須進行組織病理檢驗，若最高劑量組中某種器官及/或組織發現病變現象，則全部動物的該器官及/或組織，及其他劑量組中發現任何組織變化的組織，均應進行組織病理檢驗。

一般器官與組織的組織病理檢驗及稱重之項目如下，但可依試驗性質之特性及肉眼檢查發現之異常變化而有所增減：

- i. 臟器稱重：liver、brain、heart、adrenals、kidneys、及 gonads 等分別稱重。
- ii. 組織病理檢驗：adrenals、aorta、bone (sternum/femur)*、bone marrow (sternum/femur)、brain (at least 3 different levels)、small intestine (duodenum、ileum、jejunum)、large intestine (caecum、colon、rectum)、esophagus、eye(s)*、female mammary gland*、Harderian gland*、heart、kidneys、liver、trachea and lung(s)、lymph nodes (representative)、ovaries/ testes、pancreas、peripheral nerve、pituitary、prostate、salivary gland*、skin*、spinal cord (at least 2 different locations)、spleen、stomach、thigh musculature*、thymus (or thymic region)、thyroid/parathyroids、urinary bladder、uterus、accessory genital organs* and tissues showing gross lesions。

*視試驗需要才進行。

(四) 致畸試驗 (Teratogenicity)

致畸試驗係測試試驗物質對胚胎發育之影響、及造成畸胎之可能性，試驗物質給予週期為自胚胎著床至器官形成完全之階段，此階段為器官形成期。

1、動物品種

鼠、鼯鼠或兔子。

2、動物數量

若以鼠、鼯鼠進行試驗，每劑量組 20 隻動物以上，兔子則 12 隻以上 (說明 1)。

3、試驗物質給予途徑

採用胃管口服給予(gavage)，必要時得混入飼料或飲水中(說明 2)。

4、劑量範圍

進行三個以上劑量組 (說明 3)，及陰性對照組。視試驗需要可加入陽性對照組或參考性對照組 (說明 4)。

5、試驗物質給予途徑週期

在器官形成期間每天餵食。鼠、鼯鼠自懷孕的第 6 天到第 15 天；兔子自懷孕的第 6 天到第 18 天。

6、實驗步驟

(1) 試驗期間：

臨床觀察：每天觀察一次以上並記錄動物的死亡率、臨床症狀。動物體重：每週測量動物體重至少二次。食物消耗量：每週測量食物消耗量至少一次。

(2) 在分娩前一天（鼠在懷孕第 20 天，兔子則在懷孕第 29 天）全部雌性動物進行解剖，檢測其懷孕成功率、胎兒的死亡率、黃體數目等。存活的胎兒則進行體重測量並檢驗其外觀（說明 5），同時肉眼觀察雌性動物的器官與組織（說明 6）。若發現任何組織變化，保存其器官及對照組的相對器官，若試驗需要，可進行組織病理檢驗。

(3) 若為鼠/鼯鼠試驗，最高劑量組及對照組之雌性動物，每一胎中 1/2 的新生兒進行骨骼檢查，另 1/2 的新生兒進行內臟組織檢查，若最高劑量組發現異常現象，則全部動物均須進行組織與骨骼檢查。而兔子試驗則全部新生兒進行組織與骨骼檢查。

說明

1. 此處的動物數目是指懷孕成功的雌性動物。
2. 口服給予試驗物質可以強迫餵食、混入飼料或溶於飲用水中進食方式進行，但強迫餵食的方式較佳，因投予試驗物質質量準確，但給予之體積應在 10 ml/kg 動物體重以下，若給予體積過大，可採多次給予方式，但須在 6 小時內完成。
3. (1) 如有可能，最高劑量要能造成毒性症狀，如飲食量減低、體重增加、受到抑制或改變臨床病理參數。若試驗物質沒有顯示出毒性時，則以技術上可給予的最高劑量作為最高劑量。最低劑量則以對雌性動物或胚胎不產生不良影響之劑量，而中間劑量則取最高劑量與最低劑量之幾何平均值。(2) 劑量之選擇最好包括在動物活體中會產生功能的有效劑量。
4. 若給予試驗物質時，須使用媒介物或乳化劑，陰性對照組的動物則給予該媒介物或乳化劑。陽性對照組的動物一般給予會產生生殖毒性的物質，而參考性對照組動物則給予和試驗物質的化學結構或藥效類似的藥物。
5. 在懷孕後期仍存活的胎兒，須檢查其性別及體內、外之器官與組織的變化。骨骼與成骨經透明及染色處理製作成骨骼標本，以觀察其內部骨骼形態變化。若試驗需要，可進一步作組織或組織化學檢驗。

(五) 致癌性試驗(carcinogenicity study)

根據動物對感染性疾病的抵抗力、動物的生命期、先天性腫瘤自然發生率及動物對致癌性物質的敏感度，選擇適當的試驗動物品種，初步及長期致癌性試驗須使用相同的動物品種。

1、初步致癌性試驗

本試驗的目的是決定長期致癌性試驗的劑量範圍，若已有充足的有效數據，則以下試驗可部分或全部刪除：

(1)單一劑量毒性試驗

此試驗的目的是以少量的動物決定重覆劑量毒性試驗的最高劑量，詳細試驗方法可參閱本節末之口服急性毒性試驗方法。

(2)重覆劑量毒性試驗

此試驗的目的是決定長期致癌性試驗的最高劑量，詳細試驗方法可參考(三)90天餵食毒性試驗方法。

1. 動物品種 使用兩種以上齧齒類動物，雄、雌兩性並用(說明 2)。
2. 動物數量 每個劑量組使用雄、雌動物各 10 隻或以上。
3. 試驗物質 給予途徑 口服給予(說明 3)。
4. 劑量範圍 每個性別進行 3 個以上劑量組及對照組(說明 4、5)。
5. 試驗物質給予週期 給予試驗物質連續三個月以上，每週給予 7 天(說明 6)。若試驗動物具遲發毒性或累積效應的特性，則須延長給予的時間。
6. 試驗步驟 i.每天觀察動物二次以上，以確定死亡情形。 ii.每天觀察與記錄所有動物的臨床症狀一次以上。 iii.每週測量體重一次以上。 iv.試驗期間死亡或在試驗終結行安樂死的動物均應解剖，並以肉眼檢查器官與組織之變化，發生病變之器官及組織須進行組織病理檢查。
7. 試驗結果 i.估算最高容許劑量(Maximum Tolerated Dose, MTD) (說明 7)，而 MTD 值之決定，依據初步致癌性試驗中，該劑量可抑制動物體重成長速率(與對照組比較)下降 10%以內，但不會造成動物死亡，或器官重量、血液檢驗、尿液檢驗、臨床生化檢驗等參數改變，而且肉眼觀察或組織病理亦無明顯變化。 ii.最高劑量須依動物性別與品種加以決定。

2、長期致癌性試驗

(1)動物品種

使用兩種以上的齧齒類動物，雄、雌兩性並用(說明 2)。

(2)動物數量

每組使用雄、雌動物各 50 隻或以上。若須進行試驗中期解剖，動物數量須視解剖的次數適量增加，而每次試驗中期解剖，每組雄、雌各 10 隻或以上。動物的分組應以動物體重分類，再以適當的隨機取樣方法分配。

(3) 試驗物質給予途徑

口服給予(說明 3)。

(4) 劑量範圍

每個性別進行 3 個以上劑量組及對照組，依據初步致癌性試驗重覆劑量毒性試驗再決定致癌性試驗的劑量範圍。

1. 高劑量：以最高容許劑量(MTD)(說明 7)、試驗物質及其代謝物在齧齒類動物與人體之血液濃度之比值
Area under the blood concentration curve(AUC)25 倍(說明 8)、功能作用(說明 9)、試驗物質之吸收飽和量(說明 10)或最高可給予之劑量(說明 11)為高劑量。若試驗物質為非基因毒性物質，且以上之高劑量選擇準則均不適用時，其高劑量可設定為 1000mg/kg/day，若在人體則使用量為 50mg/kg/day(說明 12)。
2. 中間劑量：依據該試驗物質之藥動參數決定(說明 13)。
3. 低劑量：以不影響動物之生長、發育及生命期，且不產生任何毒性之劑量，一般低劑量不少於高劑量的 10%(說明 14)。
4. 第 4 劑量(視試驗需要進行)：若試驗物質投予高劑量與低劑量時，其藥動或代謝之性質有顯著差異，則應進行第 4 劑量組，此劑量是最高劑量能產生與低劑量相同之藥動或代謝性質。

(5) 對照組

必要進行陰性對照組。

若試驗物質給予時需使用媒介物或乳化劑，則給予陰性對照組的動物該媒介物乳化劑。若試驗需要，也可同時進行空白對照組。

(6) 試驗物質給予週期

以鼠進行試驗，給予期為 24 個月，而鼯鼠與倉鼠則為 18 個月，每週給予 7 天(說明 6)。

(7) 試驗期間

試驗在完成給予試驗物質後或給予後的 1-3 個月結束。若以鼠進行試驗，則試驗期最長為 30 個月，鼯鼠或倉鼠則為 24 個月(說明 15、16)。

(8) 觀察與檢驗

臨床觀察

- i. 每天觀察動物至少二次，以確定死亡情形。
- ii. 每天觀察與記錄試驗動物的臨床症狀至少一次，記錄包括每天肉眼可觀察到或觸摸到的腫瘤發現時間、部位、大小、外觀及成長過程。

體重與食物消耗量

定期測量動物的體重及食物消耗量。若試驗需要，須同時測量動物的飲水消耗量。

i. 體重：開始給予試驗物質前，測量動物體重；給予試驗物質期間每週至少測量一次。

ii. 食物消耗量：開始給予試驗物質前，測量食物消耗量；給予受試驗物質期間每週至少測量一次(說明 5)。

臨床病理檢驗

i. 血球檢驗(Hematology)

動物須在試驗開始投藥前、投藥期間(3、6、12 與 18 個月)及解剖前各採樣一次，以進行血球檢驗(說明 17)。

ii. 血清生化檢驗(Clinicalchemistry)

每個劑量組選擇雄、雌至少各 10 隻動物，須在試驗開始給予前、給予期間(3、6、12 與 18 個月)及解剖前各採血一次，以進行血清生化檢驗(說明 18)。

iii. 尿液檢驗(Urinalysis)

視試驗需要進行。每個劑量組選擇雄、雌至少各 10 隻動物，在試驗開始給予前、給予期間(3、6、12 與 18 個月)及試驗結束前進行尿液檢驗(說明 19)。

眼睛檢查(Ophthalmologicalexamination)

全部動物在試驗開始及試驗結束時進行眼睛檢查一次以上(說明 20)。

組織病理檢驗(說明 21)

i. 試驗期間死亡的動物須儘快進行解剖，肉眼檢查器官與組織之變化。若許可，主要臟器分別稱重並進行組織病理檢查，以找出死亡的原因及了解所有試驗物質引發的變化與損傷。

ii. 為獲得更充足的毒性資訊，垂死的動物均行安樂死。動物在犧牲之前須記錄臨床觀察之結果，若許可，收集血液樣品以進行血球及血清生化分析，了解血液有無呈現異常的現象，如貧血及淋巴結、肝、脾臟腫大所造成的影響。動物進行解剖，以肉眼觀察其器官與組織，並進行組織病理檢驗，以了解所有試驗物質所引發的變化與損傷，若試驗需要，記錄主要臟器的重量。

iii. 試驗結束(給予受試物期或復原期)，全部存活的動物行安樂死後，在剖檢前先收集血液樣品，以進行血球與血清生化分析，了解血清有呈現異常的現，如貧血及淋巴結、肝、脾臟腫大所造成的影響。解剖時，肉眼觀察及記錄動物的器官與組織之變化，並測量主要臟器重量。最高劑量組與對照組須進行組織病理檢驗，若最高劑量組與對照組的病理檢驗發現不同的增生損傷，則所有的動物都要進行組織病理檢驗，有助於數據的評估。

說明：

1. 試驗最好採用藥物代謝形態與人體相似的動物，一般最常使用鼯鼠、鼠和倉鼠。試驗開始之時機為動物在 6-8 週齡。
2. 口服給予試驗物質可以強迫餵食、或混入飼料或飲用水中以進食方式進行。
3. 每個劑量組的劑量相差 2 到 3 倍。最高劑量須能引發毒性變化，若試驗物質沒有顯示出明顯的毒性變化時，則以技術上可給予最高劑量作為最高劑量。

4.若試驗物質是以混入飼料或飲用水的方式給予，則須以每隻或每組為單位，定期測量飲食或飲水的消耗量，同時測量食物的掉落量，換算成實際的試驗物質消耗量。在試驗開始前及在適當時機進行試驗物質之穩定性與純度的量與質之測量。

5.若以強迫餵食試驗物質，每週至少餵食 5 天。

6.由重覆劑量毒性試驗結果決定最高容許劑量(MTD)。MTD 是指此劑量若使用於慢性毒性試驗為最高劑量時，不會減少動物的壽命，除腫瘤之誘導外不會引起任何毒性反應。而預估 MTD 值一般依據體重、器官重量、血液檢驗、尿液檢驗、血清生化檢驗等參數，肉眼觀察或組織病理變化等改變而訂定。

7.由藥動試驗結果決定致癌性試驗之最高容許劑量，只適用非致突變性試驗物質，且人體及嚙齒類動物之代謝情況相似，同時對嚙齒類動物為低器官毒性。依據動物與人體之 AUC 比較選擇最高劑量之準則：

(1)藥動試驗與致癌性試驗使用相同的動物品種、投藥途徑及劑量範圍，以獲得有效藥動數據。

(2)藥動試驗的試驗期要夠長，在選擇劑量範圍之試驗中能觀察與藥動時間參數改變之關係。

(3)在評估試驗結果時，要以科學判斷決定 AUC 之比較是基於試驗物質本身、測試物質與其代謝產物、或代謝物的數據。

(4)在估計人體與動物之相對血中濃度時，應考慮人體與動物間對試驗物質與蛋白質結合之差異。

(5)人體的藥動數據要由人體建議每日最高食用量試驗測得。

8.若以功能效應終點選擇最高劑量，須依每個試驗物質的特性而不同。最高劑量為此劑量試驗物質在動物身上產生的功能效應已達到最高程度，同時該劑量不會干擾動物之生理或原穩定狀態，不會影響到試驗結果的有效度，如引發高血壓及抑制血液凝結等。

9.若以吸收的飽和程度選擇最高劑量，則低劑量應以代謝及排除途徑的飽和程度而選擇。

10.若試驗動物是以混合飲食方式給予試驗物質，則最高可進食量為飲食量的 5%。

11.若人體使用試驗物質量為 50mg/day(人體體重為 50kg，即 1mg/kg/day)，其高劑量則設定為 1000mg/kg/day，計算方法依據 mg/kg 轉換至 mg/m²、25 倍 AUC、及乘以 6(由 mg/m² 估算 AUC 可能產生之誤差值)。

12.致癌性之中低劑量之選擇應考慮下列各項因素：

(1)藥動的線性狀況與代謝途徑的飽和狀態。

(2)人體接受試驗物質與實際獲得功能的劑量。

(3)正常嚙齒類動物之生理狀態的改變。

(4)嚙齒類動物的功能反應。

(5)反應機制及可能產生效用之起始劑量。

(6)在短期試驗中觀察到之不可預測性的毒性。

13.一般最低劑量須大於最高劑量的十分之一，但若最低劑量與人類食用的劑量相差甚遠，則亦可小於最高劑量的十分之一。

14.試驗結束時，非腫瘤導致的動物死亡率應低於 50%。

15.因動物死亡引起組織自體溶解或動物飼養問題引起的動物死亡每組不得超過 10%。在試驗期間，若試驗動物出現衰弱或垂死的現象，應將動物隔離或行安樂死進行解剖。

16.血液檢驗項目：參考（三）90 天餵食毒性試驗說明(3)血液檢驗。

17.血清生化檢測項目：參考（三）90 天餵食毒性試驗說明(3)-血清生化檢驗。

18.尿液檢驗項目：參考（三）90 天餵食毒性試驗說明(3)R 尿液檢驗。

19.眼睛檢驗：參考（三）90 天餵食毒性試驗說明(3)眼睛檢驗。

20.組織病理檢驗項目：參考（三）90 天餵食毒性試驗說明(4)組織病理檢驗。

◎口服急性毒性試驗(AcuteoralLD50study)

單一劑量口服急性毒性試驗的目的為測試試驗物質經單一劑量餵食試驗物質後(包含 24 小時內完成的多次餵食)，對哺乳類動物之急性毒性影響，包括檢測其在體內毒理特性之量與質的任何改變，此試驗結果有助於重覆劑量毒性試驗時劑量範圍之選擇，同時可顯示該試驗物質的目標器官與遲發之毒性，並了解餵食試驗物質過量可能引發之急性毒性。

1、動物品種及性別

常用鼠或鼯鼠之齧齒類，須包括雄、雌兩性，雄、雌性動物的數量須相同，動物給予試驗物質之週齡為 5-6 週(說明 1)。

2、動物數量

齧齒類動物每劑量組使用至少 10 隻(5 雄、5 雌)之動物。

3、試驗物質給予途徑

一般採用胃管經口餵食(gavage)，一次餵食(說明 2)。

4、劑量範圍

劑量範圍須包含不會產生不良作用及足以顯示毒性症狀(造成死亡)之劑量。此外，還要包括溶劑對照組、及／或空白對照組。若試驗物質毒性很低，則以試驗物質技術上可給予之最大劑量進行測試或進行急性極限測試(說明 3)。

5、觀察

(1)一般試驗觀察期為 14 天，每天觀察動物至少二次，以確定死亡情形。

(2)每天觀察試驗動物的臨床症狀一次以上，記錄試驗動物顯示的毒性症狀，包括死亡率、臨床毒性症狀(嚴重程度)、發生時間、持續的時間及中毒後的復原性，並瞭解毒性症狀與劑量及時間的關係。

(3)在觀察期間死亡的動物及試驗終結存活的動物均須進行解剖和肉眼病理檢查。

(4)若試驗需要，所有肉眼可觀察到有病變的器官與組織均須進行組織病理檢驗。
說明：

- 1.若具有初步單一劑量毒性試驗或短期重覆劑量毒性試驗的試驗結果，且其劑量範圍及臨床觀察已被確定，則可刪除非齧齒類動物的單一劑量毒性認驗。
- 2.齧齒類動物，口服給予試驗物質若採強迫餵食方式，餵食前動物須經過特定時段的禁食，而餵食之體積應在 10ml/kg 動物體重以下，若餵食體積過大，可採多次餵食方式，但須在 24 小時內完成。
- 3.若試驗許可，依不同劑量所產生的死亡率或毒性症狀估算致死劑量。急性極限測試(Acutelimittest)採取口服一次給予試驗物質 5g/kg 動物體重。

(六) 繁殖試驗(Reproductionstudy)

繁殖試驗係測試試驗物質對雄、雌兩性的生殖力影響及研究受精卵之運送與著床，其試驗物質給予時期分別在懷孕前與懷孕初期。

1、試驗動物

一般最常使用鼠或鼯鼠，包含雄、雌兩性。自致畸試驗使用的動物中，選擇本試驗的動物品種。

2、動物數量

若以鼠或鼯鼠進行試驗，每劑量組使用 40 隻(20 雄、20 雌)動物以上。

3、試驗物質給予途徑

採用胃管口服給予試驗物質，必要時得混入飼料或飲水中。

4、劑量範圍

進行三個以上劑量組(說明 1)及陰性對照組。視試驗需要可加入陽性對照組或參考性對照組(說明 2)。

5、試驗物質給予週期

若以鼠或鼯鼠進行試驗，5-6 週大之雄鼠先行給予試驗物質 60 天以上，然後進行交配，交配期間持續每天給予試驗物質，直到交配成功至犧牲雄鼠為止(說明 3)。成熟的母鼠則在交配前 2 週、交配期間、交配成功至胎兒器官開始形成的期間(自懷孕的第 0 天到第 6 天)每天給予試驗物質。

6、實驗步驟

(1)試驗期間：

臨床觀察：每天觀察一次以上並記錄動物的死亡率、臨床症狀及行為改變。動物體重：每週測量動物體重一次以上。食物消耗量：每週測量食物消耗量至少一次(交配期間除外)。

(2)交配期間，經試驗物質處理的雄鼠與雌鼠以 1:1 方式分配，共同居住於一飼養籠中，每天觀察陰道栓塞或進行陰道抹片以確定其是否交配成功(說明 4)，交配期一般為兩星期。

(3)若試驗需要，可將經試驗物質處理的雄鼠與未處理的雌鼠(或反之亦然)共同居住於一飼養籠中，每天觀察陰道栓塞或進行陰道抹片以確定其是否交配成功(說明 4)。

(4)交配成功的雌鼠在試驗終結時(懷孕的第 20 天)進行解剖，檢查黃體數目、胚胎的著床與被吸收數目、胚胎死亡率等，並進行器官與組織的肉眼觀察，若發現任何組織變化，保存其器官及對照組的相對器官，若試驗需要可進行組織病理檢驗。

(5)全部動物之睪丸、副睪、卵巢及子宮分別保存，若試驗需要可進行組織病理檢驗。

(6)用以交配的雄鼠與交配不成功的雌鼠在適當時間須進行解剖，肉眼觀察其器官與組織。

說明

1.如有可能，最高劑量要能造成毒性症狀，如飲食量減低、體重增加受到抑制或改變臨床病理參數。若試驗物質沒有顯示出毒性時，則以技術上可給予的最高劑量作為最高劑量。最低劑量則以對雌性動物或胚胎不產生不良影響之劑量，而中間劑量則取最高劑量與最低劑量之幾何平均值。

2.若試驗物質給予時須使用媒介物或乳化劑，陰性對照組的動物則給予該媒介物或乳化劑。陽性對照組的動物一般給予會產生生殖毒性的物質，而參考性對照組動物則給予和試驗物質的化學結構或藥效類似的藥物。

3.若由重覆劑量毒性試驗(4 週以上)之試驗結果顯示該試驗物質對精子生成並無任何影響，包括檢查雄、雌性動物之生殖器官的重量及組織病理均無異常，雄鼠交配前的試驗物質給予週期可改為 4 週。

4.計算交配指數(MatingIndex)與生育力指數(FertilityIndex)之公式如下：

交配指數=(交配成功的動物數目/動物同居的數目) \times 100

生育力指數=(雌性動物懷孕的數目/交配成功的雌性動物數目) \times 100