

ICH S2(R1)：

人體用藥基因毒性測試與數據判讀指引

(草案)

**(Genotoxicity Testing and Data Interpretation
for Pharmaceuticals Intended for Human Use)**

衛生福利部食品藥物管理署

中華民國 113 年 0 月

前言

國際醫藥法規協和會(International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH)於 2020 年發布 ICH S2(R1)(Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use)指引，其優化標準基因毒理試驗群，以預測潛在的人體風險性，並提供對結果解讀，最終目標為對因基因物質改變產生的致癌效應，改進其風險特性評估，並敘述國際上所公認，在標準基因毒理試驗群所呈現體外和體內陽性結果，其後續追蹤測試和解讀的基準，包括非關聯性發現的評估。本指引僅適用於人體用藥的產品開發。

目錄

一、緒論-----	1
(一)目的-----	1
(二)背景說明-----	1
(三)適用範圍-----	1
(四)通則-----	1
二、基因毒性標準測試群-----	2
(一)理論基礎-----	2
(二)說明標準測試群的兩種選項-----	3
(三)對測試群作修改-----	4
1.探索性臨床試驗-----	4
2.測試對細菌具毒性之化合物-----	5
3.帶有基因毒性活性警示結構之化合物-----	5
4.體內測試在應用上的限制-----	5
(四)生殖細胞致突變劑的檢測-----	5
三、體外測試之建議-----	6
(一)重複測試與判讀-----	6
(二)細菌突變試驗之建議-----	6
1.高劑量與最大劑量的選擇-----	6
2.試驗設計/測試計畫-----	7
(三)哺乳類細胞試驗之建議-----	7
1.最高濃度之選擇-----	7
2.試驗設計/測試計畫-----	8
3.陽性對照-----	8
四、體內試驗之建議-----	9
(一)體內染色體損傷之檢測-----	9
(二)其他體內基因毒性測試-----	9
(三)體內測試之劑量選擇-----	9

1.短期試驗-----	10
2.多重投予試驗-----	10
3.對血液或骨髓具毒性之化合物的檢測-----	11
(四)體內測試結果證明標靶組織為陰性-----	11
1.當體外基因毒性試驗呈陽性結果(或未進行)-----	12
2.當體外基因毒性試驗呈陰性結果-----	13
(五)體內試驗之採樣時機-----	13
(六)用於分析之動物數量-----	13
(七)使用啮齒類動物雄性/雌性進行體內基因毒性測試-----	13
(八)給藥途徑-----	14
(九)使用陽性對照於體內之試驗-----	14
五、測試結果評估與追蹤測試策略之指引-----	14
(一)生物學相關性評估-----	14
(二)體外測試結果之評估-----	15
1.體外細菌突變試驗陽性結果之評估-----	15
2.體外哺乳類細胞試驗陽性結果之評估-----	15
3.體外試驗陰性結果之評估-----	16
(三)體內測試結果之評估-----	16
(四)對陽性結果的追蹤策略-----	17
1.體外哺乳類細胞測試結果之追蹤-----	17
2.體內微核試驗陽性結果之追蹤-----	18
(五)致癌物試驗發現腫瘤之基因毒性測試追蹤-----	18
六、註釋-----	19
七、詞彙表-----	25
八、參考文獻-----	29

S2(R1)：人體用藥基因毒性測試與數據判讀

一、緒論

(一) 目的

本指引取代並結合 ICH S2A 和 S2B 指引。本次修訂之目的是優化標準基因毒理試驗群，以預測潛在的人體風險性，並提供對結果解讀的指引，最終目標為對因基因物質改變產生的致癌效應，改進其風險特性評估。修訂後的指引敘述國際上所公認，在標準基因毒理試驗群所呈現體外和體內陽性結果，其後續追蹤測試和解讀的基準，包括非關聯性發現的評估。本指引僅適用於人體用藥的產品開發。

(二) 背景說明

本指引將最新版的經濟合作與發展組織(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)指引，與國際基因毒性測試工作坊(International Workshops on Genotoxicity Testing, IWGT)報告的建議納入考量。對於某些情況與 OECD 或 IWGT 的建議有所不同，已在文中註明。本指引的注意事項應與其他 ICH 指引一起應用。

(三) 適用範圍

本指引的焦點在於對新的「小分子」藥品的測試，並不適用於生物製劑。關於與臨床發展相關試驗時機的建議，可參考 ICH M3(R2)指引。

(四) 通則

基因毒性測試被定義為檢測透過不同機制誘發基因損傷化合物的體外和體內測試。這些測試可識別與 DNA 及其固定形式中的損傷有關的危害。對於遺傳效應和惡性腫瘤的多階段形成過程來說，DNA 損傷如基因突變、大規模染色體損傷或重組的固定通常被認為是必需的。遺傳性變化可能只是惡性腫瘤多階段成型過程的一部分。數值性染色體變化也與腫瘤形成有關，並可能表示生殖細胞產生異倍體的潛力。在可檢測此類損傷的測試中呈陽性反應的化合物可能具

有致癌和/或致突變作用。考慮到特定化學物質與癌症之間的關係已經被建立起來，而類似關係在遺傳疾病方面難以證明，因此基因毒性試驗主要用於預測致癌性。然而，由於生殖細胞突變與人類疾病明顯有關，因此誘發遺傳效應之化合物的懷疑程度與誘發癌症之懷疑程度同樣嚴重。此外，基因毒性試驗的結果對於判讀致癌性研究具有價值。

二、 基因毒性標準測試群

(一) 理論基礎

藥品註冊需要全面評估其基因毒性。經過深入的研究，已經證明許多在細菌回復突變(Ames)試驗中呈突變原性的化合物，也是啮齒動物致癌物質。加入哺乳動物體外試驗可以提高對啮齒動物致癌物質的檢測靈敏度，與擴大基因事件的檢測範圍，但也會降低預測的準確性，亦即增加了與啮齒動物致癌性不一致的陽性結果發生率。無論如何，使用一整套試驗仍然是合理的，因為沒有單一的測試能夠檢測所有與腫瘤形成相關的基因毒性機制。

標準測試群的一般特徵如下：

- i. 以一個細菌逆轉基因突變測試評估致突變性。此測試已顯示可檢測相關的基因變化，與大部分啮齒動物和人類的基因毒性致癌物。
- ii. 還應以下列方式在哺乳動物細胞體外和/或體內評估基因毒性：

一些體外哺乳動物細胞系統已被廣泛應用，並經過充分的驗證：體外中期染色體異常試驗(metaphase chromosome aberration assay)、體外微核試驗(註 1)，與小鼠淋巴瘤 L5178Y 細胞 TK(thymidine kinase)基因突變試驗(MLA)。目前認為這三個試驗對於檢測染色體損傷同等適合，因此如果使用本指引推薦的測試方案，與標準組合中的其他遺傳毒性試驗一起應用時，這幾個試驗可互換。

測試群包含體內試驗，係因一些藥品在體內中具有致突變性，但在體外則否(註 2)，並且體內試驗可以把吸收、分佈、代謝和排泄等因素納入考量。基於此原因，目前選擇將紅血球的微核(血液或骨髓中)或骨髓中期細胞染色體異常的分析測試納入(註 3)。雖然應用還不廣泛，從處理的動物中培養的淋巴細胞，也可以用於細胞遺傳學分析。

在體外和體內測量中期細胞內染色體異常的試驗，可以檢測到染色體完整性方面的各種變化。染色單體或染色體的斷裂，如果產生無著絲粒片斷，可導

致微核形成；因此，無論是檢測染色體畸變或是檢測微核的試驗，均可用於檢測染色體斷裂原。微核也可產生于細胞分裂後期時一個或多個染色體遲滯，因此微核試驗也具有檢測某些非整倍體誘導劑的能力。MLA 可以檢測到 TK 基因突變和染色體損傷所致的 TK 基因突變。有一些證據顯示 MLA 還可以檢測染色體丟失。

測試群中還有一些額外的體內試驗，可以用作測試群或後續試驗，來評估體外或體內測試結果的權重證據(詳見下文)。適當的體內試驗(通常有兩項)結果為陰性，其測量指標有足夠的正當理由，並且證實有足夠的藥品暴露(見第四章第(四)節)，一般認為足以證明不存在顯著的基因毒性風險。

(二) 說明標準測試群的兩種選項

下列兩個選項對標準測試群具同等的適用性(註 4)：

選項 1

- i. 一項細菌基因突變測試。
- ii. 一項染色體損傷的細胞遺傳學檢測(體外中期染色體異常試驗，或體外微核試驗)，或一項體外小鼠淋巴瘤 TK 基因突變試驗。
- iii. 一項體內基因毒性試驗，通常採用齧齒動物造血細胞進行的染色體損傷，用於檢測微核或中期細胞染色體異常。

選項 2

- i. 一項細菌基因突變測試。
- ii. 對兩種不同組織進行體內基因毒性評估，通常是一項齧齒動物造血幹細胞微核試驗和第二項體內試驗。典型的試驗是在肝臟組織中進行 DNA 單股斷裂試驗，除非有其他正當理由(見下文，以及第四章第(二)節和註 12)。

選項 1 有較多的歷史經驗，部分原因是基於 S2A 和 S2B 指引的推薦。然而，同等認可選項 1 和選項 2 的原因如下所述：當哺乳動物體外測試呈陽性結果時，在採用合適的組織和顯示有充分的暴露下，兩項執行良好的體內試驗呈現明確陰性結果，即足以證明該試驗在體內不具有基因毒性的風險(見第五章第(四)節)。因此，進行兩項體內試驗的策略，和追蹤在體外試驗呈現陽性結果所採用的策略相同(註 4)。

在兩個標準測試群選項中，可以使用急性或重複劑量的體內研究設計。如果有多次給藥，在科學上有正當理由，應嘗試將基因毒性終點指標納入毒性研究中。如果在體內進行多個終點指標的評估，最好將其整合至單一試驗中。通常在開始進行研究之前，就有足夠有關所使用劑量對於重複劑量毒性研究合適性的資訊，可用於確定是採急性或是整合性的測試。

對於得到陰性結果的化合物，完成任何一種標準測試群中的選項，且符合當前建議的執行和評估，通常足以證明其不具有基因毒性風險，而無需進一步的測試。對於在標準測試群中呈陽性結果的化合物，可能需要根據其治療用途進行更詳盡的試驗(見第(五)節)。

目前有數種體內試驗可作為選項 2 第二部分的體內評估(詳第四章第(二)節)，其中有些可以整合在重複劑量毒性試驗。考量暴露量與代謝能力，試驗一般以肝臟組織為優先選擇，但挑選體內試驗用的組織與試驗時，應將諸多因素納入考量，例如任何關於化合物的可能機轉、體內代謝，或具相關性組織的暴露量等知識。

染色體數量改變的資訊，可透過哺乳類細胞體外試驗取得，亦可透過細胞微核體外或體內試驗取得。標準試驗的計畫中能提示出這方面可能性的部分是有絲分裂指數升高、多倍體誘導與微核評估等。亦有試驗證據指出在 MLA 中可檢測出紡錘體損害。選項 2 之細胞遺傳學體內試驗，以微核試驗為首選，而非染色體畸變試驗，以提高直接測得染色體丟失(產生非整倍體之可能性)的能力。

建議採用標準試驗組合並不意味將其他基因毒性試驗均視為不充分或不適當。額外的測試可作為標準測試群所得之基因毒性結果的進一步研究(見第四章第(二)與(五)節)。包括非嚙齒動物在內的其他動物物種，如果需要且已充分證明合適，亦可在試驗中替代使用。

若因為技術上的因素，使得標準測試群中有一或數項測試不能進行，如果能提供充分的科學合理性，經過驗證的其他試驗可用作替代試驗。

(三) 對測試群作修改

以下說明可以對標準測試群進行修改的情況。

1. 探索性臨床試驗

對於某些探索性臨床研究，可能僅需較少的基因毒性試驗，或對體內試驗最高劑量的合理性，可以有不同的標準(見 ICH M3(R2)指引)。

2. 測試對細菌具毒性之化合物

在化合物對細菌具有高毒性的情況下(例如某些抗生素)，仍然應進行細菌回復突變(Ames)測試，如同在哺乳類細胞測試細胞毒性化合物，因為其致突性可發生於較低或較小毒性的濃度。在這種情況下，還應進行任一種體外哺乳動物細胞試驗，即採用選項 1。

3. 帶有基因毒性活性警示結構之化合物

通常情況下，具有警示結構的化合物(註 5)可經由標準測試群檢測其基因毒性，因為大多數的「警示結構」被定義為與細菌致突變性有關。然而，已知少數化學類別在哺乳動物細胞染色體損傷試驗，比在細菌致突變性試驗更容易檢測出來。因此，對於具有警示結構的化合物，若在任一測試群中呈現陰性結果，通常足以認定其不具有基因毒性。然而，對於具有某些特定警示結構的化合物，可能需要針對標準測試計畫進行調整(註 5)。額外測試的選擇或計畫的調整，要視該警示結構化合物的化學性質、已知活性和任何代謝數據而定。

4. 體內測試在應用上的限制

對有些化合物，許多體內測試(通常為針對骨髓、血液或肝臟的試驗)並無法提供額外有用的資訊。這些化合物的毒理動力學或藥品動力學資料顯示其無法全身吸收，因此無法到達標靶組織。這類化合物例如某些放射性顯影劑、含鋁制酸劑、某些吸入給藥化合物，與皮膚或其他局部用藥。如果改變給藥途徑仍無法提供足夠的標靶組織曝露量，以及對曝露量最高的組織沒有合適的基因毒性試驗，可考慮僅以體外試驗結果進行評估。有些情況下，可以在接觸部位評估基因毒性作用，儘管此類試驗尚未被廣泛應用(註 6)。

(四) 生殖細胞致突變劑的檢測

比較研究結果顯示，就定性觀點而言，大多數生殖細胞致突變劑，很可能在體細胞(somatic cell)試驗中檢測出具有基因毒性。因此體內體細胞基因毒性試驗的陰性結果，通常表示其對生殖細胞無影響。

三、 體外測試之建議

(一) 重複測試與判讀

試驗結果的再現性，是試驗研究包含有新穎方法或獲得非預期結果的基本組成。然而，採用標準化和廣泛使用的基因毒性測試進行藥品的常規檢測，通常不需要進行重複試驗。這些試驗因已經充分確定並具備足夠的內部控制，通常不需要針對明確的陽性或陰性試驗重複進行。理想情況下，測試結果應當能夠明確界定為陰性或陽性，但有時因試驗結果達不到預先設定的陽性或陰性結果的判定標準，而被認定為“可疑”。統計方法的應用有助於資料的解讀，但適當的生物學解釋分析至關重要。對可疑結果進行重複試驗，可得到：(i)明確的陽性結果，因此結論是陽性；(ii)陰性的結果，可疑結果缺乏再現性，結論是陰性；(iii)另一個可疑的結果，最終結論仍是可疑。

(二) 細菌突變試驗之建議

OECD 的指引(1997)與 IWGT 報告(Gatehouse 等，1994)均對試驗計畫提出建議。

1. 高劑量與最大劑量的選擇

當不受溶解度或細胞毒性限制時，建議最高劑量為 5000 µg/plate(液態測試物質為 5 µL/plate)。

溶解度之限制

對於細菌培養，如果沉澱不干擾評分、不受細胞毒性限制，應對產生沉澱的劑量進行評分，且最高劑量不超過 5000 µg/plate(液態測試物質為 5 µL/plate)。若未觀察到細胞毒性，應以最低沉澱劑量作為評分的最高劑量。若注意到劑量相關之細胞毒性或致突變性，則不管溶解度，評分之最高劑量應依如下所述之細胞毒性標準。

細胞毒性之限制

在 Ames 測試，所選擇評分的劑量應具有明顯之毒性，但最高劑量不應超過 5000 µg/plate。毒性可藉由減少逆轉變菌群之數量，與/或減弱背景菌群之方法來判斷。

2. 試驗設計/測試計畫

建議使用 OECD 推薦，能夠檢測鹼基置換和框移突變的細菌菌株組合，包括：

- 鼠傷寒沙門氏菌(salmonella typhimurium)TA98；
- 鼠傷寒沙門氏菌 TA100；
- 鼠傷寒沙門氏菌 TA1535；
- 鼠傷寒沙門氏菌 TA1537 或 TA97 或 TA97a 三選一；
- 鼠傷寒沙門氏菌 TA102 或大腸桿菌 WP2 uvrA 或大腸桿菌 WP2 uvrA (pKM101)三選一。

和 OECD 和 IWGT 建議的一個不同點在於，依據測試藥品的經驗，若測試結果是明確的陰性或陽性，且試驗完全依照適當的試驗計畫進行，包括所有菌株有代謝活化和無代謝活化、符合最高劑量選擇標準的合適劑量範圍，與適當的陽性和陰性對照，則一個單獨的 Ames 測試已足夠。此外，在測試藥品時，該單一實驗可使用紙皿法或預培養法(註 7)。如果結果可疑或弱陽性，則可能需要重複測試，也可能需要調整試驗計畫，例如：適當的間隔劑量範圍。

(三) 哺乳類細胞試驗之建議

OECD 指南(1997)和 IWGT 出版物(Kirsch-Volders 等，2003; Moore 等，2006)提供對於試驗計畫的建議。(Moore 等，2006)也提供對於解讀 MLA 結果的建議，包括採用全球評估因子。以下列出針對藥品測試與上述建議的一些不同點，特別是最高濃度的選擇(詳見下文)。

1. 最高濃度之選擇

最大濃度

當不受溶媒或培養液中的溶解度或細胞毒性限制時，建議的最高濃度 1 mM 或 0.5 mg/mL，以其中較低者為準(註 8)。

溶解度之限制

當有溶解度的限制，若沒有細胞毒性的限制時，最高濃度應在評分不受干擾下，在培養液中可見最少沉澱的最低濃度。評估沉澱可以肉眼或以光學顯微鏡等方法來進行，說明在培養過程中沉澱物持續存在或出現(至給藥結束)。

細胞毒性

進行中期染色體畸變或微核的體外細胞遺傳學試驗時，細胞毒性不應超過將細胞生長減少約 50%(註 9、註 10)。對於 MLA，以相對總生長率(RTG)測量數值為 20-10%，最高劑量應有 80-90%的細胞毒性(註 9)。

2. 試驗設計/測試計畫

對於體外進行染色體中期細胞染色體損傷的細胞遺傳學評估，測試計畫應包括有與無代謝活化的測試，以及適當的陽性和陰性對照。測試物質的給藥處理時間應為 3 至 6 小時，採樣時間為給藥處理開始後的約 1.5 個正常細胞週期。在有和無代謝活化兩種情況下短期處理結果為陰性或可疑時，應進行無代謝活化情況下，持續給藥處理到約 1.5 個正常細胞週期採樣時間的測試。同樣的原則也適用於體外微核試驗，除了採樣時間為從給藥處理後的 1.5~2 個正常細胞週期，以讓細胞完成有絲分裂並進入下一個分裂間期。對於這兩種體外細胞遺傳學試驗，某些類型的化合物可能需調整試驗計畫，因為其在更長給藥處理時間、延長採樣時間或恢復期後更易檢測到，如某些核苷類似物或亞硝胺類。對於中期畸變試驗，需要記錄中期多倍體(包括核內複製)占中期細胞的百分比率，來獲得倍數狀態資訊。對於 MLA，測試計畫應該包含有和無代謝活化的測試，以及適當的陽性和陰性對照，測試物質給藥處理時間為 3 至 4 小時。在有和無活化代謝兩種條件下短期給藥處理都是陰性或可疑結果時，還應進行無活化代謝條件下持續給藥處理約 24 小時的測試。標準 MLA 應包括：(i)包含主要誘導小集落的陽性對照，(ii)陽性對照，溶劑對照和至少一種陽性結果測試化合物濃度(如有)的菌落大小，包括出現最高突變率的培養基，進行突變集落大小的測定。

對於哺乳動物體外細胞試驗，應採用如上所述的固定已確證的元素(例如：不同處理時間，有和沒有代謝活化的測試)。在出現明確的陰性或陽性結果時，通常不需要進一步的確認性測試。可疑或弱陽性結果可能需要重複測試，並可能需要對計畫進行修改，例如調整測試濃度的間距。

3. 陽性對照

雖然進行同步的陽性對照很重要，但因體外哺乳動物細胞基因毒性測試已足夠標準化，陽性對照的使用通常只需一個代謝活化的陽性對照(當同時有進行非活化測試時)，以證明代謝活化系統的活性和測試系統的反應能力。

四、 體內試驗之建議

(一) 體內染色體損傷之檢測

採用體內骨髓細胞分析染色體畸變，或檢測含微核的嗜多色性紅血球 (polychromatic erythrocytes)，均可用於檢測染色體斷裂劑。大鼠和小鼠均被認為可用於骨髓微核測試。微核也可採用小鼠外周邊血中未成熟(如嗜多色性)紅血球或大鼠血液中新生網織紅細胞的測量(註 3)。同樣，對骨髓或末梢血液中斷裂原/非整倍體誘導劑的檢測敏感的其他物種，其未成熟紅血球亦可使用(註 3)。如果經過適當驗證，可以使用自動化分析系統(影像分析和流式細胞分析)(OECD，1997；Hayashi 等，2000;2007)。染色體畸變也可以使用給藥處理齧齒動物的周邊淋巴細胞培養來進行檢測分析(註 11)。

(二) 其他體內基因毒性測試

與標準測試群選項二中第二個測試相同的體內試驗，可作為後續試驗來確定體外或體內測試結果的證據權重(註 11 和註 12)。儘管體外觀察到的效果類型以及任何機制的資訊，有助於指導體內測試的選擇，但在大多數組織中使用標準方法，進行染色體畸變或內源基因的基因突變檢查是不可行的。儘管突變可以在轉殖基因齧齒動物中測量，但這需要延長處理時間(例如：28 天)以允許突變的表現、固定和累積，特別是在細胞分裂較少的組織中(註 12)。因此，第二個體內測試通常將評估 DNA 損傷終點指標作為替代。經驗最豐富並且具有計畫建議的測試，包括 DNA 斷裂試驗，如單細胞凝膠電泳(Comet)試驗，和鹼性熔解試驗，體內轉基因小鼠突變試驗和 DNA 共價結合試驗(所有這些測試可應用於許多組織，註 12)，以及肝臟非程序式 DNA 合成(unscheduled DNA synthesis, UDS)測試。

(三) 體內測試之劑量選擇

一般選擇有代表性的三種劑量進行分析(Hayashi 等，2005)。

1. 短期試驗

對於短期試驗(通常為給藥 1 至 3 次)，建議基因毒性試驗的最高劑量為限定劑量 2000 毫克/千克(若可耐受)，或已確認最大耐受劑量(例如：微核試驗(OECD))，最大耐受劑量的定義為產生毒性表現的劑量，而基於同樣的劑量範圍，稍高一些劑量即預期會產生死亡。類似的建議也適用於 Comet 試驗(Hartmann 等，2003)和轉殖基因突變試驗(Heddle 等，2000)。在劑量的選擇中還應考慮骨髓紅血球的生成壓抑效應。最高劑量之下的較低劑量，一般的劑量間距為約 2~3 倍。

2. 多重投予試驗

選項 1 測試群

當體內基因毒性測試與多次給藥毒性試驗整合時，若該毒性試驗的劑量符合支持進行人體臨床試驗的標準，則通常認為對於基因毒性評估也是合適的；然而這種選擇可能與 OECD 體內微核試驗指引中的劑量選擇標準有所不同。此可適用體外哺乳細胞測試為陰性(或為“無相關陽性”，見第(五)節)時。

追蹤試驗或選項 2 測試群

當進行追蹤試驗以闡明任何基因毒性指徵，或採用選項二且未進行體外哺乳細胞試驗時，需要評估幾個因素以確定最大劑量是否適合。毒性試驗(通常是大鼠)的高劑量如以下任一標準，足以證明適合進行微核分析和其他基因毒性評估：

- i. 最大可行劑量(MFD)，依據藥品在載體中的物理化學特性所決定(前提是該載體中的 MFD 與急性施藥時可達到的劑量相近，見註釋 13)。
- ii. 在 14 天或更長時間試驗，如果能耐受，極限劑量為 1000 mg/kg。
- iii. 最大可能的暴露量，以達到高原/飽和的暴露水準或化合物累積來證實。相反地，隨著時間的推移，母體化合物暴露量的大幅下降(例如：減少初始暴露量 50%以上)，可能會使試驗不符合規範(除非在最初幾天內取得血液樣本)。如果這種現象只出現在一種性別中，一般在試驗終期不會對此性別進行評分，除非該性別中令人關注的代謝物的暴露量增加。
- iv. 高劑量是急性給藥使用劑量的 50%以上，即接近最低致死劑量，如果有其他理由可以得到這方面的數據(當前的 OECD 指引中所述，急性給藥微

核試驗的高劑量為：高於該劑量預期將有死亡；對於其他體內試驗也有相似的指導建議(Hartmann 等，2003)。

僅基於無毒性的暴露範圍(高於臨床暴露量的若干倍)來選擇高劑量，被認為是不充分合理的。

3. 對血液或骨髓具毒性之化合物的檢測

許多誘發非整倍體的化合物，例如強效的紡錘體抑制劑，只有在接近毒性劑量的狹窄範圍內，才能在體內骨髓或血液中的微核試驗檢測到。某些斷裂劑也是如此。若毒理學資料顯示對紅血球系統有嚴重毒性(例如多染性紅血球或網狀紅血球明顯受到抑制)，則進行評估的劑量應在該具有毒性的高劑量之下，間距不超過約 2 倍。若多週給藥的試驗中未含適當的劑量，則可以從以下任一方法，取得能幫助檢測誘發非整倍體，和有毒性斷裂劑的額外資料：

- i. 當隨著給藥時間延長毒性明顯升高時，建議進行早期的血液採樣(在 3-4 天時)。當在多周給藥試驗(如 28 天)中採用血或骨髓進行微核測定，以及進行網織紅細胞計數時，明顯的血液毒性會影響檢測微核的能力，即在急性給藥後誘導可檢測到的微核升高的劑量，在多次給藥後可能毒性太大了以至於無法進行分析(Hamada 等，2001)。採用早期的樣本來確保能檢測到斷裂劑和潛在的非整倍體誘發劑(參考註 14、15)。
- ii. 一項體外哺乳細胞微核試驗。
- iii. 一項急性骨髓微核試驗。

(四) 體內測試結果證明標靶組織為陰性

體內試驗在基因毒性測試中扮演重要角色。體內試驗結果的價值，直接關聯到標靶組織是否充分地暴露測試化合物，尤其是當體外試驗已經顯示出基因毒性的有力證據，或者並未進行體外哺乳動物細胞測試時，此對體內試驗陰性結果尤為重要。充分暴露的證據可能包括該組織的毒性反應，或根據下一節所述的毒理動力學數據得出。

1. 當體外基因毒性試驗呈陽性結果(或未進行)

應使用與基因毒性試驗相同的動物物種、品系和給藥途徑，在最高劑量或其他相關劑量下，進行體內曝露的評估。若以毒理學試驗測量基因毒性，因為暴露量數據屬於毒理學分析的一環，通常可以取得。

應採用以下任一種方式來證明體內曝露量：

i. 細胞毒性：

- a. 細胞遺傳學試驗：於骨髓或血液組織中，在微量核試驗所用的劑量及採樣時間點下，未成熟紅血球佔總紅血球數之比例發生明顯變化，或於染色體異常試驗中測量有絲分裂指數的明顯減少。
- b. 其他體內基因毒性試驗：利用組織病理學評估或血液生化毒性指標等，來觀察肝臟或其他所需評估組織的毒性反應。

ii. 暴露量：

- a. 測量血液或血漿中與試驗藥品相關的物質。骨髓是一種高灌流組織，血液或血漿中的藥品相關物質濃度通常與骨髓中相似。對於有全身曝露情況的藥品，無論給藥途徑如何，都會暴露到肝臟。
- b. 直接測量標靶組織中與藥品相關的物質，或利用放射性顯影來分析組織暴露量。

如果全身曝露情況與預期臨床曝露量相似或更低，則可能需要考慮其他策略，例如：

- i. 更改給藥途徑；
- ii. 使用具有更高曝露量的不同物種；
- iii. 改採其他組織或試驗方法(詳見第二章第(三)節「體內測試在應用上的限制」)。

如果無法達到適當的曝露量(例如，化合物在靶組織顯示出極低的生物利用度)，常規的體內基因毒性測試將毫無意義。

2. 當體外基因毒性試驗呈陰性結果

如果體外測試未顯示具有基因毒性的潛力，則體內(全身性)暴露量可以通過上述任何方法進行評估，或從因其他目的所進行啮齒動物的標準吸收、分佈、代謝和排泄(ADME)試驗的結果來進行推斷。

(五) 體內試驗之採樣時機

進行體內微核、染色體畸變和 UDS 測試等基因毒性測試，取樣時間的選擇應遵循 OECD(1997)的建議。

若將微核分析整合至多週數試驗中，血液或骨髓採樣可在末次給藥之次日進行(參閱上文對額外血液採樣時機之建議)。

其他基因毒性測試的取樣時間，應按所測試的終點指標而定；例如，DNA 損傷/鏈斷裂測定通常在每日給藥、重複多次給藥的末次給藥後的幾個小時內(如 2~6 小時)進行採樣。在單次給藥情況下，應採用兩個採樣時間點：給藥後的幾個小時內和 24 小時。

原則上，只要高劑量/暴露量是足夠的，任何給藥期限的測試都是適當的。

(六) 用於分析之動物數量

分析所需動物的數量應依據微核試驗(OECD)或其他基因毒性試驗的現行建議進行，通常不包含所有進行毒理試驗的動物。進行基因毒性分析的動物，應從進行毒理試驗的動物組中隨機選擇。

(七) 使用啮齒類動物雄性/雌性進行體內基因毒性測試

若檢測性別特異性藥品，試驗可在相應性別中進行。急性測試通常僅在單一性別進行。對於急性測試，只有當任何現有的毒性、代謝或暴露(C_{max} 或 AUC)數據顯示，在所使用的物種中具有毒理學意義的性別差異時，才應該考慮兩種性別。否則，在急性基因毒性測試中單獨使用雄性被認為是合適的。當基因毒性試驗被整合到雌雄兩性的重複劑量毒性試驗時，可以從兩種性別採集樣本，但如果毒性/代謝方面沒有明顯的性別差異，則可只對一種性別進行評分。對於

所評分的性別，其劑量水準應符合適當劑量水準的標準(見第四章第(三)節)。其他已確立的體內基因毒性試驗，也可以應用類似的原則。

(八) 給藥途徑

一般情況下，給藥途徑是預期的臨床途徑，例如：口服、靜脈注射或皮下注射，但必要時，例如對於局部投予的化合物，可以進行調整以達到全身暴露之目的(請參閱第二章第(三)節)。

(九) 使用陽性對照於體內之試驗

對於體內試驗，當已確定具備進行該試驗的能力後，僅定期對動物進行陽性對照即可，而不必為每個試驗同時進行(註 16)。

五、 測試結果評估與追蹤測試策略之指引

對比試驗已明確顯示，在預測齧齒類動物致癌性時每種體外試驗系統均可產生假陰性和假陽性結果。基因毒性測試群(包括體內和體外測試)檢測的是主要通過直接的遺傳損傷機制的致癌劑，如大多數已知的人類致癌劑。因此，這些測試群不期望用於檢測非遺傳毒性致癌劑。一些實驗條件，如體外代謝活化系統的有限活化能力，可能導致體外試驗出現假陰性結果。測試群的試驗設計旨在減少對具有基因毒性的化合物，產生偽陰性結果的風險。但任何一項基因毒性試驗的陽性結果，並不總是意味著測試化合物對人類存在基因毒性/致癌性風險。

儘管體外數據可能表明藥品擁有某種程度的基因毒性，但適當的體內數據通常可以確定這些體外信號的生物學意義。此外，由於存在幾個間接的基因毒性機制只有在達到一定濃度時才起作用，因此可以為某些具有這些機制證據的藥品建立一個安全水準(閾值)，詳見第五章第(二)節(Muller 和 Kasper, 2000; Scott 等, 1991; Thybaud 等, 2007)。

(一) 生物學相關性評估

以下建議假設測試以適當的劑量間隔、毒性水準等條件進行。

對於體外或體內出現基因毒性表觀上的輕微增加，首先應評估其再現性和生物學意義。結果不具生物學意義的例子包括：

- i. 與陰性或溶媒對照組的數值相比有統計學意義的輕微增加，但是在該試驗機構之合適的歷史背景資料範圍內。
- ii. 微弱或可疑的反應無法再現。

若以上任一情況應用證據權重分析提示其不具有潛在遺傳毒性，該試驗結果被認為是陰性或無生物學相關性，無需進行進一步試驗。

(二) 體外測試結果之評估

在評估陽性結果時，特別是微生物致突變性測試，應考慮測試化合物的純度，以確認陽性結果是否可能是由於污染物所致。

1. 體外細菌突變試驗陽性結果之評估

由於 Ames 測試的陽性結果，被認為提示其 DNA 反應性，除非通過適當的風險-效益分析進行合理解釋，需要進行廣泛的後續測試來評估體內突變和致癌潛力，以評估治療病患的潛在風險。

有些菌落的人為升高而非真正的回復突變的典型例子。這可能是由於污染了氨基酸(即為沙門氏菌奧氏菌株提供組氨酸(histidine)，或為大腸桿菌菌株提供色氨酸(tryptophan))，因此細菌回復突變試驗不適合檢測可能會降解的肽類。另外，也存在一些細菌回復突變試驗陽性結果，不能提示在人體內具有基因毒性潛力的例子，例如當發生細菌特異性代謝、被細菌硝基還原酶活化等。

2. 體外哺乳類細胞試驗陽性結果之評估

IWGT 的報告中討論了對基因毒性陽性結果的證據權重評估，與追蹤測試的建議(Thybaud 等，2007)。此外，科學文獻列出了許多可導致有可疑相關性的體外試驗陽性結果的情況。因此任何體外測試中的陽性結果，都應基於以下證據權重進行評估。以下舉例僅供參考。

- i. 體內不存在的條件(pH 值、滲透壓、沉澱物)。

(需要注意的是：1 mM 的限制避免了滲透壓的升高，如果改變受試物的 pH 值，建議給藥時，應調整 pH 值至未處理培養液的正常 pH 值)。

- ii. 僅在最高毒性濃度下發生。

在 MLA 中，只有在 RTG 減少 $\geq 80\%$ 時。

對於體外細胞遺傳試驗，當增長被抑制 $\geq 50\%$ 時。

如果以上條件之一適用，權重證據表明該物質沒有基因毒性，可以按照標準測試群進行測試(選項 1)。因此，進行單一的體內測試即已足夠。

3. 體外試驗陰性結果之評估

對於體外測試呈陰性的結果，在特定情況下應該考慮進一步的測試，例如(以下舉例僅供參考)：該化合物的結構，或已知代謝路徑表明標準的體外代謝活化技術(例如：嚙齒動物肝臟 S9)可能不足以檢測；該化合物的結構，或已知活性表明使用其他測試方法/系統可能更適合。

(三) 體內測試結果之評估

考量相較於體外測試，體內測試有吸收、分佈、排泄等因素的優點，這些因素可能與人體使用相關。另外，體內測試的代謝結果也更能反映實際情況。如果體內試驗和體外試驗的結果不一致，則要視情況進行考量和解釋，例如代謝的差異，或是化合物在體內試驗中因快速而有效地排出體外。

基因毒性的體內測試也可能產生誤導的陽性結果，並不代表真正具有基因毒性。例如：

- i. 微核數的增加可能並非由投予具有基因毒性物質所致，而是紅血球生成過程中的干擾所導致的結果(Tweats 等，2007)。
- ii. DNA 附加物的數據應以已知的內生性附加物背景濃度為基礎進行判讀。
- iii. 毒性相關的間接效應可能會影響 DNA 股斷裂試驗(例如：鹼性洗脫和 Comet 試驗)的結果。

因此，在評估基因毒性數據時，應考慮所有毒理學和血液學方面的發現(註 15)，並且間接和毒性相關的效應可能具有安全範圍，並且可能與臨床無關。

(四) 對陽性結果的追蹤策略

1. 體外哺乳類細胞測試結果之追蹤

以下討論係以 Ames 細菌突變試驗呈陰性為假設。

I. 機轉性/體內追蹤

當證據權重不足以證明哺乳細胞試驗之陽性結果不具相關性時，建議進行追蹤測試以提供實證證據。這可以透過額外的體外試驗(下文第 i 項)或兩個適當的體內試驗(下文第 ii 項)來達成，其方法如下：

- i. 常可藉由體外試驗，對缺乏生物學相關性的基因毒性，提供證據權重的機轉資訊，例如在 MLA 中誘導染色體畸變或突變的受試物不是 DNA 損傷性物質的證據(如除 Ames 試驗之外的其他突變/DNA 損傷試驗結果為陰性；化學結構上的考慮)，或者體內可能不相關或可能具有閾值的間接機制的證據(如抑制 DNA 合成、僅在高濃度時產生活性氧化物等)(Galloway 等，1998；Scott 等，1991；Müller 和 Kasper，2000)。類似的研究可以用來追蹤體內微核試驗的陽性結果，或在這種情況下，可以包括指示染色體喪失/非整倍體性的已知機轉，或包括指示染色體喪失的著絲粒染色試驗(註 17)。在體外染色體畸變試驗中，多倍體是常見的結果。儘管非整倍體可能誘發多倍體，但單純的多倍體不足以表示具有非整倍體性的可能性，只能表示細胞週期的干擾。多倍體通常與細胞毒性的升高有關，如果在體外試驗中僅見多倍體，而未見結構上的染色體斷裂，一個確保具有適當暴露的體內微核試驗陰性結果，通常可提供缺乏非整倍體誘導潛力的充分證據。

如果以上機轉資料和證據之權重顯示不具相關基因毒性，則只需進行一個體內測試即可證明不具有基因毒性。這通常是一個細胞遺傳試驗，若需追蹤染色體喪失，則應進行微核試驗。

如果證據權重或機轉資料不足以排除相關基因毒性的可能性，通常需要進行兩個適當的體內測試，且需保證試驗結果和適當的組織(通常是不同的組織)，並注重在體內模型中達到足夠的暴露程度。

或

- ii. 進行兩個適當的體內測試，通常是分別使用不同的組織，並提供暴露程度的支援。

總體而言，足夠證明不具有重大基因毒性風險的是適當的體內試驗結果，其必須有適當的指標依據，並證明達到適當的暴露水準(見第四章第(四)節)。

II. 追蹤須依賴 S9 活化之體外測試陽性結果

當陽性結果只在 S9 活化系統存在時，首先應確認是否為代謝活化的原因，而不是其他試驗條件的差異(例如：與未活化的培養中血清含量 $\geq 10\%$ 相比，S9 混合物中血清含量低或沒有血清)。隨後的追蹤策略旨在確定體外結果與體內情況的關聯性，通常會集中在肝臟的體內試驗(註 18)。

2. 體內微核試驗陽性結果之追蹤

若體內試驗結果顯示微核數量增加，應評估所有毒理資料，以確定非基因毒性作用是否是其原因，或是為其中的一個作用因素(註 15)。若懷疑紅血球生成或生理狀態(如低溫或高溫)等非特定性干擾因素，體內染色體畸變試驗可能更適合。若懷疑真正的數量增加，應採用證明該升高是否是由於染色體丟失或染色體斷裂所致的策略(註 17)。有證據表明，非整倍體誘導(例如：受到紡錘毒素影響)會遵循非線性劑量反應。因此，有可能確定存在染色體損失不會發生的閥值暴露量，並證明與臨床暴露量相比存在適當的安全範圍。

總之，在評估一種化合物的基因毒性潛力時，必須考慮所有發現，並了解體內和體外測試的內在價值和限制。

(五) 致癌物試驗發現腫瘤之基因毒性測試追蹤

對於在標準測試群中呈現陰性結果，但在致癌性試驗中引發腫瘤增加，而目前尚未確定是否存在非基因毒性機轉的化合物，可考慮在適當的模型中進行額外的基因毒性測試。為幫助了解相關的作用機轉，這些額外的測試可以包括：修改體外測試中的代謝活化條件，或在體內進行測量誘發腫瘤的標靶器官中的基因損傷，例如 DNA 鏈斷裂測試(例如：Comet 試驗或鹼基消融試驗(alkaline elution))、肝臟 UDS 測試、DNA 共價結合(例如： ^{32}p 後標記)等，以及腫瘤相關基因變化的分子特性分析(Kasper 等，2007)。

六、 註釋

1. 體外微核試驗已在國際合作研究中廣泛評估(Kirsch-Volders 等，2003)，經 ECVAM 驗證(Corv 等，2008)，並成為 OECD 指引 487(2010)的主題。
2. 存在一些具有基因毒性的致癌物質，它們能夠在骨髓測試中可靠地被檢測到，但卻在標準試驗中產生了陰性、微弱或矛盾的結果。這些致癌物質的數量雖然不多，但仍然相當重要，例如甲基苄肼(procarbazine)、對苯二酚(hydroquinone)、氨基甲酸乙酯(urethane)和苯(benzene)。(Tweats 等，2007)描述了來自於公司調查中的其他一些例子。
3. 原則上，可以在任何試驗動物物種的骨髓中評估造血幹細胞中的微核，並且在不曾從脾臟濾除循環微核紅血球的物種的血液中進行評估。在實驗小鼠中，可以在血液中的多染紅血球中測量微核，而在小鼠接受持續治療 4 週或更長時間後，也可以使用成熟(正色)紅血球進行測量。雖然大鼠會快速從循環系統中清除微核紅血球，但已證實可以在大鼠的血液網狀紅血球中檢測使用多種斷裂劑和非整倍體誘導劑誘導的微核(Wakata 等，1998；Hamada 等，2001)。大鼠的血液亦可用於微核分析，前提是須以特定方法確保新形成的網狀紅血球(Hayashi 等，2007；MacGregor 等，2006)，且因為大鼠血液中微核的濃度較骨髓中低，亦須有充足的樣本數，以達到適當的統計敏感度(Kissling 等，2007)。不論選擇哪種方式—骨髓或血液，抑或自動分析或手動分析—實驗室須定出適當的最小樣本數，將評分誤差維持在動物的個體差異水準之下。

目前已有文獻提供誘發狗與恆河猴微核的經驗(Harper 等；Hotchkiss 等，2008)。若有某種人體代謝物在啮齒動物體內濃度不足，但在狗或猴子體內可以形成，則可應用這些替代物種。

4. 雖然兩個選項對測試群同等適用，應採何者為宜可藉由對於所測試化合物的相關知識作判斷。舉例而言，若試驗動物的全身暴露量與預期的臨床暴露量相當或相對較低，則應採用體外試驗，亦即選項 1(參閱第二章第(三)節、第四章第(四)節)。反之，若預期肝臟會產生存留週期短的活性代謝物，則建議採選項 2，包括對肝臟進行檢測。
5. 部分具有警示結構的分子實體，被認定為與導致化學物質的致癌性，與/或致突變性相關。警示結構的實例包括烷化親電子中心(alkylating electrophilic center)、不穩定環氧化物(unstable epoxides)、芳香胺、偶氮結構(azo-

structure)、N-亞硝基化合物(nitroso)、芳硝化合物(aromatic nitro groups)等(Ashby and Paton, 1994)。對於某些具有警示結構的化合物類別，目前已知對試驗計畫作特定調整，或增加對於基因毒性鑑別力的最佳化頗為重要(例如：帶有偶氮結構的分子、醣苷、需要藉由硝基還原作活化的硝基咪唑(nitroimidazoles)、需要不同嚙齒動物 S9 作代謝活化的非那西汀(Phenacetin)等等)。

6. 目前已有經驗皮膚和結腸誘發微核的體內試驗(Hayashi 等，2007)。在這些組織中進行 DNA 損傷試驗也是一個合適的替代方案。
7. 少數化學物質使用平板摻入法或預培養法更容易被檢測到，但通常是量的差異而不是質的差異(Gatehouse 等，1994)。從製藥工業的經驗得知，對於兩種方法進行藥品測試並沒有產生不同的結果，而且在 IWGT 報告中(Gatehouse 等，1994)，在預培養法中更容易被檢測到的化學分類的例子通常不是藥品，並且在體內基因毒性測試中呈陽性。這些包括短鏈脂肪族亞硝胺、二價金屬、醛類(例如：甲醛、巴卡醛(crotonaldehyde))、偶氮染料(例如：黃色牛油)、吡咯啉生物鹼(pyrrolizidine alkaloids)、烯丙基化合物(異硫氰酸烯丙酯(allyl isothiocyanate)、丙烯醯氯)和硝基(芳香族、脂肪族)化合物。
8. 在體外哺乳動物細胞試驗中，將最高濃度設為 1 mM 的理由如下：測試群包括 Ames 測試和一項體內試驗。這測試群可最大程度地檢測基因毒性致癌物，而非僅仰賴任何單一的試驗。擔憂未能在 Ames 測試或體內基因毒性試驗中被檢測出來，但在超過 1 mM 濃度的體外哺乳動物試驗中才能被檢測出來的化合物(DNA 損傷致癌物)，其可能性非常低。其次，1 mM 的上限支持了危害識別的要素，該濃度高於已知藥品的臨床暴露量，包括那些集中在組織中的藥品(Goodman & Gilman, 2001)，而且高於體內臨床前試驗通常能達到的濃度。某些藥品已知需要較高的臨床暴露才能產生治療效果，例如核苷類似物和某些抗生素。雖然與現有藥品比較效價是申請人的興趣所在，甚至可能在高於上限 1 mM 進行比較，但最終還是由體內試驗來確定與人體安全性的相關性。對於分子量特別低的藥品(例如小於 200)，應考慮使用更高的測試濃度。
9. 部分基因毒性致癌物在體外基因毒性試驗中，若測試濃度未達到一定程度的細胞毒性，則可能無法偵測出來；對 DNA 損傷劑通常在中等程度的毒性下便可以檢測出來(Greenwood 等，2004)。隨著細胞毒性的升高，化合物或其代謝物透過非直接 DNA 損傷的機制，可產生與細胞毒性相關而非基因毒

性的“陽性”結果。此種繼發於非 DNA 靶點損傷的間接誘導 DNA 損傷，更易發生於在某一濃度閾值之上，而在較低的、與藥理學相關濃度時，預期不會發生對細胞進程的干擾。

在細胞遺傳學試驗中，即使已知是弱斷裂劑的致癌劑，在細胞計數減少不超過 50%時也得到陽性結果此外，在毒性濃度下，與 DNA 損傷、突變或致癌無關的化合物也可能引起染色體斷裂。在細胞染色體畸變試驗和體外微核試驗中，生長減少約 50%的限制是合適的。

對於在細胞株進行的細胞遺傳學試驗，測量細胞群生長隨時間的變化(測量培養與對照組細胞數的差異，例如藉由群體倍增(population doubling, PD；註 10)的方法)，是測定細胞毒性的有效方法，因為細胞數目可低估毒性。對於淋巴細胞培養，增殖抑制不超過 50%被認為是足夠的；這可藉由中期畸變試驗的分裂指數(MI)和體外微核試驗的胞質分裂阻滯指數來測定。此外，在體外微核試驗中，由於微核是在有絲分裂後進行計數的，因此需要確認細胞已經過細胞週期。這可以藉由使用細胞鬆弛素 B(cytochalasin B)促進核分裂而不是細胞分裂來確認，從而在雙核細胞中進行微核計數(對於淋巴細胞而言，這是首選方法)。對於細胞株，也可用其他證明細胞增殖的方法，包括如上所述細胞群生長隨時間變化的 PD 法(Kirsch-Volders 等，2003)。

對於 MLA，使用軟瓊脂和微孔兩種方法，將最高濃度設為相對總生長率(RTG)接近 20% (10~20%)的濃度，皆可達到合適的靈敏度(Moore 等，2002)。採用目前標準對已發表數據進行回顧，發現在 MLA 中僅在低於 20% RTG 濃度時得到陽性結果，同時為齧齒動物致癌物的化學物極為少見，而且該類化合物缺乏令人信服的基因毒性致癌劑的證據。因此，當突變僅在低於 20% RTG 濃度下發生時，對結果的評估應該非常謹慎，如果突變比例僅在 $\leq 10\%$ RTG 時增加，則該結果不被認為陽性。

總而言之，在細胞遺傳學試驗中細胞生長/存活減少超過 50%情況下，或在 MLA 中降低超過 80%所得的陽性結果，需要謹慎解讀。雖然以此種細胞毒性/集落存活濃度所處理的細胞進行評估，能達到較高的靈敏性，但也帶來增加非相關陽性結果的風險。以測試群來評估基因毒性的做法，在設計上即為了在不依賴于在高細胞毒性下的單一體外哺乳動物測試下，確保有合適的靈敏度。

若欲決定適當的毒性範圍，以大範圍的濃度範圍先行探索試驗是有用的，但在基因毒性試驗的場合以間隔相近(小於兩倍稀釋)的多個濃度進行試

驗，往往至關重要。可對額外的濃度進行基因毒性測試，但並非所有的濃度都須要做評估。舉例而言，這不是指要為了準確達到細胞生長減少 50%，或 RTG 減少 80%，而進行大量試驗。

10. 對體外細胞遺傳學試驗，採用相對細胞生長測定來評估毒性是合適的，因為細胞計數可能低估毒性(Greenwood 等，2004)。藉由計算群體倍增(見詞彙表)來估計 50%生長減少濃度，已證明非突變劑或非致癌劑得到陽性結果的頻率會降低，而通過直接作用於 DNA 的藥品，能得到可靠的陽性結果。
11. 在某些情況下，可採用從單次或多次給予測試動物受試物後的培養淋巴細胞，檢測中期染色體畸變，就如同可採用骨髓中期細胞。由於循環的淋巴球並不進行複製，因此不會檢測到需要藉由細胞複製才能顯示其基因毒性作用的藥品(例如：某些核苷類似物)。由於某些淋巴球的存活期相對較長，原則上它們具有體內蓄積未修復 DNA 損傷的潛力，這將使當細胞在體外受到刺激進行分裂時畸變率升高。體內淋巴球試驗可以用於染色體斷裂指標的追蹤，但通常使用其他組織，例如肝臟，因為其接觸藥品和代謝物的濃度更高，可為造血幹細胞微核試驗補充更多的資訊。
12. 在測試群中納入第二個體內試驗，可對藥品與/或其代謝物有充分暴露的組織進行檢驗，以確保不具有基因毒性。一小部分認為有遺傳毒性的致癌劑在肝臟試驗中結果為陽性，但在體內骨髓細胞遺傳學試驗中結果卻為陰性。這些例子可能反映出缺乏合適的代謝活性，或缺乏進入骨髓造血細胞的反應中間產物。

DNA 鏈斷裂、DNA 加合物與在轉基因的突變試驗，具有可在許多組織上應用的優點。雖然除了 UDS 試驗外，對於 DNA 鏈斷裂試驗(Comet 和鹼洗脫試驗)、DNA 加合物(共價結合)測定，與轉基因齧齒類動物突變試驗也已有相當多的經驗和已發表的文獻和計畫建議，但國際上仍未對所有這些體內試驗有公認的方案。對於在 MLA 體外試驗中呈陽性、主要誘導大型細胞集落，且在體外中期試驗中未表現染色體斷裂的化合物，應考慮進行體內的突變試驗，例如齧齒動物突變試驗，而非 DNA 股斷裂試驗。UDS 試驗主要適用於能誘導巨大 DNA 加合物，或在 Ames 試驗中呈陽性的化合物。由於細胞毒性會導致 DNA 股斷裂，因此需要小心評估細胞毒性，以避免干擾 DNA 股斷裂試驗的結果。此在體外鹼洗脫試驗已有充分的了解(Storer 等，1996)，但對 Comet 試驗尚未進行完全驗證。原則上，在合適的劑量水準和採樣時間下，DNA 鏈斷裂試驗可整合在重複劑量毒性試驗

由於性成熟動物的肝臟不是高度有絲分裂的組織，第二個試驗通常會使用非細胞遺傳學的終點指標，當分裂肝細胞存在時，如在部分肝切除術後，或在年輕的大鼠(Hayashi 等，2007)，可以對肝臟進行微核分析，以及檢測已知的基因毒性化合物

13. 對於常規的溶媒如甲基纖維素水溶液，通常是適當的，但對於像 Tween 80 這樣的溶媒，可能比急性投予的體積低 30 倍。
14. 若毒理學試驗設計包含額外的血液採集，例如為了測量暴露程度，應該謹慎考慮。因為血液採集會刺激紅血球生成，導致微核血球數量增加，進而干擾微核分析結果。
15. 微核增加可發生於未投予任何基因毒性劑時，而是由於紅血球生成的干擾(例如：再生障礙性貧血、髓外造血作用)、壓力，以及體溫偏低或過高所致(Tweats 等，2007)。血液中脾臟功能的改變，可能會影響微核產生的細胞在血液中的清除，進而導致小幅增加在循環中含微核的紅血球。
16. 短期或重複給藥基因毒性試驗的陽性對照：

對於微核(以及其他細胞遺傳學)試驗，陽性對照之目的是確保評分人員能夠可靠地檢測微核增加。這可藉由急性給予陽性對照的小組別動物(單性別)的週期性試驗(每隔幾個月)中的採樣來實現。對於人工評分，這些樣本可以與每個試驗中評分的編碼載玻片一起進行評估。陽性對照樣本不應因染色性質或微核頻率，而讓判讀者易於識別。對於自動化評分，每個試驗應使用適當的質量對照樣本。

對於其他體內基因毒性試驗，陽性對照之目的是證明所選擇的動物物種、組織和計畫，能可靠地檢測到 DNA 損傷/致突變性的增加。在一個實驗室已證明能在大量的獨立實驗中穩定檢測到適當的陽性對照化合物後，如果不改變實驗條件，通常周期進行有陽性對照的試驗已足夠。然而，對於 Comet 試驗，目前建議採用平行的陽性對照。

17. 確定微核誘導主要因染色體丟失或染色體斷裂所致，應包括對體外或體內微核染色以確定著絲粒是否存在，例如使用螢光原位雜交(FISH)與特定探針，進行著絲粒區域的 DNA 序列研究，或者使用帶標籤的抗體來進行著絲粒蛋白的檢測。如果大多數誘發的微核是著絲粒陽性，表示有染色體丟失。(值得注意的是，即使像秋水仙素和長春花鹼等強微管毒劑，也不能產生 100% 的著絲粒陽性微核，通常是 70%至 80%，在風險評估中公認為是非整倍體誘

導劑)。一替代的方法是進行體外或體內中期結構畸變試驗，若結果是陰性，則暗示微核誘導與染色體丟失有關。

18. 標準誘發的 S9 混合物具比人 S9 更高的活化能力，並且如果未添加特異性的輔助因數，則缺乏第二階段解毒能力。此外，體外高濃度測試物可能發生非特異的活化作用(Kirkland 等，2007)。使用人 S9 或其他與人體相關的活化系統進行基因毒性測試，可能有助於判斷結果的相關性。分析基因毒性試驗中培養物的代謝物特性，並與臨床前動物物種(在未經誘導的微粒體或肝細胞，或體內)或人體樣本中已知的代謝物特性進行比較，也有助於確定測試結果的相關性(Ku 等，2007)。此外，後續的研究通常會集中於進行體內肝臟試驗。體外試驗中對 S9 呈現陽性結果的化合物在體內試驗中未必會誘發基因毒性，因為有可能不存在相應的代謝物、代謝物產生量極小、被代謝或迅速排出體外，這些因素表明化合物在體內不會構成風險。

七、 詞彙表

鹼洗脫試驗：

見 DNA 股斷裂試驗。

非整倍體：

細胞或生物體中染色體數目不成倍數的改變。

鹼基置換：

核苷酸序列中單個或多個鹼基被其他碱基替代，從而可導致蛋白質的改變。

細胞增殖：

細胞進行分裂並產生新的子細胞的能力。

著絲粒/著絲點：

染色體內部的結構。對於姊妹染色分體進行連結與紡錘絲將子染色體移動到兩極並確保有包含子核等程序屬於必要結構。

Clastogen：

能夠引起染色體結構斷裂的物質，通常可以藉由光學顯微鏡進行檢測。

細胞複製效率：

單一細胞進行複製的效率。通常是在適合的環境內種下少量細胞後再行測量。

Comet 試驗：

見 DNA 股斷裂試驗。

培養滿度：

通過目視檢查對細胞培養中的密度進行量化。

細胞遺傳學評估：

透過光學顯微鏡觀察有絲分裂或減數分裂的染色體結構，或進行微核分析。

DNA 加合物：

化學物與 DNA 的共價結合產物。

DNA 修復：

DNA 損傷後，原始 DNA 序列的重建。

DNA 股斷裂：

DNA 單鏈或雙鏈被切斷。

DNA 股斷裂試驗：

透過鹼處理，將特定類型的 DNA 損傷轉換為鏈斷裂，可藉由測量濾膜遷移速率的鹼洗脫技術，或藉由單細胞凝膠電泳或 Comet 測試(將細胞固定在載玻片的凝膠薄層，通以電流，使 DNA 斷裂短片段從細胞核中遷移出形成“彗尾”)進行檢測，在顯微鏡下觀察染色細胞，測定 DNA 遷移的程度。

框移突變：

基因的核苷酸序列中，插入或缺失一個或兩個相鄰鹼基的一種突變(遺傳密碼改變)。這可導致蛋白質的改變或縮短。

基因突變：

單一基因或其調控序列中可檢出的一種持久性改變。這些改變可以是點突變、插入或刪除。

遺傳指標：

所探討基因變化的確切類型或類別(例如：基因突變、染色體畸變、DNA 鏈斷裂、DNA 修復、DNA 加合物形成等)。

基因毒性：

泛稱各種機制導致發生的任何有害的遺傳物質改變。

微核：

細胞中帶有核 DNA 的粒子，可含有整條染色體、或有著絲粒或無著絲粒的染色體斷裂片段。

有絲分裂指數：

標本中處於有絲分裂各階段的細胞數佔不處於有絲分裂階段(分裂間期)細胞數的百分比。

染色體數目變化：

染色體數目與原本的單倍體或二倍體不同；對於細胞株，其染色體數目與原型染色體不同。

質體：

加入到正常細菌基因組中的遺傳物質。一個質粒可能插入宿主染色體或形成染色體外單元。

點突變：

通常僅限於單個 DNA 鹼基對的遺傳密碼改變。

嗜多色性紅血球：

分化中期的未成熟紅血球，因其含有核糖體，可通過 RNA 的選擇性染色與成熟的正染紅血球(不含核糖體)區分。

多倍體：

細胞中染色體倍數的數目變化，大致為單倍體數目的整數倍。核內複製是多倍體的一種形態類型，其為染色體對在中期進行聯合成為“雙分染色體”。

細胞族群倍增：

有數種計算方式，其中一種如下式：

群體倍增(PDs)=最終計數(N)除以起始(基線)計數(X_0)的比值，取對數後，再除以 $\log 2$ ，亦即 $PD = [\log(N \div X_0)] \div \log 2$ 。

重組：

DNA 斷裂後再進行平衡或不平衡的重新連接。

相對總生長率：

此細胞毒性的測量，採用相對混懸增長率(基於從給藥開始至給藥後的第二天的細胞丟失及細胞生長)，乘以突變量化分析時的相對接種效率而得出。

單細胞凝膠電泳試驗：

又稱 Comet 試驗，見 DNA 鏈斷裂試驗。

存活率(在致突變試驗中)：

存活細胞與死亡細胞的比例。通常經過一段給藥時間後，採用染色或集落計數的方法來確定。

轉基因：

將外源性或外來基因導入至宿主體細胞或生殖系細胞的基因組中。

非程序式 DNA 合成(UDS)：

為應對 DNA 損傷，在 S 期以外的細胞週期中發生的 DNA 合成。通常與 DNA 切除修復有關。

八、 参考文献

1. Ashby J, Paton D. The influence of chemical structure on the extent and sites of carcinogenesis for 522 rodent carcinogens and 55 different human carcinogen exposures. *Mutat Res* 1994;286:3-74.
2. Corvi R, Albertini S, Hartung T, Hoffmann S, Maurici D, Pfuhler S et al. ECVAM Retrospective Validation of the in vitro micronucleus test (MNT). *Mutagenesis* 2008;23:271-283.
3. Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T et al. Report from the working group on bacterial mutation assays: international workshop on standardisation of genotoxicity test procedures. *Mutat Res* 1994;312:217-33.
4. Goodman & Gilman. The pharmacological basis of therapeutics. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. 10th ed. New York: McGraw-Hill Professional 2001.
5. Greenwood SK, Hill RB, Sun JT, Armstrong MJ, Johnson TE, Gara JP et al. Population Doubling: A simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results. *Environ Mol Mutagen* 2004;43:36-44.
6. Hamada S., Sutou S, Morita T, Wakata A, Asanami S, Hosoya S et al. Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: summary of the 13th collaborative study by the collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)–Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Environ Mol Mutagen* 2001;37:93-110.
7. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 2003;18:45-51.
8. Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Adler I, Blakey DH, Dertinger SD et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:234-52.
9. Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Blakey DH, Dertinger SD, Abramsson-Zetterberg L et al. In vivo erythrocyte micronucleus assay. III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mutat Res* 2007;627:10-30.
10. Heddle JA, Dean S, Nohmi T, Boerrigter M, Casciano D, Douglas GR et al. In vivo transgenic mutation assays. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:253-9.

11. Hotchkiss CE, Bishop ME, Dertinger SD, Slikker W, Moore MM, MacGregor JT. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes IV: an index of chromosomal damage in the rhesus monkey (*macaca mulatta*). *Toxicol Sci* 2008 ;102:352-8.
12. Kasper P, Uno Y, Mauthe R, Asano N, Douglas G, Matthews E et al. Follow-up testing of rodent carcinogens not positive in the standard genotoxicity testing battery: IWGT workgroup report. *Mutat Res* 2007;627:106-116.
13. Kenelly JC, Waters R, Ashby J, Lefevre PA, Burlinson B, Benford DJ et al. In vivo rat liver UDS assay. In: *Supplementary Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures*. Kirkland DJ, Fox M, editors. Cambridge University Press 1993;52-77.
14. Kirkland DJ, Pfuhler S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F et al. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: report of the ECVAM workshop. *Mutat Res* 2007;628:31-55.
15. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res* 2003;540:153-63.
16. Kissling GE, Dertinger SD, Hayashi M, MacGregor JT. Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: dependence on number of cells scored and inter-animal variability. *Mutat Res* 2007;634:235-40.
17. Ku WW, Bigger A, Brambilla G, Glatt H, Gocke E, Guzzie PJ et al. Strategy for genotoxicity testing-metabolic considerations. *Mutat Res* 2007;627:59-77.
18. MacGregor JT, Bishop ME, McNamee JP, Hayashi M, Asano N, Wakata A et al. Flow Cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat. *Toxicol Sci* 2006;94:92-107.
19. Moore MM, Honma M, Clements J, Harrington-Brock K, Awogi T, Bolcsfoldi G et al. Mouse lymphoma thymidine kinase locus gene mutation assay: follow-up international workshop on genotoxicity test procedures–New Orleans, Louisiana, April 2000. *Environ Mol Mutagen* 2002;40:292-9.
20. Moore MM, Honma M, Clements J, Bolcsfoldi G, Burlinson B, Cifone M et al. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up meeting of the international workshop on genotoxicity testing–Aberdeen, Scotland, 2003–Assay acceptance criteria, positive controls, and data evaluation. *Environ Mol Mutagen* 2006;47:1-5.

21. Müller L, Kasper P. Human biological relevance and the use of threshold arguments in regulatory genotoxicity assessment: experience with pharmaceuticals. *Mutat Res* 2000;464: 9-34.
22. OECD Guidelines for Genetic Toxicology 1997.
23. Scott D, Galloway SM, Marshall RR, Ishidate M Jr, Brusick D, Ashby J et al. Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICP EMC task group 9. *Mutat Res* 1991;257:147-204.
24. Storer RD, McKelvey TW, Kraynak AR, Elia MC, Barnum JE, Harmon LS et al. Revalidation of the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds. *Mutat Res* 1996;368:59-101.
25. Suzuki H, Ikeda N, Kobayashi K, Terashima Y, Shimada Y, Suzuki T et al. Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats. A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) - Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Mutat Res* 2005;583:133-45.
26. Thybaud V, Aardema M, Clements J, Dearfield K, Galloway S, Hayashi M et al. Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. *Mutat Res* 2007;627:41-58.
27. Tweats DJ, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Morita T et al. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. *Mutat Res* 2007;627:78-91.
28. Tweats DJ, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Morita T et al. Report of the IWGT working group on strategy/interpretation of regulatory in vivo tests. II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. *Mutat Res* 2007;627:92-105.
29. Wakata, A, Miyamae Y, Sato S, Suzuki T, Morita T, Asano N et al. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. *Environ Mol Mutagen* 1998;32:84-100.