

**ICH S8：人體用藥免疫毒性試驗指引
(草案)**

**(Immunotoxicity Studies for Human
Pharmaceuticals)**

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 2005 年發布 ICH S8 (Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals) 指引，在於針對下列事項提出建議：(1)可供辨識有免疫毒性之虞的化合物之非臨床試驗方法、(2)免疫毒性測試的證據權重判斷方法。基於前述目的，在此將免疫毒性定義為非預期的免疫抑制或增強效果。因藥品效果而引發之過敏或自體免疫反應不屬於此範疇。

目錄

一、緒論-----	1
(一)目的-----	1
(二)背景-----	1
(三)適用範圍-----	2
(四)概述-----	2
二、指引-----	2
(一)評估潛在免疫毒性時須考量之因子-----	2
1.標準毒性試驗-----	3
2.藥理性質-----	4
3.目標病患族群-----	4
4.結構相似性-----	4
5.藥品在體內的動向-----	4
6.臨床試驗或臨床使用觀察到的跡象-----	4
(二)證據權重評估-----	4
三、額外免疫毒性試驗之選擇與設計-----	5
(一)目的-----	5
(二)分析方法選擇-----	5
(三)試驗設計-----	5
(四)額外免疫毒性試驗評估與進一步試驗之需求-----	6
四、臨床試驗時免疫毒性試驗之選擇時機-----	6
五、註釋-----	6
圖 1：免疫毒性評估之建議流程-----	7
附錄：評估免疫毒性的方法-----	8

ICH S8：人體用藥免疫毒性試驗指引

一、緒論

(一) 目的

制定本指引之目的在於針對下列事項提出建議：(1)可供辨識有免疫毒性之虞的化合物之非臨床試驗方法、(2)免疫毒性測試的證據權重判斷方法。基於前述目的，在此將免疫毒性定義為非預期的免疫抑制或增強效果。因藥品效果而引發之過敏或自體免疫反應不屬於此範疇。

(二) 背景

人體用藥的標準開發程序應包含對免疫系統是否具有不良反應的評估。對免疫性統的毒性涵蓋多種不良反應，包括免疫抑制或增強。免疫抑制有可能導致對感染原或腫瘤細胞的抵抗力低下。反之，免疫增強則可能促進自體免疫疾病或過敏反應。此外，亦有可能使藥品或藥品－蛋白質加成物被視作外來物質，而產生抗藥反應，導致在後續施藥時發生過敏。過去與藥品有關的科學研究、發展及驗證多半聚焦於評估開發中藥品可能具有的免疫抑制或接觸致敏性質。人體用藥尚無檢驗對呼吸系統或全身之致敏性(抗原性)或對特定藥品之自體免疫性的相關規範。

免疫抑制或增強與兩類藥品有關：

- 1) 調整免疫功能(例如防止對移植的器官產生排斥反應)的治療性藥品，其所誘發之負面免疫抑制效應可視為藥效動力反應過度者。
- 2) 並非以影響免疫功能為目的，卻因為各種原因，例如免疫細胞壞死或凋亡，或與目標組織和非目標的免疫細胞中均存在的細胞受體發生反應而產生免疫毒性者。

治療癌症用的抗增生藥品即為有可能導致非預期免疫抑制性之實例。在此類事例中，於非臨床試驗發現不良反應可直接判定該藥品對人體具免疫毒性。這是因為藥品風險評估的目標組織通常係由快速分裂型細胞組成，例如取自骨髓的免疫系統前驅細胞，使得某些檢驗免疫毒性方法毫無價值。此時，對免疫功能不良反應可透過非臨床試驗所得之藥理活性進行頗為可靠的預測與評估。對於同樣並非以抑制免疫反應為目的之其他類型化合物，藥效動力反應過

度與非目標所產生的反應間的分野可能較不明顯。舉例而言，某些消炎化合物會影響特定先天免疫功能，但卻未必會影響後天免疫反應。

(三) 適用範圍

本指引以提供人體用藥之免疫毒性非臨床測試的相關建議為主。範圍以非預期之免疫抑制與增強為限，不包括致敏性或特定藥品之自體免疫性。

本指引適用於新開發之人體用藥，亦適用於已上市但欲變更適應症或現有標籤，其內容可能導致免疫毒性相關之潛在問題者。此外，本指引或許亦可適用於在臨床試驗中，或在取得上市許可後，發現具有免疫毒性的藥品。本準則不適用於 ICH S6 準則(註釋 1)範圍內之生技醫藥產品與其他生技產品。

對於致敏作用或過敏的既有指引仍具效力，不受本指引影響。個別免疫毒性試驗應如何進行不在本指引的範圍內。一般方法論可參閱附錄。

(四) 概述

本指引全篇依循下列通則：

- 1) 所有新開發之人體用藥均應接受評估以探討是否具免疫毒性。
- 2) 可用的方法包括標準毒性試驗(standard toxicity studies, STS)與必要時額外進行之免疫毒性試驗。檢視是否有必要進行額外的免疫毒性試驗時，可依照證據權重法則檢視第二章第(一)節所述之因子後決定之。

本指引之敘述符合免疫毒性評估之建議決策過程，如流程圖(圖 1)所示。測試方法的細節可詳見附錄。

二、 指引

(一) 評估潛在免疫毒性時須考量之因子

決定是否有必要進行額外的免疫毒性試驗時，可由下列各方面判斷應納入考量的因子：(1)標準毒性試驗結果、(2)藥品藥理性質、(3)目標病患族群、(4)與已知免疫調節劑在結構上的相似性、(5)藥品在體內的動向、(6)臨床資料。

對潛在免疫毒性的初步篩檢須包括標準毒性試驗。使用齧齒類與非齧齒類動物的試驗數據，從最初的短期試驗乃至較長的重複劑量試驗，均應納入考量。應評估之參數與組織病理發現可詳見附錄。

1. 標準毒性試驗

須評估標準毒性試驗所得的數據，以確認是否有跡象顯示藥品具免疫毒性。須注意的跡象如下：

- 1) 血液的變化，例如白血球減少症/白血球增多症、顆粒球減少症/顆粒球增多症、淋巴球減少症/淋巴球增多症等。
- 2) 免疫系統器官重量或組織發生變化(例如胸腺、脾臟、淋巴結、骨髓等有變化)。
- 3) 血清球蛋白發生變化但無合理解釋(例如藥品對肝臟或腎臟產生作用)可能意味著血清免疫球蛋白有異。
- 4) 感染次數增多。
- 5) 若腫瘤發生頻率變高但無合理解釋，例如遺傳毒性、荷爾蒙、肝酶誘發等，則可視為發生免疫抑制的徵兆。

這些參數的變異反映出免疫系統遭到抑制或加強活化。免疫力參數值降低通常反映免疫抑制，而數值上升則通常反映免疫增強。然而，這並非絕對，且在某些案例中可能恰好相反。

免疫毒性評估跟對其他內臟系統的毒性評估一樣，都必須包括以下項目：

- 變化在統計學與生物學上的意義
- 效應的嚴重程度
- 劑量與暴露量的關係
- 超出預期臨床劑量後的安全性因子
- 用藥時間長短
- 使用的動物物種數與所影響的指標
- 可能係因為其他因子(例如壓力)所致的變化
- 可能的細胞標靶及/或作用機制
- 導致這些變異的劑量與導致其他類型毒性的劑量間的關係

- 效應的可逆性

2. 藥理性質

若測試的某化合物具有可能影響免疫系統的藥理性質(例如消炎藥)，應考慮額外進行免疫毒性測試。在探討化合物對免疫系統影響的能力之非臨床藥理試驗中，其所獲取之資訊可應用證據權重法則，決定是否須額外進行免疫毒性測試。

3. 目標病患族群

若藥品的目標病患族群絕大多數都因為病況或同步化療而發生免疫功能不全，則可能必須額外進行免疫毒性試驗。

4. 結構相似性

化合物若在結構上與已知具免疫抑制力的化合物相似，則應考慮額外進行免疫毒性試驗。

5. 藥品在體內的動向

若化合物及/或其代謝物在免疫系統細胞中濃度居高不下，則應考慮額外進行免疫毒性試驗。

6. 臨床試驗或臨床使用觀察到的跡象

施用藥品的病患若在臨床上出現疑似免疫毒性的跡象，則應考慮額外進行免疫毒性試驗。

(二) 證據權重評估

前述各項因子的相關資訊須以證據權重法則進行評估以確認是否有值得注意之處。在任一區域的發現達到一定程度時，即應額外進行免疫毒性試驗。若在兩個以上的因子發現跡象，即便單獨因子之分量不足，仍應額外進行免疫毒性試驗。若未額外進行免疫毒性試驗，試驗委託者須提出合理解釋。

三、 額外免疫毒性試驗之選擇與設計

(一) 目的

若發現值得注意之處，應考慮額外進行免疫毒性試驗，確認該化合物之潛在免疫毒性。免疫毒性試驗亦有助於確認會影響可逆性的細胞類型及化合物的作用機制。此類資訊尚能促進對潛在風險的瞭解，甚至協助選擇應於臨床試驗中檢測的生物指標。

(二) 分析方法選擇

若依證據權重法則評估後發現有必要額外進行免疫毒性試驗，有數種分析方法可選擇。若標準毒性試驗的數據變化顯示發生免疫毒性，則須視所觀察到的免疫系統變化以及化合物所屬的類型，選擇何種免疫毒性試驗較佳。建議執行免疫功能試驗，例如 T 細胞依賴性抗體反應(T-cell dependent antibody response, TDAR)試驗。若有已知免於 T 細胞依賴性抗體反應的特定類型細胞在標準毒性試驗中受到影響，可執行分析方法測量該受影響的特定類型細胞之功能(參閱附錄)。若並未發現特定目標，建議執行免疫功能試驗，例如 T 細胞依賴性抗體反應試驗。

此外，白血球族群免疫分型(immunophenotyping)這種非功能性分析方法可用於辨識受影響的特定細胞族群，或許還能提供有用的臨床生物指標。

(三) 試驗設計

若欲評估藥品所誘發之免疫毒性，以嚙齒類動物連續 28 日每日施藥，是廣為接受的試驗設計。文獻中亦有敘述如何將免疫毒性的分析方法修改為適用於非嚙齒類動物。免疫毒性試驗所用之動物物種、品系、劑量、給藥路徑等須盡可能與發現不良免疫效應的標準毒性試驗一致。除了非人靈長動物外，試驗中通常並用雌雄兩性。若僅使用單一性別，須提出合理解釋。試驗所用之高劑量須高於無明顯不良反應劑量(no observed adverse effect level, NOAEL)，但低於會因壓力誘發變化之劑量(見附錄第一章第(四)節)。建議採用複數劑量，確立劑量－反應關係以及未觀察到遺傳毒性的劑量。

(四) 額外免疫毒性試驗評估與進一步試驗之需求

額外免疫毒性試驗的結果必須加以分析，評估是否有足夠數據可合理判定發生免疫毒性的風險：

1. 額外試驗可能未發現免疫毒性之風險，故無須進一步作試驗。
2. 額外試驗可能發現有免疫毒性的風險，但未能提供充分數據進行合理的風險效益評估。在此情形下，進行進一步的測試或可提供風險效益評估所需的充分資訊。
3. 若整體風險效益評估顯示免疫毒性的風險在可接受範圍內及/或可透過風險管理計畫，則或許無須作進一步動物試驗。

四、 臨床試驗時免疫毒性試驗之選擇時機

若依證據權重法則所做評估顯示應額外進行免疫毒性試驗，則應於將藥品施用於較大病患族群，通常為第三期之前完成試驗。如此一來，對免疫系統參數的監測可以在適當處與臨床試驗相整合。額外進行免疫毒性試驗的時機須依所試驗之化合物性質而定，若額外免疫毒性試驗結果為陽性時，則依所需進行的臨床試驗類型而定。若目標病患族群免疫功能不全，可將免疫毒性試驗的時機提前至更早的藥品開發階段。

五、 註釋

1. ICH S6 Guideline: Preclinical Safety Evaluation for Biotechnological-Derived Pharmaceuticals; July 1997.
2. ICH E2E Pharmacovigilance planning (Pvp) - Scientific guideline; Jun 2005.

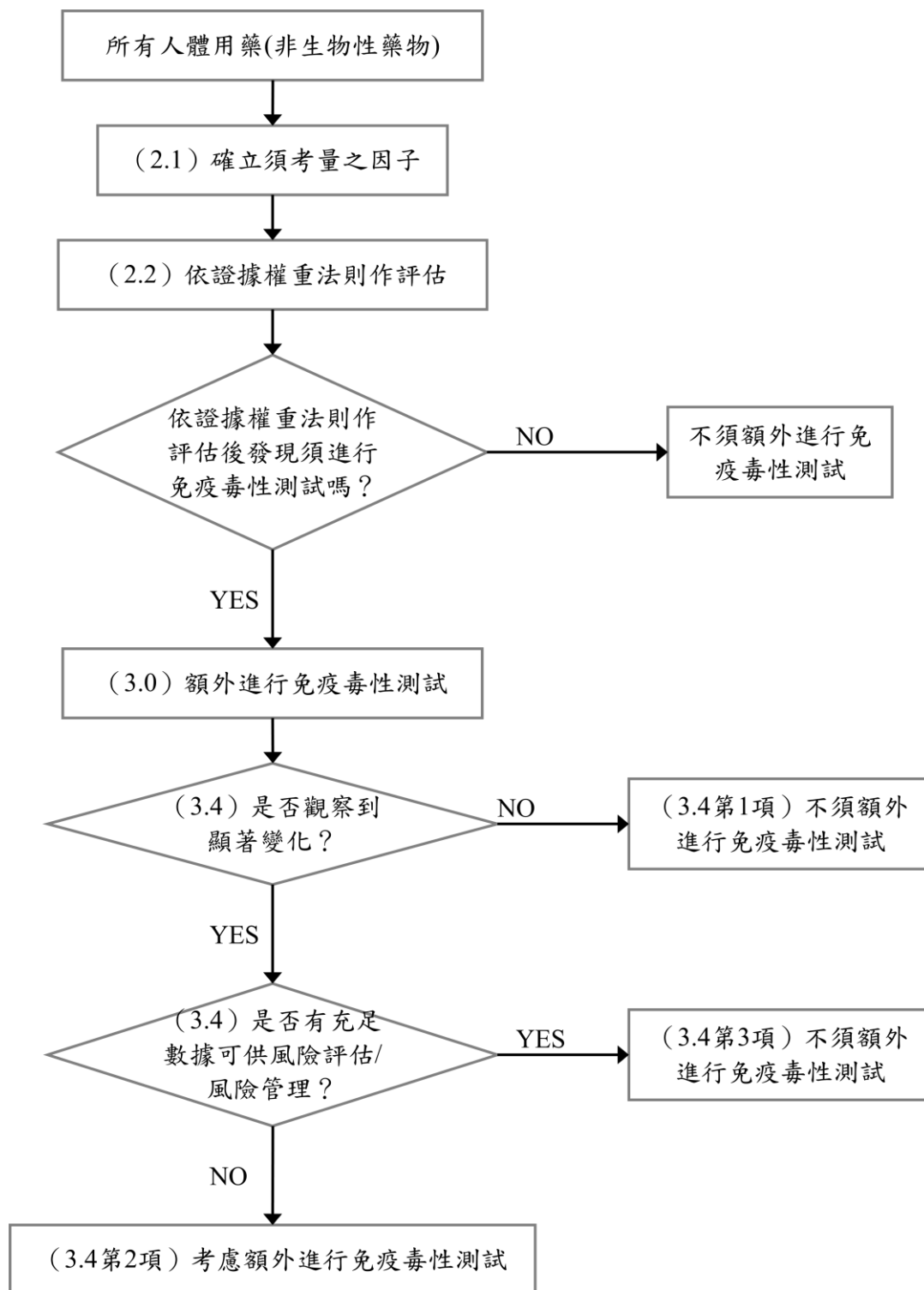


圖1 免疫毒性評估之建議流程

附錄：評估免疫毒性的方法

一、標準毒性試驗

下表列舉標準毒性試驗中與免疫毒性相關所應評估的參數。這些參數(包括血液與臨床參數)以及取得樣本與評估組織切片的方法在專業的毒理病理學組織發行的刊物中有較詳盡的說明。

參數	特定成分
血液學	白血球總數與絕對白血球分類總數
臨床化學	球蛋白濃度 ¹ 與A/G比
巨觀病理學	淋巴器官/組織
器官重量	胸腺、脾臟(非強制性：淋巴結)
組織學	胸腺、脾臟、引流淋巴結與至少再一種淋巴結、骨髓 ² 、派亞氏淋巴叢(Peyer's patch) ³ 、BALT ⁴ 、NALT ⁴

¹ 若球蛋白濃度產生無法解釋的變化，則應測量免疫球蛋白濃度。

² 若末梢血液細胞株或血液學方面觀察到無法解釋的變化則應對骨髓進行細胞學評估。

³ 限口服藥。

⁴ 限吸入用或經由鼻腔給藥。BALT 為 bronchus-associated lymphoid tissues(支氣管淋巴組織)之縮寫，而 NALT 為 nasal-associated lymphoid tissues (鼻淋巴組織)之縮寫。

(一) 血液學與臨床化學

建議以白血球總數與絕對白血球分類總數評估遺傳毒性。評估球蛋白濃度變化時須將其他因子(例如肝毒性、腎毒性)同時納入考量。血漿白蛋白濃度變化有可能代表血漿免疫白蛋白濃度發生變化。雖然血漿免疫白蛋白濃度對於免疫抑制是敏感度不足的指標，其濃度變化在特定情形下有助瞭解目標細胞族群或作用機制。

(二) 巨觀病理學與器官重量

屍體解剖時須檢視所有淋巴組織的巨觀變化。然而，啮齒類的派亞氏淋巴叢因為尺寸微小，會使這項工作較為困難。脾臟與胸腺重量須作紀錄。為求盡量縮小犬類與猴類在腎臟重量上的差異，建議解剖時應先放血。胸腺會因年老而萎縮，使得正確重量難以取得。

(三) 組織病理檢查

應評估脾臟與胸腺的組織病理變化，作為全身免疫毒性之指標。流過或緊貼施藥點(暴露於最高濃度的藥品之下)的淋巴組織亦應予以評估。這些施藥點包括用藥途徑為口服的派亞氏淋巴叢與腸系膜淋巴結，用藥途徑為吸入的支氣管淋巴組織，用藥途徑為吸入或鼻腔(可行的情況下)的鼻淋巴組織，以及用藥途徑為皮膚、肌肉注射、皮內注射、鞘內腔注射、皮下注射等的最近端引流淋巴結。特定淋巴結與額外淋巴結的選擇須由申請人依其經驗決定。對於靜脈注射藥品，脾臟為可供考慮的引流淋巴組織。

敘述用以記錄變化的淋巴組織以及報告淋巴組織腔室內與施藥相關的變化時，建議以半定量的形式作敘述。

(四) 如何解讀與壓力相關的變化

對於標準毒性試驗，劑量接近或達最大耐受劑量時可能導致與壓力有關的變化(例如由於藥效動力反應過度而起)。這些對免疫系統的效應或許可透過提升皮質酮或皮質醇分泌，或藉由增加其他介質而進行介導。常見與壓力相關的免疫系統變化包括循環嗜中性白血球增生、循環淋巴球減少、胸腺重量降低、胸腺皮層細胞性(cellularity)降低與相關組織病理變化、脾臟與淋巴結細胞性變化等。此外，腎上腺重量增加及/或腎上腺皮質增生的組織學徵兆也是可觀察到的現象。胸腺重量降低伴隨如體重與活動力降低等臨床徵兆時，常被歸因於壓力，但這些發現本身並不足以成為壓力誘發免疫毒性的證據。關於壓力的證據須有足夠說服力，才能作為不額外進行免疫毒性試驗的理由。

二、 額外免疫毒性試驗

(一) 分析方法與驗證

大體而言，應選擇廣為採用且已證明具適當敏感度的免疫毒性試驗以及對已知免疫抑制劑有充分特異性的免疫毒性試驗。然而，在某些情況下，廣泛驗證可能尚未完成，且/或其分析方法尚未廣泛採用。若是這種情形，所選用的分析方法須有科學或機轉方面的基礎，而且在可能情況下須有適當的陽性對照組(positive control)。

不同實驗室所作的各種類型免疫毒性測試所得到的反應各有差異。在大多數的情形中，這樣的差異不會對於分析方法評估免疫毒性的能力造成影響。然則，為了確保分析方法有適當表現出並保證實驗室所展現的熟練度，應觀察多個標準技術參數以資驗證。這些參數包括分析方法內與分析方法間的精確性、技術人員對技術的精確性、定量極限、定量線性區、測試樣本穩定度等。此外，還應確認分析方法對已知免疫抑制劑的敏感度。建議除了使用非人靈長動物的試驗外，每間實驗室在測試正控制時均同時測試一個待測的化合物，或是定期執行此作業，以展現其熟練度。

關於免疫分型，若在技術上經適當驗證，則或許無須在每一場試驗均加入正控制。

免疫毒性試驗須符合實驗室優良操作規範(Good Laboratory Practices, GLP)。須知某些特殊的分析方法，如下文所列者，或許並未完全符合實驗室優良操作規範。

(二) T細胞依賴性抗體反應試驗

可以藉由已知的T細胞依賴性抗體(例如羊紅血球細胞(sheep red blood cells, SRBC)或鑰孔蟲血藍蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH))來進行T細胞依賴性抗體反應試驗，以取得強健的抗體反應。所選用的指標須經證實為最適合所選分析方法與試驗動物者。

免疫作用的抗體不得在缺乏合理解釋下與佐劑合用。明礬唯有在非人靈長動物的場合下方得使用。相對T細胞依賴性抗體反應可能隨品系而異，尤其在小鼠的場合更是如此。在遠交系大的場合，同一組的個體之間可能呈現顯著差異。使用近親品系大鼠與充足的暴露量數據可與標準毒性試驗所用的品系銜接。

抗體可用 ELISA 法或其他免疫分析方法測定。這項方法勝過形成抗體的細胞反應的優點之一在於樣本可在試驗中逐一採集。若是猴類，個體間在反應動力特徵的高度差異使得逐次採集血液樣本有其重要性。在這樣的試驗中，數據可以數個樣本採集日的抗體反應總和形式來表示(例如 ROC 曲線下方面積)。

當以羊紅血球細胞抗原施行 ELISA 時，覆於盤上的捕捉抗原的製備極為重要。整個固定紅血球或膜製備都可以作為羊紅血球細胞捕捉抗原。ELISA 的結果以濃度或滴定量的形式表之皆可，唯不建議以光密度的形式表之。

(三) 免疫分型

免疫分型係利用抗體來辨識及/或計算白血球亞型。通常免疫分型是經由流式細胞術或免疫組織化學染色進行之。

流式細胞術應用在計算特定細胞族群時並不算是功能性分析方法。不過，該方法可用以測量抗原特定之淋巴細胞免疫反應。取自末梢血液的數據可以在銜接臨床試驗時派上用場，因為臨床試驗也會分析末梢血液淋巴細胞。評估與用藥相關的變化時建議採用白血球亞型的絕對值與比例。

免疫組織化學染色勝過流式細胞術的優點之一在於一旦發現免疫毒性的跡象，可以對來自標準毒性試驗的組織進行回溯分析。此外，亦可觀察特定淋巴組織腔室內的細胞類型變化。對於某些物種，部分淋巴細胞標記對福馬林固定較敏感，而且唯有在以特定固定劑固定的組織或快速冷凍的組織才能定位。以免疫組織化學染色法定量淋巴細胞與染色度相對較困難。

若以免疫分型試驗分析或辨識特定淋巴細胞族群的變化，欲使用的淋巴器官及/或末梢血液須以所觀察到的變化為基礎作選擇。免疫分型很容易可與標準重複劑量毒性試驗整合，因而可在給藥與無給藥期間(逆轉期)監看發生的變化。

(四) 自然殺手細胞活性分析

若免疫分型試驗顯示數量有變化，或標準毒性試驗顯示病毒感染率增加，或有需要因應其他因子時，可執行自然殺手(natural killer, NK)細胞活性分析。大體上，所有的自然殺手細胞分析都是體外(ex vivo)的分析方法，使用的組織(例如脾臟)或血液取自施用過受試化合物的試驗動物。細胞製備與經 ^{51}Cr 標記的目標細胞一起培養。涉及非放射性標記的新方法經適當驗證後即可使用。應分析不同的作用器(effector)對目標細胞的比，以期每一種分析方法都能充分量測細胞毒性並產生曲線。

(五) 宿主抗性試驗

宿主抗性試驗是將分組後的小鼠或大鼠試用不同劑量的試驗化合物搭配不同濃度的病原(細菌、黴菌、病毒、寄生蟲等)或腫瘤細胞。在載體和施用過試驗化合物的試驗動物身上所觀察到的病原感染力或腫瘤負荷的對比結果可用以確認試驗化合物是否有能力改變宿主抗性。目前已經開發出各種模式來分析各種病原，如單核細胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、流行性感感冒病毒(influenza virus)、巨細胞病毒(cytomegalovirus)、亞力瘧蟲(*Plasmodium yoelii*)、旋毛蟲(*Trichinella spiralis*)等等。B16F10 黑色素瘤與 PYB6 肉瘤的腫瘤細胞株均已應用於小鼠的腫瘤宿主抗性模式中。

由宿主抗性分析所提供的資訊可瞭解宿主對特定分級的感染原或腫瘤細胞的易感性，因而對風險管理規劃有所影響。另外，宿主抗性分析在辨識或確認受試驗化合物影響的細胞類型上也扮演要角。更重要的是，宿主抗性分析涉及先天免疫機制，而目前尚無針對這些機制的免疫功能分析方法可用。執行宿主抗性分析前，應審慎考量試驗化合物對有機體或腫瘤細胞生長與致病性的直接或間接(非免疫介導性)影響。舉例而言，能抑制特定腫瘤細胞增生的化合物似乎能提升宿主抗性。此時建議以體外(in vitro)分析方法測試對有機體的直接影響。

(六) 巨噬細胞/中性白血球功能

目前已有研究發表數種試驗動物物種的體外(in vitro)巨噬細胞/中性白血球功能分析方法(吞噬作用、氧爆作用、趨化性、細胞溶解活性)。這些分析方法評估體外環境內暴露於試驗化合物的細胞或取自於施用試驗化合物的細胞(體外分析方法)，以分析其巨噬細胞/中性白血球功能。此外亦可評估體外環境如暴露於試驗化合物的影響。亦可透過體內(in vivo)分析方法評估網狀內皮細胞吞噬輻射或螢光標記的目標時所受之影響。

(七) 測量細胞介導免疫力的分析方法

測量細胞介導免疫力的分析方法在發展上並不如測量抗體反應的分析方法那般成熟。這些分析方法屬於體內(in vivo)分析方法，利用抗原進行敏化作用。其指標為藥品調控對試藥反應的能力。文獻中，大鼠與小鼠均對蛋白質免疫作用與試藥發生延遲性過敏(delayed-type hypersensitivity, DTH)反應。使用接觸性敏化劑的試驗模式已應用於小鼠，但尚未通過詳細驗證，亦未受到廣泛應用。小鼠可藉由病毒、腫瘤細胞株、異體移植等方式作為抗原攻擊以激發細胞毒性T細胞反應。文獻亦有報告猴類的延遲性過敏反應。然而，要在猴類身上穩定

再現這些反應極為困難。須注意勿將延遲性過敏反應認為經抗體或補體介導的阿瑟氏反應(Arthus reaction)。