

衛生福利部
食品藥物管理署

藥品非臨床試驗安全性規範

(第五版修訂草案)

中華民國一〇三年四月廿三日

藥品非臨床試驗安全性規範

制定過程

制(修)訂者	文件版本	生效日期	制(修)訂簡述
衛生署藥政處	1.0	87年6月	前衛生署訂定發布
衛生署藥政處	2.0	87年9月	前衛生署修正發布
衛生署藥政處	3.0	89年6月8日	衛署藥字第 89033853號公告
食品藥物管理局藥品組	4.0	102年5月29日	FDA藥字第 1021403986號公告
食品藥物管理署藥品組	5.0	103年4月23日	FDA藥字第 1031402844號公告

衛生福利部食品藥物管理署 公告

受文者：藥品組

發文日期：中華民國103年4月24日

發文字號：FDA藥字第1031402844號

附件：

主旨：公告訂定「藥品非臨床試驗安全性規範(草案第五版)」。

公告事項：

一、訂定機關：食品藥物管理署。

二、「藥品非臨床試驗安全性規範(草案第五版)」內容詳見本署網站（網址：<http://www.fda.gov.tw>）之「政府資訊公開>法規資訊」網頁。

三、對於本公告內容有任何意見或修正建議，請於本公告次日起20日內陳述意見或洽詢：

(一)承辦單位：食品藥物管理署藥品組

(二)地址：台北市南港區昆陽街161-2號

(三)電話：(02) 27877452

(四)傳真：(02) 27877498

(五)電子郵件：horngyeh@fda.gov.tw

說明：

- 一、本次修訂「藥品非臨床試驗安全性規範(草案第五版)」，主要以ICH歷年對於非臨床安全性試驗議題之最新指引文件版本為依據，對藥品臨床試驗及新藥上市查驗登記之申請所需的「非臨床安全性試驗」相關規範進行修訂。
- 二、本次修訂之依據除參酌ICH指引文件新版內容，也參考Redbook (美國FDA發布之Toxicological principles for the safety assessment of direct food additives and color additives used in food)、OECD Guidelines for testing of chemicals，以及EMA Guideline，期使新版「藥品非臨床試驗安全性規範」能與ICH規範所涵括各規範之規定相符，並使其更為切實可行。

副本：財團法人醫藥品查驗中心、行政院農業委員會、行政院環保署、社團法人台灣臨床藥學會、國家實驗研究院國家實驗動物中心、行政院農業委員會家畜衛生試驗所、台北市西藥代理商業同業公會、台灣省西藥商業同業公會聯合會、中華民國開發性製藥研究協會、中華中華民國開發性製藥研究協會國製藥發展協會、中華民國藥品行銷暨管理協會、中華民國藥師公會全國聯合會、中華民國藥劑生公會全國聯合會、中華民國西藥商業同業公會全國聯合會、台灣區製藥工業同業公會、台灣藥學會、社團法人中華民國學名藥協會、社團法人中華民國保護動物協會

署長葉明功

目錄

標題	頁次
藥品非臨床試驗安全性規範	1
目錄	2
前言	5
1 藥品非臨床試驗-實驗動物品質宣言	5
2 背景說明	7
3 修訂概要	7
參考文獻	8
第一章 新藥非臨床試驗總論 (Overview for Nonclinical Studies of New Drugs)	9
一、藥理試驗	9
1. 藥效學試驗 (Pharmacodynamic Study, PD)	10
2. 藥動學試驗 (Pharmacokinetic Study, PK)	10
二、毒性試驗	10
1. 單一劑量毒性試驗	10
2. 重覆劑量毒性試驗	11
三 臨床試驗研發	11
表一、建議支持臨床試驗執行所需進行之重覆劑量毒性試驗時程	11
表二、建議足以支持新藥上市所需執行之重覆劑量毒性試驗時程	13
3. 局部耐受性試驗	13
4. 基因毒性試驗	13
5. 致癌性試驗	14
6. 生殖與發育毒性試驗	14
7. 免疫毒性	15
8. 毒理動力學	16
9. 光毒性試驗	16
10. 藥物成癮性(濫用傾向)試驗	17
11. 臨床納入兒童族群之非臨床試驗考量	17
12. 其他毒性試驗	18
13. 複方藥物的毒性試驗	19
圖一 新藥(化學藥品與生物藥品)上市之流程圖	21
圖二 新生物藥品上市之考量	22
圖三 新成分新藥(化學藥品與生物藥品)依臨床試驗時程及查驗登記所需執行之 非臨床試驗流程圖	24
第二章 藥理試驗規範 (Guidelines for Pharmacology Studies)	25

第 1 節 藥效學 (Pharmacodynamics).....	25
第 2 節 藥動學 (Pharmacokinetics).....	32
第 3 節 引起心室再極化時間延長風險的評估(QT 節段延長) [The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals].....	37
圖四 建議評估心室再極化時間延長(QT 節段延長)風險的評估策略	38
第三章 毒理試驗規範 (Guidelines for Toxicity Studies).....	40
第 1 節 單一劑量毒性試驗 (Single Dose Toxicity Study).....	40
第 2 節 重覆劑量毒性試驗 (Repeated Dose Toxicity Study).....	42
第 3 節 基因毒性試驗 (Genotoxicity Study).....	49
第 4 節 生殖與發育毒性試驗 (Reproductive and Developmental Toxicity Studies).....	62
第 5 節 致癌性試驗 (Carcinogenicity Study).....	72
第 6 節 皮膚過敏性試驗 (Skin Sensitization Study)	84
第 7 節 皮膚感光過敏性試驗 (Skin Photosensitization Study).....	89
第 8 節 皮膚刺激性試驗 (Skin Irritation Study)	93
第 9 節 眼睛刺激性試驗 (Eye Irritation Study)	95
第 10 節 毒理動力學試驗 (Toxicokinetic Study)	97
第 11 節 免疫毒性試驗 (Immunotoxicity Study)	101
第四章 生物藥品之非臨床試驗規範(Guidelines for Nonclinical Safety Studies of Biopharmaceuticals)	102
一、生物藥品的品質	102
二、非臨床試驗	103
三、毒性試驗	105
第五章 抗癌新藥非臨床試驗規範(Guidelines for Nonclinical Studies of Anticancer Pharmaceuticals).....	110
一、前言	110
二、支持非臨床評估的相關試驗.....	111
三、非臨床試驗與臨床試驗間的銜接.....	116
(一) 首次在人體給藥的起始藥量.....	117
(二) 藥量逐步提升和臨床試驗的最高劑量	117
(三) 臨床試驗癌症種類.....	117
(四) 支持早期臨床試驗所需毒理試驗的期間和給藥時程.....	118
表三、支持抗癌新藥早期臨床試驗所對應之非臨床試驗時程 (Schedule of nonclinical studies relative to proposed Phase I/II Trial)	118
(五)支持後續的臨床研發和上市行銷所需的毒理試驗期間.....	119

(六) 新藥複方合併使用.....	119
(七) 支持小兒族群臨床試驗所需的非臨床試驗.....	119
(八) 抗癌新藥進入臨床試驗之非臨床試驗要求簡表.....	119
四、其他的考量	120
第六章 附錄.....	125
第一節 名詞對照表.....	125

前言

1 藥品非臨床試驗-實驗動物品質宣言

依據行政院農委會(或組改後之農業部)之「動物保護法」,對「實驗動物」定義如下:指為「科學應用」目的而飼養或管理之動物。而「科學應用」:指為教學訓練、科學實驗動物科學(Laboratory animal science)是指研發實驗動物的生物學、飼養管理、育種與繁殖、疾病與防治、遺傳與攜含微生物規格、探討動物實驗步驟與技術、動物房舍之設施、改善動物之麻醉、止痛與安樂死,也包括動物實驗道德與倫理之探討,或開發可以取代動物實驗之替代方法。

近年來 3R 觀念已成為實驗動物操作及使用相關計畫之指引。也就是將:1. 替代(Replacement):是指在使用動物時(研究或教學),研究人員或使用者的構思是否可以其他試驗方式替代活體動物。2. 減量(Reduction):是減少實驗動物的數目與頻度。藉由細心的實驗設計與程序,一致性與標準化動物群及控制環境因子以減少實驗結果的歧異度或誤差。3. 精緻(Refinement):是指在實驗過程中儘量減少動物病痛,例如運輸的環境、手術與麻醉等;納入實驗動物之計畫設計及審核。

農委會(或組改後之農業部)之「動物保護法」,對「實驗動物」管理的主要在提昇動物實驗的品質及實驗動物的福祉。藥品非臨床試驗安全性規範之內容也依據該法第 15 條第 2 項規定,要求對進行動物實驗的機構,均應設置「實驗動物照護及使用委員會」(英文簡稱 IACUC),來審查、監督機構所進行之動物實驗及動物飼養情況。對實驗動物之管理,可參考國內或國際之規定來進行。並可參考前衛生署於民國八十七年六月及其後修訂版公告之「藥品非臨床試驗優良操作規範(Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies)」。優良實驗室操作(GLP)之查核或符合性登錄可制度,可經由國際上之「國際實驗動物管理評鑑及認證協會(AAALAC)」、食品藥物管理署委託辦理對藥品及醫材之藥物非臨床試驗優良操作規範(執行 GLP 自願性查核;至今已有 23 家機構經認證通過)或由經濟部標準檢驗局委託建立「OECD 優良實驗室操作 (GLP) 國家符合性監控系統」之國內財團法人全國認證基金會(TAF)等相關之認證團體,經由自願性查核,提升實驗動物之保護與品質要求,提供準確、值得信賴的研究成果或實驗數據的品質。

實驗動物的應用領域與範圍:利用實驗動物從事生命、環境及其他相關領域科學的研究與發展、應用實驗動物的領域與範圍廣泛,特別在於醫學研究、疫苗及血清

製備與開發、藥物安全與毒性測試、基因工程及相關生物科技研發及其他。

由於實驗動物的品質與研究成果的科學性與可靠性關係密切，因此國際性刊物之論文多要求所使用的實驗動物必須是 SPF 級的無特定病原實驗動物。世界衛生組織 WHO 也明文規定：生物藥品在生產或檢定生物製品，應採用 SPF 級健康、無感染的實驗動物，以確保產品的安全性。動物之科學應用主要以 3R 為福利準則。世界動物衛生組織之任務為以科學基礎之認知推動動物福利；結合學術資源培訓動物福利專業人士以落實於各產業之執行面。該組織之指導原為：動物福利與動物衛生有不可分割之關係，獸醫師應擔當第一線之責任。動物福利之應用，應以「增進人類福祉」為主要目標。動物福利也是人類應用動物時應盡之義務，故應盡力確保。

由於實驗動物在生物科技及醫藥產品的使用，大多為確保生技及醫藥產品的安全及產品開發為主。因此大多數之實驗動物被廣泛使用在大學院校及研究機構。少數之動物試驗則用於確保生技醫藥品的品質及安全，作為藥廠及生技廠商品質管制之安全性試驗之用。依據農委會(農業部)於 100 年度全國執行實驗動物科學應用的機構數量與動物設施房舍規模，資料顯示，100 年度依動物保護法規定而設置「實驗動物照護及使用委員會或小組」的機構共計有 221 所。如以機構性質區分，「專科以上學校」的機構數量(37.62%)最多，其次為「試驗研究機構」佔 21.43%，依序為「醫院」(12.86%)、「動物藥品工廠」(8.57%)及「藥物工廠」(7.14%)、「其他」(6.67%)以及「生物藥品工廠」(5.71%)；試驗研究機構、專科以上學校及醫院，共佔總使用量約 92.1%。100 年度使用量最大的前五種動物別，分別是啮齒類動物、魚類、雞、兔及豬。犬之使用量則為 349 隻，僅佔 0.03，排名第 14。103 年食藥署為了解國內藥廠研發生產過程中使用動物實驗資料。目前因農委會動物保護法之規定，有關實驗動物之照護、管理、使用、監督及查核係屬農委會業管，藥廠無須送食藥署審查，故食藥署並無登錄藥廠使用動物實驗之資料。至於國內 47 家 GMP 藥廠生產無菌製劑過程中，品管實驗室可能使用兔子執行相關試驗，據調查目前約有 12 家有使用兔子執行試驗。101 年食藥署之藥品臨床試驗計畫申請共受理 238 件(202 件為輸入藥品，36 件為國產)；102 年共受理 258 件(215 件為輸入，43 件為國產)。其中，僅有 3 件國產藥品執行國內動物試驗[包括：重覆劑量毒性試驗(兔子)、單劑量毒性試驗(大鼠)及致腫瘤性試驗(裸鼠)]。其餘藥品則檢附國外動物試驗報告或文獻，或因使用已上市之藥品，因已有人體使用經驗，則無須再執行動物試驗。

食品藥物管理署藥品組主要負責新藥、生物藥品及學名藥之查驗登記。以「增進人類福祉」為主要目標，也逐步盡力確保動物福利作為實驗動物為人類健康付出時，人類社會應盡之義務。經由鼓勵新藥及生物藥品的創新研發，以幫助病患能取得安全及有效的治療或預防之藥品。或經由學名藥的上市，在與原廠品質相同的規格下，推動已過專利保護之藥品使用，幫助更多病患能取得價格合宜的藥品。由於新藥的開發，仍須經由動物實驗來保障臨床試驗受試者的安全保障。未來食藥署仍將密切觀察國際醫藥法規協會會議(International Harmonization Conference: ICH)，經由美國、歐洲及日本等全球目前主要研發國家之製藥產業的努力，逐步建立全世界共同認可的動物實驗替代方案，也可提升我國製藥產業實驗動物保護的品質及科學技術與倫理觀念的進步。

2 背景說明

衛生福利部之前身衛生署於民國 89 年 6 月公告第三版「藥品非臨床試驗安全性規範」(以下簡稱本規範)，迄今已有 14 年。此期間國際醫藥法規協會會議(International Conference on Harmonization, 以下簡稱 ICH)在非臨床安全性規範已有大幅增修，本規範內容亟需更新與增訂。為配合國際醫藥法規之進展，以及我國醫藥品研發之需求，醫藥品查驗中心於民國 91 年開始接受衛生署專案委託進行本規範之修訂，期間隨著 ICH 規範陸續更新，共進行 4 次編修(分別於民國 91、95、100 及 102 年)，冀使我國藥品研發所依循之法規能合於 ICH 規範之精神，與世界接軌，以建立我國研發藥品在國際舞台上發展競爭的機會。

3 修訂概要

TFDA 於 102 年 5 月公告本規範第四版，更新內容主要在要求動物試驗的執行應依循我國動物保護法之立法，並依時代之發展能建立動物實驗之減量與取代(3R)原則；同時刪除第三版中已過時之第六章第 4 節實驗動物生理值及第 5 節無特定病原實驗動物之標準等 2 節內容，僅保留中英對照表。本次修訂第五版「藥品非臨床試驗安全性規範」，乃以公告之第四版規範為架構，主要以 ICH 歷年對於非臨床安全性試驗議題之最新指引文件版本為依據，並著重於藥品執行人類臨床試驗及申請上市查驗登記所需的非臨床安全性試驗相關規範進行修訂。刪除原第一章「試驗中新藥之申請」部分內容、第三章「生物藥品的品質管制」與第六章「附錄」等內容；原第二章「生物藥品之非臨床試驗」移至第四章；修改第一章標題名稱及內容與第二章「藥理學」(原第四

章)以及第三章「毒理學試驗」(原第五章)等章節內容;於第二章(原第四章)新增第3節「引起心室再極化時間延長風險的評估(QT 節段延長)」、於第三章(原第五章)新增第10節「毒理動力學試驗」及第11節「免疫毒性試驗」,並新增第五章「抗癌新藥非臨床試驗規範」。

本次修訂之依據除參酌 ICH 指引文件新版內容,也參考 Redbook (美國 FDA 發布之 Toxicological principles for the safety assessment of direct food additives and color additives used in food)、OECD Guidelines for testing of chemicals,以及 EMA Guideline,期使新版「藥品非臨床試驗安全性規範」能與 ICH 規範所涵括各規範之規定相符,並使其更為切實可行。本次規範修訂後,未來仍會因應國際 ICH 法規的發展,持續進行本規範之更新。

參考文獻

1. 100 年度各動物科學應用機構監督報告統計分析。農委會出版 102 年出版。
2. 世界動物衛生組織的動物福利政策。費昌勇、國立台灣大學獸醫學系。詳全文請見 94 年 12 月號《鄉間小路》月刊。

第一章 新藥非臨床試驗總論 (Overview for Nonclinical Studies of New Drugs)

新藥(依據藥事法第七條之：新成份、新療效複方或新使用途徑之藥品)上市許可之過程可分為3部份：(1)進行非臨床及臨床試驗的安全、有效性測試；(2)整理該藥品之實驗數據，提出申請進入人體臨床試驗(Investigational New Drug:IND)和新藥上市查驗登記(New Drug Application:NDA)；(3)衛生福利部審核 IND 與 NDA 之申請。雖然所有的新藥都經由上述的上市申請程序，但是每個藥品通過上市申請的過程及試驗的內容，包括非臨床試驗與臨床試驗之試驗型態與數量都不甚相同，須視每個新藥的性質、劑型、用途、及給藥方式等情況而作調整，並且促進與國際 ICH 法規的標準一致。

藥品(包括化學藥品與生物藥品)的研發是一個循序漸進的過程，包含評估動物以及人體安全性資料。非臨床安全性評估目的為瞭解毒性作用的標靶器官、劑量依賴性、與曝露量的關係，及適當地評估毒性作用的可恢復性。這些資訊被作為推估人體試驗的安全起始劑量，以及劑量範圍的參考，另外也可確認臨床上對於不良作用監測之參數。然而長期毒性試驗及臨床試驗非常費時，為加速臨床試驗進程，依據 3R (減少/精簡/取代)原則，減少動物使用及製藥研發所需資源，非臨床與臨床試驗的時程可相互並行[參見圖一(化學藥品)及圖二(生物藥品)之流程圖]，最初以短期毒性試驗之結果，支持初期的人體臨床試驗，隨著臨床試驗時程進行，對於更長期毒理試驗及不同之非臨床安全性試驗執行亦有不同的要求(參見圖三之流程圖)。對於生物技術醫藥品的安全性評估之流程則須依試驗物質特性而定。對於用作治療對生命有立即威脅疾病的新藥，則須依其效益與風險的考量進行個案評估。

所有新藥進入人體臨床試驗之前，必須提供其安全性評估資料，包括：(1)非臨床動物試驗數據，可以推衍至此藥物實際產生的作用；(2)臨床試驗數據或在其他國家的藥物使用情況證明。非臨床試驗包括藥理與毒性試驗，藥品非臨床安全性試驗之執行，應符合非臨床試驗優良操作規範(GLP) [非臨床安全性試驗是指(包括)安全性藥理試驗和毒理試驗]。

一、藥理試驗

藥理試驗包括：藥效學試驗(pharmacodynamic study)、藥動學試驗(pharmacokinetic study)：

1. 藥效學試驗 (*Pharmacodynamic Study, PD*)

藥效學試驗可分為 3 類：主藥效試驗，次藥效試驗以及安全性藥理試驗。主藥效試驗是評估新藥在預期治療標靶藥理作用與作用機轉。次藥效試驗是評估新藥在非預期治療標靶藥理作用或作用機轉(有時認為是一般藥理試驗的部份)。安全性藥理試驗目的是探討新藥在療效劑量範圍的曝露量或更高時對生理功能的不良反應。若在人體臨床試驗觀察到嚴重之不良反應，應藉藥效學試驗瞭解此不良反應的反應機制。QT 節段延長(QT interval prolongation)是「人體用藥安全性藥理試驗的 ICH 準則(ICH S7A)」的延伸及補充。其目的是確認新藥和其代謝物造成心室再極化時間延遲的風險，以及將延遲心室再極化程度和新藥及其代謝物濃度進行關聯性分析。在首次人體臨床試驗前應進行 QT 節段延長風險評估的非臨床試驗。

主藥效學試驗(體內和/或體外)的目的在於研究藥物之作用機轉，與藥理作用在預期治療標靶的相關性。此類型試驗一般是在新藥開發階段進行，一般而言不須按照 GLP 來執行。這些試驗能有助於非臨床和臨床研究時的劑量選擇。

安全藥理的核心試驗包括對心血管，中樞神經系統和呼吸系統進行評估，且根據 ICH S7A 和 S7B 規定，通常需於藥品用於人體之前即應完成。若必要時，可於晚期臨床試驗提供更深入的核心試驗及其他生理系統的評估。為減少實驗動物的使用，可考量於一般毒性試驗中同時評估。

2. 藥動學試驗 (*Pharmacokinetic Study, PK*)

原則上，執行人體臨床試驗前，建議利用動物及人類生物檢體進行體內或體外試驗，評估可能參與代謝的酵素、代謝程度、蛋白結合率試驗結果，以及藥品在試驗物種的全身性曝露結果進行評估(ICH S3A)。進一步的藥動學資訊，例如，藥品之吸收、分佈、代謝、排泄方面，與潛在交互作用相關的動物試驗和體外生化資訊，應在曝露於多數人或長期治療前提供(一般於第三期臨床試驗前)。這些數據可用於比較人類和動物間代謝物之異同，以及決定是否需再進行額外試驗。

二、毒性試驗

1. 單一劑量毒性試驗

單一劑量毒性試驗須先對至少兩種的哺乳類動物進行試驗，始可執行人體臨床試驗。哺乳類動物包含啮齒類及非啮齒類動物，當試驗許可時，應包含一種非啮齒類動

物。啮齒類動物一般最常使用大鼠和鼯鼠(說明 1)，近親、雜交或混合品系均可，但試驗動物須來自健康及特性鑑定完全之種源；非啮齒類動物一般最常使用狗，米格魯(Beagles)或其他純種品系狗均可。

當急毒性資訊可藉由其他試驗中獲得時，例如，以劑量遞增試驗(dose escalation)或劑量範圍尋找(dose ranging)試驗獲得最高耐受劑量(MTD)，則不需進行單獨的單一劑量試驗。如果臨床給藥已被適當符合 GLP 之重覆劑量毒性試驗所支持，提供臨床使用途徑相關之急毒性資訊可藉由非 GLP 試驗方式獲得。動物死亡不應做為急毒性試驗評估預期的評估終點。

在某些特定情況下[例如，微劑量探索性臨床試驗(Microdose Exploratory Clinical Trials，說明 2)]，急毒性或單一劑量試驗可作為最初用於支持人體試驗的參考。在這種情況下，高劑量的選擇可以與一般毒理試驗所描述的不同，但仍應適當支持預期的臨床劑量和使用途徑。這些試驗應在符合 GLP 規範下進行。

2. 重覆劑量毒性試驗

重覆劑量毒性試驗的試驗期通常是依據所計畫臨床試驗的試驗週期、治療的適應症及範圍而定。原則上，在兩種哺乳動物(其一為非啮齒類)中所進行的毒性試驗週期應相當或超過人體臨床試驗的試驗週期，直達到規範中所建議重覆劑量毒性試驗最長的試驗週期(表一)。

若藥品顯示有明顯的治療療效的狀況下，臨床試驗的試驗週期有時可超過動物重覆劑量毒性試驗之週期，但需視個案而定。

三 臨床試驗研發

兩種動物(一種為非啮齒類動物)最少兩週的重覆劑量毒性試驗(表一)，始能支持最多為期兩週的臨床試驗。長期的臨床試驗需藉由等長的重覆劑量毒性試驗始能支持。通常，六個月啮齒類以及九個月以上非啮齒類動物試驗可支持超越六個月的臨床試驗。(例外見表一註釋)

表一、建議支持臨床試驗執行所需進行之重覆劑量毒性試驗時程

臨床試驗最長執行時程	建議支持臨床試驗執行所需進行之最短重覆劑量毒性試驗時程	
	啮齒類	非啮齒類
最多 2 週	2 週 ^a	2 週 ^a

介於 2 週至 6 個月	同臨床試驗 ^b	同臨床試驗 ^b
超過 6 個月	6 個月 ^{b, c}	9 個月 ^{b, c, d}

- a. 以延伸性單一劑量毒性試驗代替兩個星期的試驗，可支持單劑量使用於人體之臨床試驗。低於 14 天之臨床實驗可以執行相同時間之毒性試驗來支持。
- b. 某些狀況，當已獲得齧齒類及非齧齒類 3 個月的試驗資料，且完整之慢性毒性試驗已開始進行，並符合當地政府臨床試驗法規執行政序下，可繼續執行超過 3 個月之延伸性臨床試驗。對於嚴重或危及生命的適應症，或在逐案原則(case-by-case)的基礎上，完整的慢性齧齒類動物試驗報告及進行中的非齧齒類剖檢(necropsy)資料，可支持此延伸性試驗研究。然而，仍應在 3 個月內獲得完整的非齧齒類病理數據。
- c. 當以小兒病患為主要族群時，且現行的動物試驗報告(毒理學或藥理學)確認對標靶器官具潛在發育過影響之疑慮時，在這類案子，以年幼動物開始進行長期毒性試驗之研究是適當的。
- d. 可以接受 6 個月非齧齒類動物之實驗。但是，如果較長時間的研究已經進行，則不適合再進行額外的 6 個月重覆劑量毒性試驗。以下是在非齧齒類動物中執行最多 6 個月的動物試驗的適當例子：

- 當免疫原性或耐受性之研究已於較長期的試驗中執行時。
- 臨床實驗執行超過 6 個月之短期重覆藥物曝露，例如，間歇性治療偏頭痛、勃起功能障礙，或者單純皰疹。
- 用以降低癌症復發危險性之慢性長期使用藥物。
- 預期使用此藥物治療之適應症患者壽命很短。

四 申請上市查驗登記

相較於臨床試驗，由於在藥品上市後臨床治療使用時，曝露風險的人群數量較多且較不易控制狀況，因此較長期的非臨床實驗更顯得重要。表二概述支持不同上市藥品治療療程所相對應需執行的重覆劑量毒性試驗期間。然而，對於某些藥品，其適應症使用期間介於 2 週至 3 個月，但依據豐富的臨床使用經驗顯示可能廣泛且長期使用者(例如，焦慮、季節性過敏性鼻炎、疼痛)，則等同於臨床建議使用大於 3 個月之重覆劑量毒性試驗執行時程，可能較為適當。

表二、建議足以支持新藥上市所需執行之重覆劑量毒性試驗時程

臨床使用時程	齧齒類	非齧齒類
最多 2 週	1 個月	1 個月
2 週至 1 個月	3 個月	3 個月
1 個月至 3 個月	6 個月	6 個月
超過 3 個月	6 個月 ^c	9 個月 ^{c, d}

注意：注釋^{c, d} 請參閱表一

3. 局部耐受性試驗

局部耐受性試驗是以未來人體臨床使用的相同給藥途徑及部位進行給藥，觀察給藥部位的反應，評估其局部耐受性，若於毒性試驗可同時評估，則不建議單獨進行試驗，此試驗須在人體臨床試驗前完成。需進行局部耐受性試驗例子如下。

- 用於非治療目的之有限人體給藥(例如，以單一靜脈注射給藥，以協助確定口服藥物的絕對生物可用率)，以單一物種單劑量可支持此類用途之局部耐受性試驗。若現有毒理學資料可提供支持此給藥目的預期全身曝露(AUC 和 C_{max})資訊，則局部耐受性試驗可以僅限對給藥部位進行臨床外觀之症狀及解剖後之肉眼及顯微鏡等觀察。給藥劑型與臨床相似即可。
- 當以口服執行毒理學試驗來支持微劑量靜脈注射(i.v. microdose)試驗時，可不需要評估原料藥的局部耐受性。但若使用新的靜脈注射溶劑，則應進行溶劑的局部耐受性評估。
- 當注射產品須進行非預期注射部位之局部耐受性試驗時，(例如，針對靜脈給藥，則建議進行單劑量靜脈旁給藥之局部耐受性試驗，其他注射途徑之局部試驗要求應以逐案原則進行評估)，並應於大量病患使用前提供(例如，第三期臨床試驗)。

4. 基因毒性試驗

在進行人體臨床試驗前，一般須以體外致突變性測試方法評估試驗物質對基因之突變與染色體之損傷情形，若試驗產生陽性反應，則須進行其他致突變性測試，以進一步確定此新藥對人體之安全性。單劑量給予的臨床試驗，需進行基因突變試驗。而多劑量給予的臨床試驗，除基因突變試驗外，需額外評估在哺乳動物系統的染色體損傷分析檢測。完整的標準基因毒性試驗(standard battery)則須在第二期臨床試驗開始前完成。

5. 致癌性試驗

在一般情況下，致癌性試驗不需要在人體臨床試驗前完成，除非有其他因素考量。凡對於(1)未來須持續給藥 6 個月以上之藥物，(2)過去之數據顯示此類別之藥物可能引起致癌性者，(3)藥物之作用機轉推測可能有致癌性者，(4)重覆劑量毒性之試驗結果顯示有致腫瘤生成現象之藥物，(5)藥品之成分或其代謝物長期停留在組織中，產生局部的組織作用或病理生理反應，(6)基因毒性試驗結果顯示有致突變性存在之新藥，均應在申請新藥上市查驗登記前完成致癌性測試。但是若試驗物質只針對有限的特定疾病或病患進行治療，且該試驗物質對病患的治療十分有效時，可視需要及其裨益與風險之考量，在新藥獲准上市後進行。

6. 生殖與發育毒性試驗

生殖與發育毒性試驗應視給藥對象的需要而進行。若臨床試驗之受試者為男性，而重覆劑量毒性試驗結果顯示該試驗物質對生殖器官不造成任何傷害，則生殖與發育毒性第一期試驗只須在第三期臨床試驗開始前完成。

若臨床試驗之受試族群為不具生育力之女性(例如，永久不孕、停經後婦女)，且相關的臨床前重覆劑量毒性試驗已包括雌性生殖器官評估，則可不需執行生殖與發育毒性試驗。停經後的定義為無其他醫療介入下，女性連續 12 個月沒有月經。

具生育力之女性可參與尚未進行生殖與發育毒性試驗之試驗中新藥臨床試驗，但必須嚴謹、小心監控試驗過程，包括進行驗孕檢查(例如，HCG 檢測)、使用高效率之避孕方法及在確認的生理期後，方可進入臨床試驗，並須檢附受試者同意書，同意書須告知受試者該試驗中新藥可能潛在的危險性(例如，藥品相關結構或藥理作用之一般潛在毒性評估)。如果沒有相關可用的生殖訊息，應通報對胚胎或胎兒不明的潛在風險。

執行至少 2 週重覆劑量動物毒性試驗(通常為啮齒類，需進行之詳細睪丸與卵巢病理檢查)後，可在進行動物雌性生育力試驗之前，將具生育力之女性納入參與重覆給藥的第一期和第二期臨床試驗中。

若提供兩個物種的初步生殖毒性結果(包括評估胎兒存活，體重、外型和內臟檢查；最低每組 6 隻懷孕母獸，並在整個器官發生期間(organogenesis)投與母獸。此預試驗應以高品質的科學標準進行數據之採集記錄或依據 GLP 規範下執行)，並在臨

床試驗使用高效率之避孕方法(高效率的避孕方式是指持續且正確使用單獨或合併避孕方法,可達一年小於1%的低失敗率。對於使用荷爾蒙避孕方式的受試者,應提出試驗藥品的相關資訊及避孕措施可能造成的影響。),可接受在進行明確的生殖與發育毒性試驗之前,納入最多150位具生育力之女性接受短期(最多3個月)的研究性治療。受試族群特性(例如,年齡、疾病)可能改變懷孕率,進而影響具生育力之女性的參與試驗人數和時間。

若第三期臨床試驗包含使用高效率之避孕方法之具生育力女性,則生殖與發育毒性第一、二期試驗須在第三期臨床試驗開始前完成,除非有其他因素考量,生殖與發育毒性第三期試驗可在申請新藥上市查驗登記時完成。

若具生育力之女性不使用高效率之避孕方法或懷孕情況不明者,則所有在雌性所進行的完整生殖與發育毒性試驗及基因毒性試驗須在臨床試驗開始前完成。

下述情況,具生育力之女性可能可納入在沒有提供非臨床發育毒性試驗(例如,胚胎學試驗)的初期臨床試驗中:

- 執行期很短的臨床試驗(例如,2週)並採取密集控制之避孕措施。
- 在婦女為好發率的疾病,為達到有效臨床試驗目標,需納入具生育力之女性,應採取足夠的預防措施來防止懷孕。
- 其他包括:對試驗新藥作用機轉的知識、藥物類型、胎兒曝露程度,或在適當動物模型進行發育毒性試驗的困難性等考量下(例如,針對單株抗體,根據目前人類的科學知識,認為在人類胚胎、與幼兒器官發育期的曝露量低,因此其相關之發育毒性試驗可以在執行第三期試驗期間同時進行)。

若懷孕之女性參與臨床試驗,該試驗物質須先完成生殖與發育及基因毒性試驗,方可進行臨床試驗。除此之外,若可,一般亦需檢送先前的人體使用安全性資料。

7. 免疫毒性

基本上,所有使用在人體的新藥都應該評估其造成免疫毒性的可能,採用的方法包括標準毒性試驗組及額外的免疫毒性試驗。額外的免疫毒性測試時機點可由測試化合物的效價特性及臨床試驗類型之需要而定,這些試驗通常應在新藥使用於大量病人之前(通常是第三期臨床試驗)完成。臨床試驗中可建議納入免疫系統參數的監測。如果療效目標是免疫功能不全的病人,則免疫毒性測試在新藥開發早期時即應著手。

8. 毒理動力學

毒理動力學乃是依據藥動學之原理，於非臨床動物毒性試驗中，評估動物全身性曝露量[systemic exposure (說明 3)]及重覆投予後之曝露藥量變化，以協助毒性試驗結果之解讀、藥品安全係數之評估及其臨床安全性試驗之設計。藉由量測和藥品曝露量相關之藥動參數，例如，常用的血中濃度-時間曲線下總面積(AUC)，最高血中濃度(C_{max})，在給藥服用特定時間的最高濃度(C_{time})來評估毒理動力學試驗的藥品及代謝物曝露量。毒理動力學評估通常合併在毒性試驗中一起執行。若僅為了評估毒理動力學，也可單獨執行。

另外，當代謝物含量高於藥品總曝露量 10%、且在人體曝露顯著高於毒理學實驗最高曝露量時，才需提供此代謝物之非臨床特性分析。應當執行此類試驗以支持第三期臨床試驗進行。當藥品每日服用劑量小於 10 毫克時，含高比例的代謝物更需要進行此類評估。某些代謝物並無毒性議題(例如，大多數的穀胱甘肽結合物 (Glucuronide)，可不需進行毒性測試。對於已確立具安全性疑慮代謝物(例如，僅存在於人類的代謝物)之非臨床特性鑑別試驗，需視個案而定。

9. 光毒性試驗

執行與人體曝露相關之光安全性測試的適當性與時機應依據(1)分子的光化學特性(例如，光吸收和光穩定性)，(2)具光毒性潛力化合物之化學資訊，(3)組織分佈和(4)臨床或非臨床試驗中發現指出具光毒性潛力初步評估。若評估所有可得數據和臨床試驗，顯示具有顯著人體光毒性風險性時，應對臨床試驗病患提供適當的保護措施。並應進一步完成對皮膚和眼睛之完整非臨床藥物分佈評估，以提供對人體的風險與是否必要進行進一步測試之資訊。潛在光毒性試驗評估(非臨床、離體或體內或臨床試驗)應在使用於大量病人之前(通常是第三期)完成。

除進行光安全性測試外，另外，可直接以非臨床或臨床試驗資料進行光毒性評估。若試驗顯示不具光毒性，則不需進行早期眼睛/皮膚分佈評估試驗和提供臨床保護措施。若光毒性評估顯示具有光致癌性風險，通常此風險可透過在臨床試驗之受試者同意書增加警語與上市後在仿單中加註說明而被適當管控。

現行在啮齒類進行之光致癌性試驗模式(例如，無毛啮齒動物)對於藥品發展無益且不建議執行，除非在光毒性試驗顯示具光致癌性潛力，且有適當之測試方法，則此

試驗應在上市前完成，且結果應進行人體風險評估。

10. 藥物成癮性(濫用傾向)試驗

任何適應症之藥品，當會對中樞系統產生活性時，應考量是否須進行該藥品濫用傾向之評估。

在新藥開發早期過程中收集之非臨床資料有助於早期識別濫用傾向的可能性。這些指標通常可在人體第一次劑量前得到，包含由藥動/藥效學特性資料獲得之作用時間資料、已知濫用藥品結構之相似性、受體結合資訊以及非臨床活體動物試驗之行為與臨床表徵。若早期試驗顯示沒有濫用的可能性時，則不須進行廣泛的非臨床濫用傾向測試。若活性成分顯示有關已知濫用的訊息或對中樞神經系統具新作用機轉，建議進一步進行非臨床試驗以支持晚期臨床試驗(例如，第三期臨床試驗)之執行。

若啮齒類的藥品代謝物特性與藥物作用標靶與人類一致時，濫用傾向評估試驗應以啮齒類動物執行。使用靈長類動物試驗僅於有明確證據顯示其可有效預測人類濫用傾向，以及啮齒類動物是不適當模式時才需執行。通常以下列3類試驗來評估藥品濫用傾向：包含藥品辨識試驗(drug discrimination)、藥品自行攝取試驗(self-administration of the compound)與戒斷症狀評估(an assessment of withdrawal)。一般情況下，藥品辨識試驗與藥品自行攝取試驗會單獨執行，而戒斷試驗有時可設計在重覆劑量試驗之恢復期一併觀察，而最高測試劑量應為能產生數倍高於臨床劑量範圍之血中濃度。

11. 臨床納入兒童族群之非臨床試驗考量

當臨床試驗預納入兒童患者時，可藉由先前成人的安全性資料獲得適當的資訊，然而對於引用成人數據的適當性和影響程度是否適用於兒童患者安全性評估則應逐案進行判定，例如，某些適應症(特殊的兒科適應症)廣泛的成人使用經驗，也可能無法在兒童曝露前獲得。

在執行兒童族群臨床試驗前，應提供由成年動物執行適當週期之重覆劑量試驗、安全性藥理核心試驗與標準基因毒性試驗的結果。生殖毒性試驗可提供與兒童試驗族群的年齡和性別直接毒性或發育風險相關的資訊(例如，生育力和週產期前後之發育試驗)。胚胎發育毒性評估並非支持男性或青春前期女性臨床試驗之關鍵性試驗。

- 是否執行未成年動物實驗以支持在兒童族群進行之臨床實驗考量如下：

- 當過去動物試驗資料和人體安全性資料(包含同一藥理分類的其他藥物)皆不足以判斷並支持該兒童試驗時，才須執行未成年動物毒性試驗。必要時，以一個最合適物種(啮齒類為佳)之動物試驗足以支持臨床試驗納入兒童族群。若必須於非啮齒類動物執行之試驗應提出科學性理由。
- 在兒童族群進行之短期 PK 試驗(例如，1~3 個劑量)，通常不需要進行未成年動物毒性試驗來支持。
- 依據不同治療適應症、兒童族群年齡以及成年動物與人體曝露的安全性資料，在執行有效性與安全性之短期多劑量臨床試驗前，應考慮獲得未成年動物試驗結果之合宜性。其中試驗執行期間受試者的年齡是最重要的考慮因素(例如，臨床試驗受試者在一個發育時期曝露的比例)。此評估可判斷執行未成年動物試驗之必要性，若必要，其執行時程的設計應比照臨床試驗。
- 若兒童族群為主要的試驗族群，而現有的動物試驗發現對標靶器官具有潛在的發育毒性時，則此類案例需執行適當年齡和動物物種且具有相關發育考量指標分析之長期未成年動物試驗。例如，為期 12 個月的狗試驗(可以涵蓋整個狗的發育週期)或為期 6 個月的啮齒類試驗。對於任何物種，這種設計可以取代執行標準的長期試驗與分開的未成年動物試驗。
- 除非有顯著的疑慮(例如，多個試驗皆顯示具基因毒性、基於藥理作用機轉考量或在一般毒性試驗顯示具有腫瘤形成風險)，才需執行致癌性試驗以支持兒童臨床試驗之執行。
- 若長期兒童臨床試驗經評估後需執行未成年動物試驗時，其非臨床試驗應於該臨床試驗執行前完成。

12. 其他毒性試驗

當先前非臨床或臨床試驗發現藥品或相關成分具特殊安全性疑慮時，則需要進行額外的非臨床試驗(例如，鑑別潛在的生物標記，瞭解作用機轉)評估安全性。

有關不純物和降解產物合格限量評估方法於 ICH Q3A 和 Q3B 中已說明，經評估後若須執行特定安全性試驗(說明 3)來評估不純物或降解物，通常這些試驗不須在第三期臨床試驗前執行。除非有造成顯著不純物之改變(例如，原料藥變更新的合成途徑或製劑時，因與其他活性成分或賦形劑之交互作用，造成不純物種類或

含量明顯改變)，在此情況下，則需要執行適當的安全性評估試驗(qualification studies，說明 4)以支持第二期或晚期臨床試驗。

13. 複方藥物的毒性試驗

本處所指之「複方藥物」為涵蓋擬合併包裝或擬以單一投與(固定配方製劑)之製劑，此概述原則亦適用於未來開發產品擬於仿單建議與特定藥物合併使用(即便此合併不是以固定組合方式使用，同時具極少臨床使用資訊)。複方藥物可能包含：(1)兩個以上晚期研發成份(界定為顯著臨床經驗之化合物，例如，第三期臨床試驗和/或上市後)，(2)晚期研發成份併用初期研發成份(界定為有限臨床使用經驗之化合物，例如，第二期或初期臨床試驗)，或(3)兩個以上早期研發成份之併用。

依上述複方形式不同，所需提供之安全性評估要求亦不相同，分述如下：

- 大多數含兩個後期研發成份之複方藥品，且具有足夠支持合併使用之臨床試驗，通常不須執行複方毒性試驗以支持臨床試驗或上市，除非具有顯著的毒性疑慮(例如，相似的毒性標靶器官)，而此疑慮可藉由藥品之安全係數，以及能否對人體產生之副作用提供適當監測，而進行修訂。若評估引發顯著毒性疑慮而需執行試驗時，一般應在複方臨床試驗進行前完成。
- 當兩個後期研發成份併用時，雖未有充足臨床併用經驗，但依據已有數據顯示不具顯著毒性疑慮時，對於小規模且相對短期之臨床試驗(例如，最長至三個月的第二期臨床試驗)，一般不須執行非臨床複方毒性試驗。然而，需於大規模或長期複方臨床試驗前完成非臨床複方毒性試驗。
- 若為早期研發成份併用後期研發成份的複方，當沒有顯著毒性疑慮時，不須執行複方毒性試驗來支持一個月以內的臨床療效驗證試驗，複方的臨床試驗期間不應比個別單方長。對於預進行後期或更長時間的臨床試驗，則應執行非臨床複方毒性試驗來支持其安全性。
- 對於兩個別單方皆為早期研發藥物所組成之複方藥品，建議執行非臨床複方毒性試驗以支持臨床試驗之執行。當提供個別單方已執行之完整非臨床試驗計劃，另需進行一個非臨床複方毒性試驗以支持複方之臨床試驗，其執行週期必須與臨床試驗相當，建議依據各單方之藥理、毒理與藥動特性、適應症、受試族群、現有

的臨床資料及臨床預期使用期間，來設計可支持該藥品上市之非臨床複方試驗，最長 90 天。

通常複方試驗僅需在一個物種執行，除非發現非預期的毒性現象，則須執行額外的試驗。當個別單方未執行完整之非臨床試驗計劃時，可改以複方執行完整的非臨床毒理計劃，惟僅限於各單方合併使用之情況下。

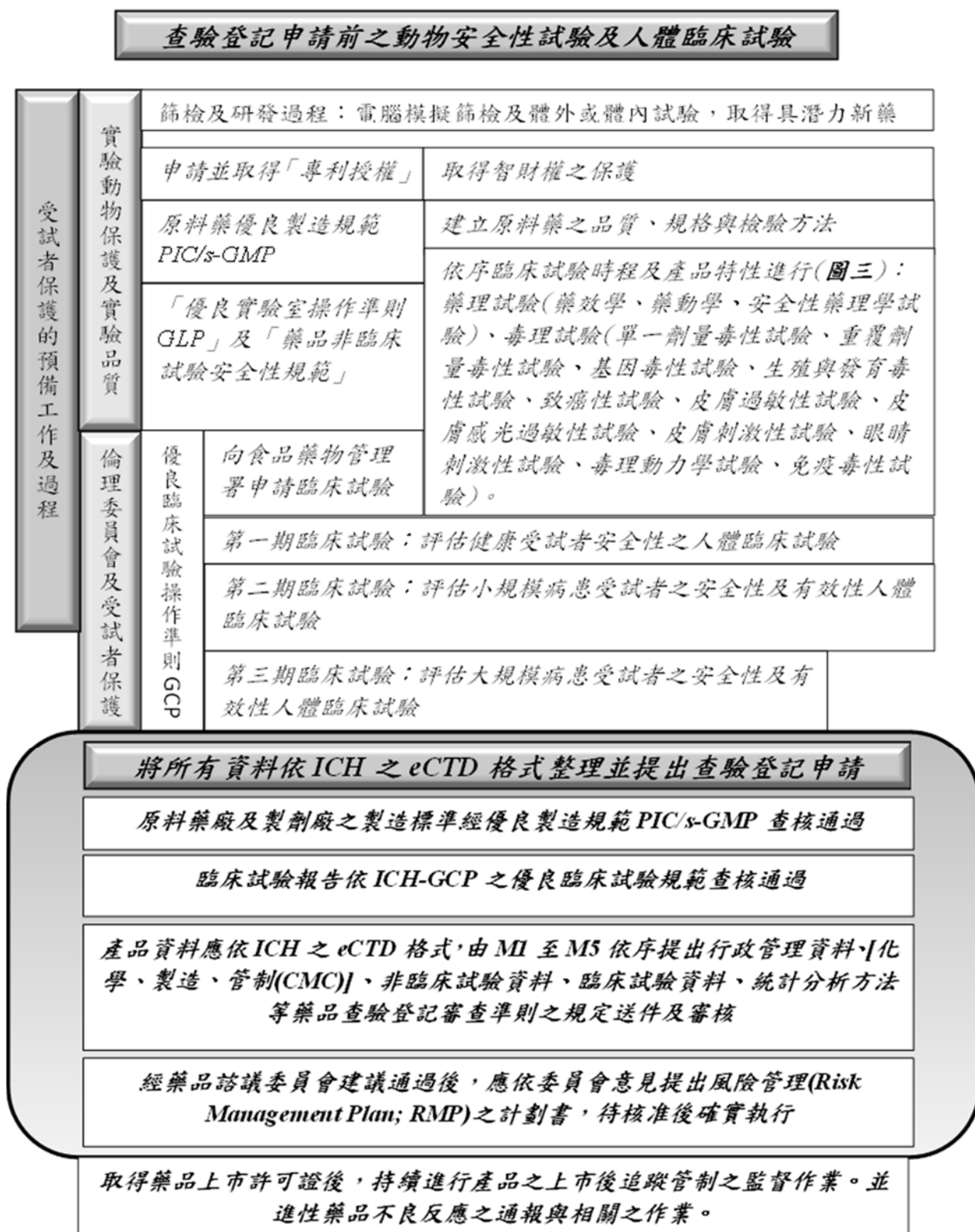
當各單方已依現行非臨床試驗標準進行測試，則一般不須提供複方基因毒性試驗、複方安全性藥理試驗或複方致癌性試驗。當受試族群為包含具生育能力的女性，而個別單方之試驗顯示具胚胎毒性，則不需要再執行複方的胚胎毒性試驗，因為已確立人類發育毒性。而當任一單方在非臨床胚胎毒性試驗已顯示不具有人類發育毒性風險時，則通常亦不須執行複方試驗，除非單方特性顯示在複方可能升高在人體毒性風險之疑慮。當個別單方已進行胚胎毒性試驗，但評估複方胚胎毒性試驗仍需要進行時，一般此試驗應在查驗登記時提供。

說明

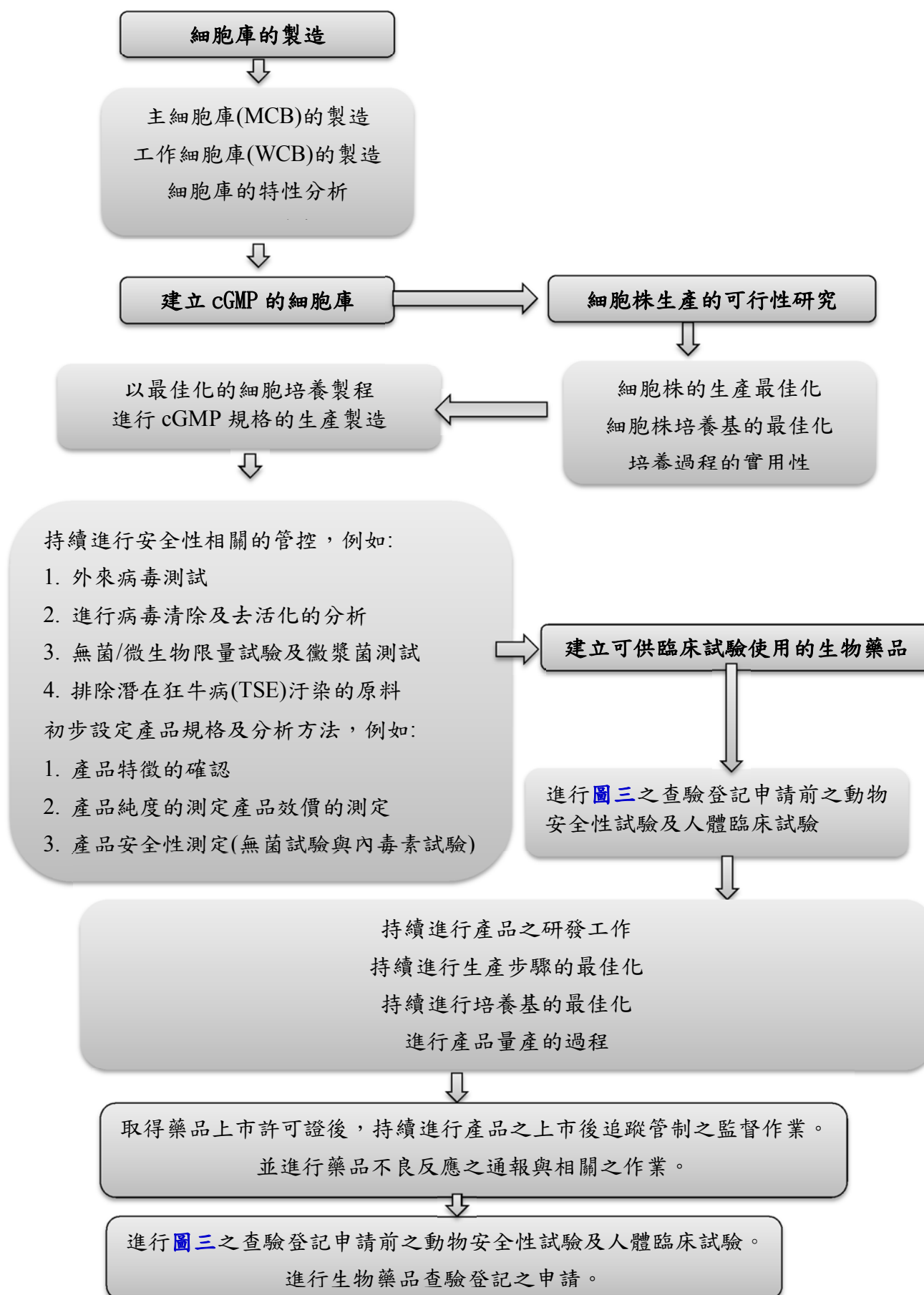
1. 本規範中以「鼯鼠」為 mouse 之中文名稱，研究人員又常稱其為「小鼠」。
2. 微劑量探索性臨床試驗 (microdose exploratory clinical trials): 係指 ICH M3(R2)所建議的兩種不同微劑量臨床試驗[第一種方法其臨床總劑量不超過 100 微克;第二種方法是小於五次投予，每次給藥最高為 100 微克（每個受試者不超過 500 微克）]，這一類試驗通常運用於造影試劑以研究標靶受體結合或組織分佈，其次是利用同位素或非同位素標定物來評估藥動學。相關毒理試驗高劑量選擇請參閱 ICH M3(R2)說明。
3. 藥品曝露量(exposure): 由藥動參數來表示試驗化合物及/或其代謝物在試驗動物的局部或全身藥品濃度曝露程度。通常可使用物質濃度-時間曲線下總面積 (AUC)及/或物質之最高血中濃度 (C_{max})或在某些特定時間點的濃度 (C_{time})作為參數。在某些特殊的情形，也可以使用其他參數。
4. 安全性評估試驗(qualification studies): ICH Q3A 指引建議不純物安全性評估試驗須包括一個在最合適物種進行兩週到三個月的重覆劑量動物毒性試驗及體外基因毒性試驗(Ames 試驗、染色體變異試驗)，執行試驗使用之活

性主成分須有雜質定量表，也可以使用純化的雜質進行毒理試驗，上述試驗皆須遵循 GLP 規範。

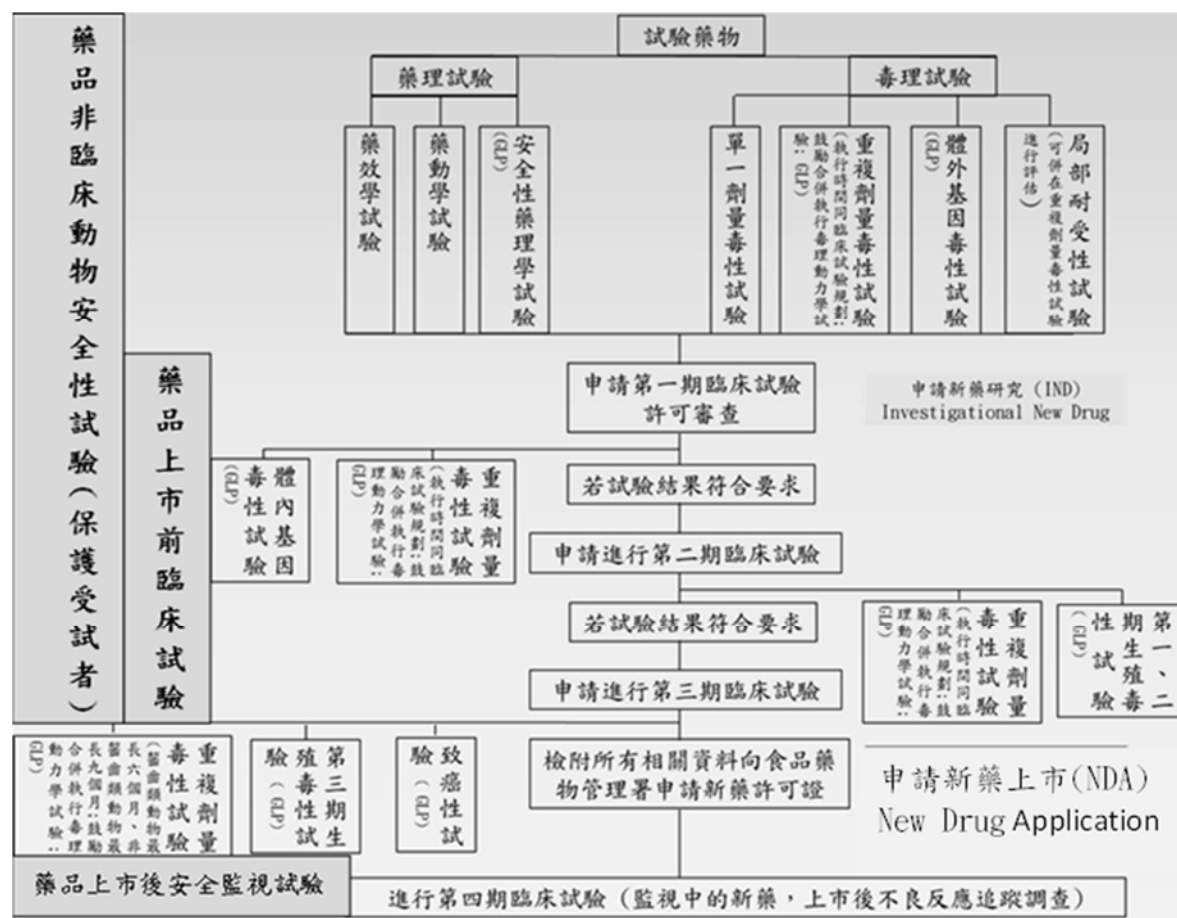
圖一 新藥(化學藥品與生物藥品)上市之流程圖



圖二 新生物藥品上市之考量



圖三 新成分新藥(化學藥品與生物藥品)依臨床試驗時程及查驗登記所需執行之非臨床試驗流程圖



第二章 藥理試驗規範 (Guidelines for Pharmacology Studies)

第 1 節 藥效學 (Pharmacodynamics)

藥效學試驗可分為 3 類：主藥效試驗，次藥效試驗以及安全性藥理試驗。主藥效試驗是評估新藥的預期治療標靶藥理作用與作用機轉。次藥效試驗是評估新藥的非預期治療標靶藥理作用與/或作用機轉(有時認為是一般藥理試驗的一部份)。安全性藥理試驗的定義是以試驗來探討某新藥，在投予相關治療範圍的曝露量或更高時，對生理功能的非預期潛在不良藥效。一般性藥理試驗起初是用來檢測一個候選新藥，除了主治療作用的其他影響；而安全性藥理試驗則侷限於發現其對於生理功能的不良反應。若在人體臨床試驗觀察到嚴重之不良反應，應藉藥效學試驗瞭解此不良反應的反應機制。安全性藥效學理試驗所獲得的數據，應作為新藥申請上市評估的一部份。

主藥效試驗

主藥效試驗可包含體外藥理試驗與體內藥理試驗兩部分：

- 體外藥理試驗部分：例如，細胞株試驗、酵素交互作用試驗、接受器特異性試驗、藥物交互作用試驗、先驅物與活性分子作用試驗、平均抑制劑量/平均有效劑量、放射線標定/圖譜驗證試驗、立體異構物比較試驗、原型藥對活性代謝物之藥效比較試驗等。
- 體內藥理試驗部分：例如，藥理/疾病模式試驗、劑量-反應試驗、決定治療指數(therapeutic index)試驗、先驅物與活性分子作用試驗、原型藥(parent drug)對活性代謝物試驗等。每個試驗物質的藥效作用都不相同，因此並無統一的測試步驟適用於主藥效學與次藥效試驗。

安全性藥理試驗

安全藥理的定義在 ICH S7A 中有明確的規範。安全性藥理試驗可區分成核心群試驗與後續或附屬的安全性藥理試驗。安全性藥理核心群試驗的目的在於研究測試物質對於維生功能的影響。基於此，心血管、呼吸與中樞神經系統被認為是維持生命所需的器官或系統，而列為核心群試驗來進行。當試驗發現具有潛在的不良影響與人類安全有關時，必須適當地以後續或附屬的安全性藥理試驗作探索。後續試驗的用意在對於主要生命功能上，提供更深度的瞭解或額外的資訊。附屬試驗的用意，在對於其他未經核心群或重覆劑量毒性試驗檢測的器官系統功能，評估藥物潛在的不良藥效影響。

隨著科技的發展，應選擇最新穎的方法與技術進行安全性藥理試驗，同時參閱說明中一般目前常使用的試驗方法。安全性藥理試驗的操作必須依循 GLP 規範。主藥效試驗與次藥效試驗的操作一般不需要依循 GLP 規範。有關執行安全性藥理試驗的原則請參閱 ICH S7A 文件。以下僅提供安全性藥理試驗的基本概念與測試方法，以應用於新藥之研發。隨著科技的發展，廠商應選擇最新穎的方法與技術進行安全性藥理試驗。安全性藥理試驗可使用多方觀察的方法。其基本概念與執行的原則如下：

一、一般考量

因為藥理作用依個別測試物質的特殊性質而有所不同，這些試驗也必須適度的選擇與設計。可考量的因素有：

1. 因為藥物的作用機轉可能暗示著一些特殊的不良影響，可參考其治療類型藥物的相關作用。例如，抗心率不整的藥物常常有引發心率不整的現象。
2. 藥物的不良影響常與其化學或治療類型的成員相關，但與其主藥效作用無關。例如，抗精神病藥物與 QT 延長作用。
3. 鍵結作用或酵素分析的資料可暗示其潛在的不良影響；
4. 從先前安全性藥理試驗、次藥效試驗、毒理試驗或人類使用經驗的結果，作更進一步的研究，來建立與探討這些發現與其在人類潛在不良作用的關聯性。
5. 在新藥的早期研發時，可能沒有足夠的資訊(例如，比較性的代謝作用)，可依照上述的重點，合理地選擇或設計試驗。在此情形下，可利用一般的方法來作安全性藥理的研究。

二、動物模式的選擇

對於所選擇的相關動物模式或其他測試系統，須考慮能否得到業經科學驗證的資訊。選擇的因素包括：此模式的藥效反應，藥動學的數據圖表，實驗動物的種類、品種、性別與年齡，此測試系統的敏感性、感受性與再現性，以及對此測試物質已經存有的背景資料。在選擇測試系統時，也必須一併考量從人類得來的數據(例如，體外的代謝反應)。其所測量的時間點，應基於藥效與藥動的考量。應為所選擇的動物模式或測試系統提供適當的理由說明。

1. 動物種類

2. 選擇適於進行試驗的動物，例如，大鼠、鼯鼠、天竺鼠、兔子、貓、狗等動物，此外動物的品種、性別、年齡等也須列入考量。
3. 測試系統
4. 測試系統可分成下列 4 種：
 - a. 活體動物
 - b. 離體的器官與組織
 - c. 血液與其組成份
 - d. 細胞與其組成份
5. 注意使用的試驗動物或測試系統的靈敏度、再現性及一般接受程度。
6. 使用的試驗動物與測試系統要能預測人體臨床試驗結果，將可提供有效資訊。

三、給藥

1. 給藥途徑

與未來人體臨床使用的給藥途徑相同，若試驗需要(依測試系統之適用性)可以其他給藥途徑取代。若試驗物質的吸收程度很低，須改用其他給藥途徑，例如，靜脈注射給藥方式進行測試，以確定試驗物質完全吸收。不論其給藥途徑為何，其原型藥與其主要代謝物之曝露量應類似或高於人類所達到的。如果預期臨床使用多種給藥途徑（例如，口服與注射），或者在全身或局部的曝露下，觀察或預先考慮到有明顯的定性與定量差異時，宜適當地藉由多種給藥途徑作影響的評估。

2. 給藥頻率

若以活體動物進行試驗，一般試驗物質是以單一劑量給藥，但若重覆劑量給藥會產生某些反應時，則選擇適當的給藥頻率進行試驗。

3. 劑量選擇

選擇劑量之基本考量要素：

- a. 試驗組之試驗物質給予劑量範圍須能觀察到劑量與藥效作用之間的關係。
- b. 試驗組之試驗物質給予劑量範圍應足以涵蓋產生主藥效作用之劑量範圍。

若試驗物質在臨床使用的給藥途徑不是靜脈注射，使用之劑量須能使試驗物質的血中濃度高於產生主藥效作用的濃度(不包括局部作用藥物)。

4. 對照組

一般試驗須包含陰性(溶劑)對照組及/或陽性(參考藥物或衍生藥物)對照組。

四、安全性藥理試驗測試方法的介紹

1. 核心群試驗

主要評估心血管、呼吸與中樞神經系統等三大器官/系統。

a. 一般活性與行為上的作用

可使用多方觀察的方法，肉眼觀察動物之一般活性，評估肉眼可觀察到的變化，以瞭解試驗物質的藥效作用。

b. 中樞神經系統的作用

(1) 可使用評估自發性活動力的設備，例如，wheeling cage、open field 方法，檢查試驗物質對自發性活動力(spontaneous locomotor activity)的影響。

(2) 可使用安眠劑。例如，巴比妥鹽酸(barbiturate)衍生物，評估一般麻醉作用。除了評估試驗物質對清醒的動物之麻醉作用外，亦須評估試驗物質對麻醉的動物產生的協同(synergistic)或拮抗(antagonistic)作用。若在此試驗模式觀察到試驗物質具有協同或拮抗作用，則要確定該作用是否作用於中樞神經系統。

(3) 可以電擊或 pentylenetetrazol 引發痙攣，也可視試驗需要以strychnine、picrotoxin、nicotine 等引發痙攣，評估試驗物質對痙攣的影響。除了評估試驗物質對活體動物的痙攣活性，亦須測試試驗物質對誘發痙攣的動物產生協力或拮抗作用。

(4) 可使用引發壓力的方法，或使用 writhing test、Randall-Selitto、hot plate、tail-flick 等方法，評估鎮痛作用。

(5) 評估試驗物質對體溫的影響。

c. 呼吸系統與心血管系統的影響

評估試驗物質對呼吸、血壓、血液流動、心率及心電圖的影響。一般使用麻醉中之動物進行試驗，若試驗需要也可使用清醒的動物。

2. 附屬性試驗方法

評估心血管、呼吸與中樞神經系統以外之器官/系統。

a. 自律神經系統及平滑肌的作用

使用適當的組織作用藥物，例如，histamine、acetylcholine、barium chloride、serotonin 等，評估試驗物質對迴腸的作用，包括試驗物質本身產生的作用及與平滑肌興奮劑之交互作用。

b. 消化系統的影響

評估試驗物質對胃腸道蠕動的影響。大鼠與鼯鼠的胃腸道蠕動時間，可以碳粉填充方法或其他生理測試儀器來評估觀察腸道蠕動之時間；同時檢查使胃排空的時間。

c. 水與電解質代謝的作用

測定尿液的體積及尿液中鈉離子、鉀離子、氯離子等的濃度。

d. 其他作用

- 評估試驗物質對血液凝集系統的影響。測量包括血液凝集 (blood coagulation) 時間、加鈣後凝集 (recalcification coagulation) 時間、及凝血酶原 (prothrombin) 時間。
- 評估試驗物質對血小板凝集的影響。測量包括二磷酸腺苷 (ADP)、膠原蛋白及花生油酸對血小板凝集的誘發。
- 評估試驗物質對腎功能的影響。測量包括腎小球過濾速率 (glomerular filtration rate, GFR) 與腎臟血流量 (renal plasma flow, RPF)。
- 評估溶血的可能性。

e. 其他重要的藥效作用

評估主藥效及上述作用以外的特別藥效作用，例如，與試驗物質的化學結構相近或藥效相近的藥物已知可能產生的作用。

3. 後續性試驗

根據核心群與附屬性試驗之試驗結果而決定須進行的測試方法，以期深入瞭解其藥效作用。

a. 中樞神經系統的作用

- (1) 評估試驗物質對腦電波(electroencephalogram)的影響，可利用電腦輔助數據分析。
- (2) 評估試驗物質對脊椎反應的影響。
- (3) 評估試驗物質對條件下迴避反應(conditioned avoidance response)的影響。
- (4) 使用適當的方法，例如，rotarod 測試法，評估試驗物質對運動協調能力與自發性活動力的影響。

b. 軀體神經系統的影響

- (1) 使用適當的製備，例如，坐骨神經-腓腸肌與橫隔膜神經-橫隔膜肌等離體組織模式，評估試驗物質對神經與肌肉的界面合體之影響。
- (2) 使用適當的方法包括收縮測試與 heat drop 方法，評估試驗物質對肌肉鬆弛之影響。
- (3) 使用適當的方法包括角膜反射與皮膚反射等，評估局部麻醉的作用。

c. 自主神經系統及平滑肌的作用

- (1) 評估試驗物質對瞳孔大小及瞬膜收縮之影響。
- (2) 利用離體的組織或器官，例如，血管、支氣管、輸精管、子宮等進行試驗。

d. 呼吸系統與心血管系統的影響

- (1) 評估試驗物質因對自律神經性、誘發迷走神經性及頸動脈閉塞等藥物引起的血壓或心率變化的影響。
- (2) 同時進行心臟功能檢驗。
- (3) 利用離體的組織或器官，例如，心臟、心房、乳頭肌、血管等，評估試驗物質對該組織或器官的影響。

e. 消化系統的影響

- (1) 評估試驗物質對胃液、唾液、膽汁、胰液分泌的影響。

- (2) 利用體外試驗，評估試驗物質對胃腸道的蠕動力之影響。
- (3) 利用體內試驗，評估試驗物質對胃腸道的蠕動力之影響。
- (4) 評估試驗物質對胃與十二指腸的黏膜之影響。

參考文獻

1. JMHV (1995). Japanese Guidelines for Nonclinical Studies of Drugs Manual.
2. ICH Harmonised Tripartite Guideline S7A “Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals” .[Step 5 (2000)]

第 2 節 藥動學 (Pharmacokinetics)

本章節以「藥動學試驗」(Pharmacokinetic Studies)名詞代表試驗物質之「吸收、分佈、代謝及排泄試驗」，藥動學試驗之目的是測定及了解試驗物質在動物體內的吸收、分佈、代謝及排泄的過程，其不僅可用於預估該試驗物質之藥效、作用的過程與機轉，同時也可經由試驗物質在體內分佈、滯留時間、濃度等數據預估發生不良反應的可能性，以選擇安全且有效的人體使用劑量。

基於科學不斷進步，本章節期望以現階段的科學水準並配合藥品特性，選擇適合的測試方法，例如，化學性質、藥效、毒性、臨床反應及給藥途徑，以進行藥動學試驗。

一、測試方法

1. 試驗物質

可能是藥品本身、經以同位素標定(isotope-labeled)之藥品[說明 1]，及未來欲發展之劑型(若試驗需要)進行試驗評估。

2. 動物品種

以支援藥理試驗、毒理試驗及預期人體臨床試驗所需之劑量為原則，選擇適當的動物品種[說明 2]。

3. 動物數量

吸收與排除的試驗，每組應至少有 4 隻動物。除非在特定情況下，一般不限制性別。若有性別差異時，則每種性別皆須包含四隻動物。若選用非齧齒類動物，可減少動物數量。

執行組織分佈試驗時，應先考慮每個時間點所需犧牲的動物數量後，再推估動物總數量[說明 3]。執行代謝試驗的動物數量，可依試驗需求而定。

4. 給藥途徑

與其他毒理試驗及未來臨床使用的給藥途徑相同，若試驗需要可以其他給藥途徑取代[說明 4]。

需考量賦型劑可能會影響藥物的藥動性質。另外，也需考量將試驗化合物直接灌食給予動物或加至食物中是否會影響吸收。

5. 劑量範圍

參考毒理學試驗、藥理學試驗、及臨床試驗使用之藥量，選擇適當的劑量範圍。

6. 給藥週期

原則上，單一及重覆給藥試驗均需進行。若進行重覆劑量給藥，則給藥週期與間隔須足以評估試驗物質在動物體內的穩定狀態、蓄積程度及對藥品代謝酶的影響。

7. 分析方法

清楚定義分析的方法及其靈敏度、準確度、專一性等性質。

二、觀測的參數

在評估試驗物質的藥動性質時，須觀察之參數，例如，排除半衰期($t_{1/2}$) [或任何其他相關的常數、排除速率常數(K_{el})、平均滯留時間(MRT)等]、清除率(CL)、分佈體積(V_d)及生體可用率(F)等。藉著觀察上述藥動參數，可確認試驗物質是否具有線性藥動學特性。經評估若需要，應一併監測該試驗物質代謝物的藥動特性。

1. 吸收(Absorption)

此試驗的目的是了解試驗物質的吸收程度及速率，可以藉由血液濃度與時間之曲線圖(blood concentration vs time curve)，或血液濃度與排泄蓄積量之曲線圖(blood concentration vs cumulative excretion)測定[說明 5、6]。若需要，應釐清影響試驗物質吸收的因素[說明 7]。

2. 分佈(Distribution)

此試驗的目的是評估試驗物質在不同器官與組織中的分佈情形，或隨時間而產生的蓄積變化 [說明 8]。須檢驗之項目包括：

- a. 試驗物質在組織與器官的濃度[說明 9]。
- b. 藉由動物全身性自體放射線攝影術(whole body autoradiography)觀察分佈之情形。
- c. 試驗物質移轉到胎盤和胎兒的情形。
- d. 與血漿蛋白質結合(plasma protein binding)及結合於紅血球中的量。

3. 代謝(Metabolism)

代謝試驗的目的是針對其代謝物，並進行定量，同時測定試驗物質的代謝途徑、程度、與速率，了解試驗物質在試驗動物與人體的代謝過程之異同處。代謝試驗一般係自生物檢體(例如，血液、尿液、膽汁與糞便)中分離出試驗物質或其代謝物後進行定量[說明 10]。若需要，應釐清影響試驗物質代謝的因素[說明 11]。

4. 排泄(Excretion)

排泄試驗的目的是在確定試驗物質及其主要代謝物的排泄途徑、程度與速率。若需要，應釐清影響試驗物質排泄的因素[說明 12]。排泄途徑之檢測包括：

- a. 尿液、糞便、呼氣[說明 13]。
- b. 膽汁[說明 14]。
- c. 乳汁。

5. 其他的評估及考慮項目

觀察試驗物質對藥物代謝酵素系統的影響，若試驗需要，則須觀察及評估藥品交互作用與首渡效應(first-pass effect) [說明 15]。若試驗物質為消旋混合物，則須檢驗每個光學異構物之藥動性質。

說明：

1. 使用同位素標定的藥品，須註明：供應者、合成方法、純度、使用的同位素、標定的位置、放射活度、安定性等相關資料。
2. 若選用齧齒類動物，體重差異需在平均體重的 20%之內。
3. 重複劑量或多時間點試驗，應考量每個時間點所需的動物數量而定，然而每組不應小於 2 隻動物。
4. 若以靜脈注射或其他途徑給藥，可不須考慮試驗物質吸收的過程，只須提供基本藥動數據，以了解試驗物質的藥動性質。
5. 血中濃度之數據包括自血清、血漿或全血所測得。試驗物質的吸收程度及速率可藉由測定試驗物質及其代謝物在最高血中濃度(C_{max})、服藥後達到最高濃度的時間(T_{max})及血中濃度對時間所作曲線下總面積(AUC)等參數而得。若以給藥途徑與靜脈注射或其他標準給藥途徑方式給藥的參數結果進行比較，可更精確地預估試驗物質的吸收程度與速率。

6. 排泄之數據包括測量試驗物質在糞便、尿液、膽汁、呼氣中的排泄量，這些總排泄量可與空白對照組做比較以作為試驗物質吸收程度的指標。
7. 下列因素會影響試驗物質吸收：
 - a. 試驗物質在腸胃道中之溶解度。
 - b. 在製備過程中試驗物質被釋出的情形。
 - c. 吸收部位。
 - d. 試驗物質在腸胃道內之代謝程度及安定性，若試驗物質是經由腸胃道以外部位給藥，則觀察試驗物質在給藥部位的代謝程度與安定性。
 - e. 腸胃道內之食物及酸鹼值。
8. 進行試驗時，要有足夠的觀測時間點，以反應試驗物質的藥動性質。
9. 此試驗在單一劑量試驗後進行，若發現試驗物質在器官與組織之濃度很高或呈現蓄積的現象，此時須進行重覆劑量組織分佈試驗，並須測定分佈在器官與組織中之化學成份，以了解試驗物質的毒性與藥效，並評估試驗物質的蓄積程度與血中濃度之關係。
10. 除了體內試驗，利用負責藥品代謝的器官細胞、細胞懸浮物及組織均質物(tissue homogenate)而得之檢品進行體外試驗，亦有助於了解試驗物質的代謝情形。
11. 代謝過程會因動物品種、年齡、性別、疾病症狀等因素而改變，亦可能因重覆劑量給予試驗物質或同時給予多種試驗物質使得代謝酵素被誘發或抑制而改變。代謝過程會因不同劑量與給藥速率而呈非線性現象，而試驗物質的非線性代謝現象與給藥途徑會影響到試驗物質與其代謝物的比例，及代謝型態。
12. 下列因素會影響試驗物質之排泄。例如，腎功能、尿液酸鹼值、尿流速率。
13. 放射性物質經單一劑量給藥後，須測量至排泄物的放射性總量達給藥量的 95%，或至給藥後第 7 天止，選用所需時間較短的一種測試方法進行。
14. 若試驗物質主要排泄至膽汁中，須觀察試驗物質或其代謝物是否參與腸肝循環(entero-hepatic circulation)。
15. 若試驗物質會影響自身的代謝酵素，或試驗物質具高蛋白結合率，則有可能產生藥物交互作用。若試驗物質以口服或其他途徑給予，在通過肝臟及腸道迅速被代

謝排除至膽汁中，則表示此物質有明顯首渡效應(first-pass effect)作用。

參考文獻

1. International Conference on Harmonization. Note for guidance on toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies (S3A). [Step 5 (1994)]
2. International Conference on Harmonization. Guidance for Repeated Dose Tissue Distribution Studies (S3B). [Step 5 (1994)]
3. OECD (1985). Guideline for Testing of Chemicals: 417 Toxicokinetics 1-10.

第3節 引起心室再極化時間延長風險的評估(QT 節段延長) [*The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals*]

本試驗是”人用藥物安全性藥理試驗(ICH S7A)的延伸及補充，適用於人體使用的新化合物和已上市藥物有需要的時候(例如，當發生臨床不良事件、新患者族群或新給藥途徑顯現先前未說明的疑慮)，在首次人類給藥前應考慮進行本節所述之非臨床試驗以評估心室再極化延遲與QT 節段延長的風險。其目的是確認試驗物質和其代謝物造成心室再極化延遲的風險，以及將延遲心室再極化程度和試驗物質及其代謝物濃度進行關聯性分析。本節也說明關於評估試驗物質引起心室再極化時間延遲風險的非臨床測試策略，包括有關非臨床試驗分析和整合性風險評估的資訊。當依法規建議執行本節之體外IKr 和體內QT 分析時，應該遵循GLP。

有關上述試驗的設計考量有：

- a. 在離體的動物或人類心肌細胞、體外培養心臟細胞株，或人類離子通道選殖於異體表現系統，測量離子電流。
- b. 在離體的心臟組織，或能顯現動作電位期間的麻醉動物，探討動作電位之參數。
- c. 在清醒或麻醉動物上測量心電圖(ECG)之參數。
- d. 在離體的心肌組織或動物上探討致促心律不整的作用(proarrhythmic effects)。

建議此類試驗的評估參考策略如下：

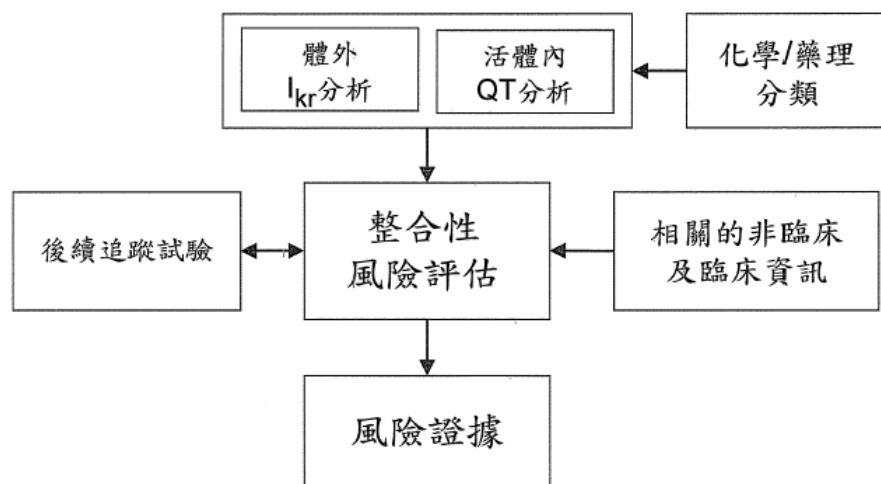
- a. 評估測試新藥是否屬於已知會延長人類QT 節段的藥理/化學類型，包括治療類型(例如，抗精神病藥物)、作用機轉(例如，H-1 抗組織胺藥物與抗心律不整藥物等)，以及化學結構(例如，fluoroquilones 類抗生素)。謹慎選擇對照化合物，並納入到整合性風險評估中。
- b. 離子電流試驗結果，測量 I_{Kr} 或經由表現 I_{Kr} 通道蛋白(hERG)之離子電流。
- c. 體內QT 分析是測量心室再極化指標，例如，QT 節段。這個分析能用來

設計同時符合 S7A (心血管核心試驗)及 S7B 兩者的目標。這將減少動物和其它資源的使用。

- d. 整合性風險評估時可參考以下試驗結果的資訊，包括：藥效學試驗；毒理學/安全性試驗；藥動學試驗，包括原型藥和代謝物的血中濃度(人體資料為優)；藥物交互作用試驗；組織分佈和蓄積試驗與上市後監視。
- e. 後續追蹤試驗用以提供有關效力、作用機轉、劑量反應曲線斜率或反應強度的額外資訊。後續追蹤試驗的設計是用來解釋特殊議題，因此可採用不同的體內或體外試驗設計。
- f. 根據非臨床試驗結果進行整合性風險評估。包括從後續追蹤試驗的結果和其它相關資訊，應該以科學角度為基礎並對試驗物質進行個別的整合性風險評估。這樣的評估有助於臨床試驗設計和其結果解釋。如果可以的話，此整合性風險評估應該包括在試驗主持人手冊中的非臨床概要。

例如圖四所示，綜合上述試驗策略，評估該測試新藥對人類的可能潛在危險。

圖四 建議評估心室再極化時間延長(QT 節段延長)風險的評估策略



參考文獻

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline S7B “The Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals” .[Step 5 (2005)]

第三章 毒理試驗規範 (Guidelines for Toxicity Studies)

第 1 節 單一劑量毒性試驗 (Single Dose Toxicity Study)

單一劑量毒性試驗目的為測試試驗物質經單一劑量給藥後(包含 24 小時內完成的多次給藥)，對哺乳類動物之急性毒性影響，包括檢測其在體內中毒理特性之量與質的任何改變，此試驗結果有助於定義出一個最大耐受劑量，與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標靶器官與遲發之毒性。同時單一劑量毒性試驗可協助選擇第一期臨床試驗的起始劑量，並瞭解服藥過量可能引發之急性毒性。

一、動物品種

使用至少 2 種的哺乳類動物，當試驗許可時，應包含 1 種非齧齒類動物[說明 1]。動物須包含雄、雌兩性。

二、動物數量

齧齒類動物每個劑量組使用 10 隻(5 雄、5 雌)或以上動物；非齧齒類每個劑量組使用 6 隻(3 雄、3 雌)或以上動物。

三、給藥途徑

進行兩種或以上的給藥途徑；(1)與未來人體臨床使用之給藥途徑相同，(2)會引起全身性作用的給藥途徑，若試驗物質許可，使用靜脈注射途徑給藥。若靜脈注射是未來人體臨床使用之給藥途徑，則不須進行其他給藥途徑[說明 2]。

四、劑量範圍

劑量範圍須包含不會產生不良反應及足以顯示毒性症狀(造成死亡)之劑量。此外，還要包括載體對照組、及/或空白對照組。若試驗物質毒性很低，則以試驗物質許可之最高極限劑量進行 [說明 3]。

五、觀察

1. 試驗觀察期為給藥後 14 天。每天至少觀察試驗動物的症狀 1 次，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。

2. 在觀察期間將瀕死犧牲與已死亡的動物，及在第 14 天試驗終結存活的所有動物均須進行屍體解剖和肉眼病理檢查。該檢查應在動物犧牲或發現死亡時立即進行，若非立即進行，需將動物屍體冷凍保存以避免自體溶解。

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，則可刪除非啮齒類動物的單一劑量毒性試驗。
2. 啮齒類動物，口服給藥若採強迫餵食的方式，給藥前動物須經過特定時段的禁食，而給藥之體積一般在 10 mL/kg 動物體重以下，若給藥體積過高，可採多次給藥方式。
3. 依動物保護原則，試驗設計應以最少的動物數量來獲得最大量的資訊，不建議使用龐大的動物量來計算致死率的參數(例如，LD50)。

參考文獻

1. FDA (1996). Guidance for Industry: Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals.
2. FDA (2000). Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients (Redbook 2000).

第 2 節 重覆劑量毒性試驗 (Repeated Dose Toxicity Study)

重覆劑量毒性試驗之目的是測試試驗物質經重覆給藥後對哺乳類動物可能產生之毒性影響，瞭解毒性變化之產生，同時測定無毒性顯示之劑量。給藥時間的長短，依照試驗物質在未來臨床使用之頻率，與其臨床發展階段，選擇毒性試驗的給藥期間，請參見 ICH M3(R2)之規範。一週給藥 7 天，請參見第一章表一及表二 [說明 1-4]之說明。

一、動物品種

使用至少兩種的哺乳類動物，一種為齧齒類，另一種為非齧齒類動物，最常使用的動物為大鼠和狗。

二、性別

雄、雌兩性動物的數量須相同。

三、動物數量

對齧齒類動物，依個別毒性試驗長短之有不同的要求：6 個月以下的毒性試驗，齧齒類動物每個劑量組使用雄、雌各 10-20 隻或以上動物；6 個月或以上，每個劑量組使用雄、雌各 20 隻以上動物。非齧齒類，原則上每個劑量組使用雄、雌各 3-5 隻或以上動物。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，而每次試驗中期解剖，每組齧齒類動物雄、雌各 10 隻或以上。

四、給藥途徑

若無正當特殊理由，應與未來人體臨床使用的給藥途徑相同[說明 5]。

五、劑量範圍

為了使毒性試驗能夠顯示試驗物質的毒性影響，並瞭解劑量與毒性間的關係。試驗中至少要有 3 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(例如，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，若此載體無足夠的毒性顯示其不會影響試驗結果，則必須增加空白對照組。

六、觀察與檢驗

1. 觀察

- a. 每天至少觀察動物 2 次，每次間隔 6 小時，以確定死亡情形。
- b. 每天至少觀察試驗動物的症狀 1 次，記錄試驗動物顯示的毒性及藥效作用，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。在重覆劑量毒性試驗，須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。若試驗需要，須同時測量動物的飲水消耗量。

- a. 體重：試驗開始給藥前，測量動物體重；給藥期間每週至少測量 1 次。
- b. 食物消耗量：給藥期間每週至少測量 1 次。齧齒類動物食物消耗量之測量可以每隻或每組為單位[說明 6]。

3. 病理檢驗

a. 血液檢驗(Hematology)

齧齒類試驗動物在給藥前、給藥期間(若試驗需要)及解剖前採樣以進行血液檢驗；非齧齒類試驗動物須在開始給藥前、給藥期間(若試驗需要)及解剖前各採樣 1 次以進行血液檢驗，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選擇雄、雌各 10 隻或以上動物進行檢測。血液檢驗項目愈多愈好[說明 7]，視試驗需要而定。

b. 血清生化檢驗(Clinical Chemistry)

齧齒類試驗動物在給藥期間(若試驗需要)及解剖前採樣以進行血清生化檢驗；非齧齒類試驗動物須在開始給藥前、給藥期間(若試驗需要)及解剖前各採樣 1 次以進行血清生化檢驗。動物進行血液採樣前，須經過禁食(8 小時以上)。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，齧齒類動物每個劑量組選擇雄、雌各 10 隻動物或以上進行檢測。血清生化檢驗項目包括電解質的平衡、醣類的代謝、及肝與腎功能等[說明 8]。

c. 尿液分析(Urinalysis)

視試驗需要進行。齧齒類動物，每個劑量組選擇雄、雌各 10 隻動物或以上在給藥期間至少進行尿液分析 1 次；而非齧齒類動物，則所有的試驗動物在試驗開始給藥前及給藥期間至少進行尿液分析 1 次[說明 9]。

d. 眼科檢查(Ophthalmological examination)

齧齒類動物，最高劑量組及對照組的動物在試驗開始、給藥期間(若試驗需要)及試驗結束時至少進行 1 次的眼科檢查。若發現眼睛的改變是因試驗物質引起，則在此次及其後定期檢查時，全部動物均須進行眼科檢查；而非齧齒類動物，則所有的試驗動物在試驗開始、給藥期間(若試驗需要)及試驗結束時至少進行 1 次的眼睛檢查[說明 10]。

e. 其他測試

若試驗需要，可進行免疫毒性、EKG、視力、聽力及腎功能等測試。

4. 組織病理檢驗[說明 11]

- a. 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（例如，嚴重程度）。
- b. 為了獲得更充足的毒性資訊，瀕死的動物均行安樂死。動物在進行安樂死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，以瞭解毒性變化的性質（嚴重程度），若試驗需要，記錄主要臟器的重量。
- c. 試驗結束(給藥期或復原期)，全部存活的動物行安樂死後，在剖檢前先收集血液樣品，以進行血液與血清生化分析。屍體解剖時，觀察及記錄動物的器官與組織之肉眼變化，並測量主要臟器重量。非齧齒類動物，全部動物之器官與組織須進行組織病理檢驗，而齧齒類動物則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，進行組織病理檢驗。在慢性毒性試驗，中、低劑量組動物之主要器官(肺、肝及腎臟)亦須同時進行組織病理檢驗。

5. 復原試驗

為瞭解毒性變化的可逆性，可考慮在試驗中加入復原試驗組。

6. 毒理動力學資料對於重覆劑量毒性試驗的解讀、後續毒性試驗之設計及人體安全性評估十分重要，請參考本章第十節。

七、結果分析

試驗報告應適當且忠實地呈現試驗的原始數據及所獲得之資訊，並以相關的統計方法加以分析。各組別之數據應有摘要表示之，個別動物的數據也應附於試驗報告中。試驗報告最後應對試驗結果做結論，但作試驗結論時，除必須注意統計學上的意義外，也應以生物學上的意義(biological significance)及其合理性來解讀試驗結果。

說明

1. 重覆劑量毒性試驗依給藥時間之不同可分為三種：亞急性毒性試驗給藥時間為1個月以下(含1個月)；亞慢性毒性試驗給藥時間為1-3個月(含3個月)；慢性毒性試驗給藥時間為3個月以上。
2. 若以胃管給藥，28天及90天重覆劑量毒性試驗每週給藥7天，6個月或以上若有特殊理由，每週至少給藥5天。
3. 若重覆劑量毒性試驗之試驗期為3個月或以上，在試驗前須先進行1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，同時可瞭解該試驗物質的早期毒性變化，配合長期毒性試驗的結果，可瞭解該試驗物質的毒性影響。
4. 若試驗物質在體內會產生大量的累積，長期的給與試驗物質會造成不可復原的毒性或毒性明顯地增強。
5. 口服給藥若以胃管給藥時，給藥之體積一般在10 mL/kg動物體重以下，若給藥體積過高，可採多次給藥方式，但須在6小時內完成。
6. 若試驗物質是以混入飼料(一般測試物質不超過飼料5%)或飲用水的方式給藥，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安定性與純度的量與質之測量。
7. 血液檢測項目：hematocrit、hemoglobin、erythrocyte count、total and differential leukocyte counts、platelet count及凝血因子(clotting time、

prothrombin time 或 activated partial thromboplastin time)等之測量。

8. 血清生化檢測項目：

- a. 血清生化檢測項目包含 alanine aminotransferase、albumin、alkaline phosphatase、aspartate aminotransferase、bilirubin (total)、calcium、chloride、creatinine、鵝-glutamyl transferase、glucose (in fasted animals)、phosphorus、potassium、protein (total)、sodium、total cholesterol、urea nitrogen 等。
- b. 若試驗動物之血液量取得不足，則優先考慮檢測以下的項目：alanine aminotransferase、alkaline phosphatase、aspartate aminotransferase、chloride、creatinine、鵝-glutamyl transferase、glucose (in fasted animals)、potassium、protein (total)、sodium、urea nitrogen 等。
- c. 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，例如，acid/base balance、cholinesterases、hormones、lipids、methemoglobin 和 proteins 等項目。

9. 尿液分析項目：顯微鏡觀察尿沈渣(Urine sediment microscopy)、測量尿液之量、酸鹼(pH)值與比重(specific gravity)，及測量尿液中之 protein、glucose、ketone、bilirubin 與 occult blood 等的含量。

10. 眼睛檢驗包括肉眼檢驗與鏡檢眼睛的外部、視覺介質及眼底。

11. 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：

- a. 臟器稱重：adrenals、brain、kidneys、liver、thymus、spleen、heart、gonads 及 thyroid/parathyroid (適用於非齧齒類動物)等分別稱重。

- b. 組織病理檢驗：

- (1) 齧齒類動物之器官與組織：adrenals、aorta、bone (sternum/femur)、bone marrow (sternum/femur)、brain (at least 3 different levels)、cecum、colon、corpus and cervix uteri、duodenum、epididymis、esophagus、eye(s)、gall bladder (if present)、Harderian gland*、heart、ileum、jejunum、kidney(s)、lacrimal gland*、liver、lung(s)、lymph nodes (representative)、mammary gland、

nasal turbinates*、ovaries and fallopian tubes、pancreas、pituitary、prostate、salivary gland、sciatic nerve、seminal vesicle、skeletal muscle、skin、spinal cord (at least 2 different locations)、spleen、stomach、testes、thymus (or thymic region)、thyroid/parathyroids、trachea、urinary bladder、uterus、vagina*、Zymbal' s gland* and all tissues showing abnormality。

* 視試驗需要才進行。

(2) 非嚙齒類動物之器官與組織：adrenals、aorta、bone (sternum/femur)、bone marrow (sternum/femur)、brain (at least 3 different levels)、cecum、colon、corpus and cervix uteri、duodenum、epididymis、esophagus、eye、gall bladder (if present)、heart、ileum、jejunum、kidneys、liver、lung (s)、lymph node (representative)、mammary glands、ovaries and fallopian tubes、pancreas、pituitary、prostate、rectum、salivary gland、sciatic nerve、seminal vesicle、skeletal muscle、skin、spinal cord (at least 2 different locations)、spleen、stomach、testes、thymus (or thymic region)、thyroid/parathyroid、trachea、urinary bladder、vagina and all tissues showing abnormality。

參考文獻

1. International Conference on Harmonization M3(R2). Guidance non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. [Step 5 (2009)]
2. FDA (2000). Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients (Redbook 2000).
3. OECD Guideline for Testing of Chemicals (1981) Chronic Toxicity Studies.
4. OECD Guideline for Testing of Chemicals (1998) Repeated Dose 90-day Oral Study in Rodents.
5. OECD Guideline for Testing of Chemicals (1998) Repeated Dose 90-day Oral Study in Non-Rodents.

6. ICH Harmonised Tripartite Guideline S4 “Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (Rodent and Non-Rodent Toxicity Testing)” .[Step 5 (1998)]

第 3 節 基因毒性試驗 (Genotoxicity Study)

基因毒性試驗可分為體內與體外測試，其目的為偵測化合物直接或間接引發的基因損傷，並測定其對基因的損傷程度。一般基因突變、廣泛性的染色體損害、重組、或染色體數量改變等基因損害可能會導致遺傳疾病或體細胞之變性，若試驗物質會導致上述損傷，則該試驗物質可能為人體致癌物或致突變原，可能會導致癌症或遺傳缺陷。一般基因毒性試驗不僅能預測試驗物質的致癌性，且其試驗結果有助於致癌性試驗的結果分析。特定化合物與人類癌症生成之關係已建立，但是特定化合物與遺傳性疾病之關係尚無法確立，因此基因毒性試驗主要是用來預測癌症之生成。

一般試驗物質須進行 3 種以上的基因毒性測試，以評估其基因毒性，基因毒性試驗包括：

- (1) 細菌基因突變分析(A test for gene mutation in bacteria)；
- (2) 體外哺乳類細胞的染色體損傷分析法或體外小鼠淋巴瘤 tk 分析法(An in vitro test with cytogenetic evaluation of chromosomal damage with mammalian cells or an in vitro mouse lymphoma tk assay)；
- (3) 啮齒類動物造血細胞的動物體內染色體損傷分析法 (An *in vivo* test for chromosomal damage using rodent hematopoietic cells;
- (4) 其他體內基因毒性分析：最常被發表並建議的方法為 DNA 鏈斷裂分析(DNA strand break assay)，一般常用為哺乳動物肝細胞非程序 DNA 合成分析 [Liver unscheduled DNA synthesis (UDS) assay]。

進行基因毒性測試時，下面兩個標準試驗組合選項被認為是同等適合：

選項 1.

- (1) 細菌基因突變分析。
- (2) 體外哺乳類細胞的染色體損傷分析法或體外小鼠淋巴瘤 tk 分析法
- (3) 1 種體內的基因毒性試驗，一般使用啮齒類動物造血細胞的動物體內染色體損傷分析法去分析染色體損傷，無論是檢視微核或中期細胞染色體異常皆可。

選項 2.

- (1) 細菌基因突變分析。

- (2) 用 2 種不同組織的體內試驗進行基因毒性評估，通常是先使用一項齧齒類動物造血細胞的微核試驗，再進行第 2 種體內試驗(一般是肝臟的 DNA 斷鏈試驗)。

基因毒性綜合測試法(包括體外與體內)因實驗條件會導致偽陰性或偽陽性反應，所以即使基因毒性試驗結果呈陽性反應，不一定表示試驗物質會對人體產生基因毒性或致癌性(反之亦然)。因此以上的基因毒性測試方法只能提供基本的基因毒性資訊，應依試驗物質的性質加入其他的基因毒性測試方法[說明 1]。

一、細菌基因突變分析(A test for gene mutation in bacteria)

1. 菌株

使用下列 5 種菌株：

- a. *S. typhimurium* TA98
- b. *S. typhimurium* TA100
- c. *S. typhimurium* TA1535
- d. *S. typhimurium* TA1537、TA97、或 TA97a
- e. *S. typhimurium* TA102、*E. coli* WP2 uvrA、或 *E. coli* WP2 uvrA (pKM101)

2. 劑量範圍

進行至少 5 個濃度組，最高濃度須足以產生明顯的毒性[說明 2]。

3. 對照組

對照組包含陰性及陽性對照組[說明 3]。

4. 代謝活化(Metabolic activation)

進行含有及不含有 S9 混合物的測試[說明 4]。

5. 測試方法

- a. 前置培養法(Preincubation method)
- b. 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以及平均值，須以表格方式詳細記錄。

二、體外哺乳類細胞的染色體損傷分析法或體外小鼠淋巴瘤 tk 分析法 (An *in vitro* test with cytogenetic evaluation of chromosomal damage with mammalian cells or an *in vitro* mouse lymphoma tk assay)

1. 體外哺乳類細胞的染色體損傷分析法 (An *in vitro* test with cytogenetic evaluation of chromosomal damage with mammalian cells)

a. 細胞

使用哺乳類細胞株或初代哺乳類細胞。

b. 濃度範圍

進行至少三個濃度組 [說明 5]，濃度間隔可為 2 倍或 half-log。

c. 對照組

對照組包含陰性及陽性對照組 [說明 3]。

d. 代謝活化

進行含有及不含有代謝活化系統的測試，例如，S9 混合物 [說明 4]。

e. 實驗步驟

(1) 細胞在試驗物質處理後之適當時機，製備染色體玻片 [說明 6]。

(2) 每個濃度組製備 2 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 [說明 7]。

f. 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. 體外小鼠淋巴瘤 tk 分析法 (*In vitro* mouse lymphoma tk assay)

a. 細胞

使用 L5178Y TK^{+/+} 小鼠淋巴瘤細胞株。

b. 濃度範圍

進行至少三個濃度組 [說明 8]，濃度間隔可為 2 倍或 half-log。

c. 對照組

對照組包含陰性及陽性對照組[說明 3]。

d. 代謝活化

進行含及不含有 S9 混合物測試[說明 4]。

e. 實驗步驟

(1) 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。

(2) 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[說明 9]之篩選培養液中，以測定其致突變數量及細胞複製之效率。

f. 試驗結果

以表格方式描述每個濃度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。

三、齧齒類動物體內造血細胞的染色體損傷分析法 (An *in vivo* test for chromosomal damage using rodent hematopoietic cells)

1. 動物

大鼠、鼯鼠皆可用，但若分析周邊紅血球細胞時，建議使用鼯鼠。一般而言，使用單一性別即可。一般使用雄性鼯鼠[說明 10]。

2. 動物數量

每劑量組至少 5 隻動物。

3. 給藥途徑

以腹腔注射或與臨床給藥相同的途徑給藥[說明 11]。

4. 劑量範圍

測試至少三個劑量組[說明 12]。

5. 對照組

一般以試驗物質使用之溶劑作為陰性對照組。陽性對照組則給與會引發致突變之

物質。

6. 給藥頻率

單一或重覆劑量均可。

7. 測試方法

- a. 齧齒類骨髓細胞之染色體變異測試法 (Chromosomal aberrations in bone marrow cells of rodents)
- b. 齧齒類骨髓細胞之微核測試法 (Micronuclei in bone marrow cells of rodents)
- c. 齧齒類紅血球細胞之微核測試法 (Micronuclei in peripheral blood of rodents)

8. 實驗步驟

a. 齧齒類骨髓細胞之染色體變異測試法

- (1) 經試驗物質處理的動物在適當時機進行安樂死，製備染色體玻片[說明 6]。
- (2) 每個劑量組製備 2 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[說明 7]。

b. 齧齒類骨髓細胞或紅血球細胞之微核測試法

- (1) 經試驗物質處理的動物在適當時機進行安樂死，並製備骨髓或血液抹片[說明 13]。
- (2) 每隻動物至少觀察 2000 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 [說明 14]。

9. 試驗結果

a. 齧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。

b. 齧齒類骨髓細胞或紅血球細胞之微核測試法

以表格記錄多染性紅血球或網狀紅血球中小核發生的數目，及多染性紅血球

或網狀紅血球佔全部紅血球的比例。

四、DNA 斷鏈分析法 (DNA strand break assay)

常用以哺乳動物肝細胞非程序 DNA 合成分析[Liver unscheduled DNA synthesis (UDS) assay]為主。

1. 動物

通常採用大鼠，也可使用其他哺乳動物。

2. 動物數量

每劑量組至少 3 隻動物，同時進行的陰性和陽性對照組需用 1 隻或 2 隻動物。

3. 給藥途徑

一般採用灌胃或合適的插管套管進行口服投與藥品，只要能夠證明合理也可採用其他給藥途徑。但不建議腹腔注射，因為這樣可能使受試物不經過循環系統而直接曝露於肝臟。

4. 劑量範圍

通常至少設 2 個劑量組，高劑量應足以產生明顯毒性，低劑量一般為高劑量的 50%~25%。

5. 對照組

一般以試驗物質使用之溶劑作為陰性對照組。陽性對照組則給與應當是已知能產生 UDS 的物質。

6. 給藥頻率

通常為單一劑量。

7. 肝細胞製備

通常動物給藥後 12~16 小時製備肝細胞。短期培養的哺乳動物肝細胞通常採用膠原酶(collagenase)原位灌流肝臟，使新鮮分離的肝細胞貼附至適宜的表面上。陰性對照組動物的肝細胞應至少有 50%的存活率。

8. 實驗步驟

新鮮分離的哺乳動物肝細胞通常在含有 3HTdR (胸腺嘧啶核苷)的培養液中培養

適當的時間，例如，3-8 小時。在培養期結束後，細胞去除培養液，然後放置含有過量未標定的胸腺嘧啶核苷，以除去未摻入到細胞的放射性活性。然後將細胞漂洗、固定和乾燥。載玻片標本浸泡於放射顯影乳劑中，置於暗處(例如，冷藏 7-14 天)曝光、顯影、染色及曝露的銀粒計數。每隻動物準備兩到三個載玻片。

9. 試驗結果

應提供每張載玻片標本及每隻動物的數據，並總結成表格形式。從每隻動物、每個劑量和每個採樣時間得到的測定核內銀粒數(nuclear grains)減去核面積相當的細胞質內銀粒數(cytoplasmic grains)來計算出淨核銀粒數(net nuclear grain counts)。

五、結果分析

1. 若體外或體內的測試結果呈現陽性反應，則應對其生物關聯性進行評估。
2. 對於體外試驗測試結果呈陰性反應，需進一步評估體外代謝活化的標準技術(例如，齧齒動物肝臟 S9)是否適用於藥物的結構或已知的代謝系統。若不適用，需考量使用其他適當的測試方法或系統。
3. 若試驗物質在體外測試系統中呈陽性反應，則須進行動物基因毒性試驗，針對骨髓、血液或其他組織進行分析，以便獲取進一步的資訊。[說明 15]。
4. 若試驗物質在細菌基因突變分析試驗結果為陰性，但在體外染色體變異試驗結果為陽性，建議額外執行其他染色體變異試驗，或進行兩個適當的體內試驗來做進一步驗證 [說明 16]。當陽性的結果僅見於 S9 活化系統存在的情況下，首先應確認是代謝活化所造成，而非其他條件的差異所導致。
5. 若動物試驗呈現陰性反應時，應證明標靶器官的藥物曝露量，這一點對於體外試驗呈現明顯的陽性，而動物試驗為陰性反應之結果尤其重要。
6. 動物基因毒性試驗也有可能造成陽性結果的誤判，而沒顯示出真正的基因毒性 [說明 17]，因此，當進行基因毒性數據評估時，重點是要把所有的毒理學和血液學的結果納入考量。間接影響毒理變化的相關作用可能要有安全係數，並且可能與臨床不相關。
7. 若體內與體外測試的試驗結果不一致時，則須依個案加以解釋。
8. 在基因毒性標準試驗中呈現陰性，但在致癌性試驗顯示腫瘤數增加，而無足夠證

據以建立非基因毒性機制的化合物，得於適當的模式進行額外的基因毒性測試。為了幫助瞭解作用機轉，其他試驗包括修飾後的體外代謝活化試驗，或於動物試驗之腫瘤標靶器官測定基因損傷，例如，DNA 斷鏈檢測(彗星試驗或鹼析試驗)、肝臟 UDS 試驗、DNA 共價結合(例如，³²P-後標記)、轉殖基因的突變誘導，或腫瘤相關基因遺傳變異的分子特性分析。

說明

1. 基因毒性測試：

a. 以基因突變為參考指標的測試方法

- (1) Bacterial reverse mutation test
- (2) *In vitro* mammalian cell gene mutation test
- (3) Sex-linked recessive lethal test in *Drosophila melanogaster*
- (4) Mouse spot test
- (5) Specific locus test with mice

b. 以染色體變異做為參考指標的測試方法

- (1) *In vitro* mammalian chromosome aberration test
- (2) Mammalian bone marrow chromosome aberration test
- (3) Mammalian erythrocyte micronucleus test
- (4) Mammalian spermatogonial chromosome aberration test
- (5) Rodent dominant lethal test
- (6) Mouse heritable translocation assay

c. 以基因受損為參考指數的測試

- (1) Unscheduled DNA synthesis in mammalian cells *in vitro/in vivo*
- (2) *In vitro* sister chromatid exchange assay in mammalian cells

d. 其他測試

- (1) Gene mutation assay in *Saccharomyces cerevisiae*
- (2) Mitotic recombination assay in *Saccharomyces cerevisiae*

2. 足以產生明顯毒性的劑量為最高劑量，而毒性可由初步試驗中逆突變菌落(revertants)數量的減少測得。當不受溶解度或細胞毒性限制時，最大劑量的建議是 5 mg/plate (或為 5 μ L/plate，當試驗物質是液體時)。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。若試驗物質具有細胞毒性，應提出顯著毒性劑量的證據，但不超過最大劑量 5 mg/plate。
3. 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)。
4. 使用 S9 混合物(S9 及 coenzymes 等)。S9 製備方法為哺乳類動物(最常使用齧齒類)經化學物質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。
5. 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。
6. 由於試驗物質可能會造成細胞週期延長，故須在一個適當的時間間隔製備檢品。細胞需經 3-6 小時加與不加 S9 的處理，如結果皆為陰性，則應延長處理時間至約 1.5 個細胞週期不加 S9。
7. 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。
8. 依據初步試驗結果決定最高劑量，以試驗物質會造成 80%~90%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 0.5 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 0.5 mg/mL 或 10 mM。
9. 嘧啶類似物，例如，trifluorothymidine (TFT)等
10. 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，則應使用該性別進行試驗。周邊血液微核試驗只在雄性齧齒動物內經過確效。

11. 口服給藥一般以強迫餵食方式給藥。
12. 若試驗需要，可由短期試驗之單一(或重覆)劑量給藥決定最高容許劑量，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，例如，抑制體重增加等。一般以最高容許劑量作為最高劑量，針對短期試驗(通常給藥1-3次)，若可耐受，最大給藥限制劑量為2000 mg/kg，而14天或以上的試驗限制劑量為1000 mg/kg。
13. 以單一劑量投與藥物之動物，應於投藥後24到48小時之間至少採集骨髓檢品至少兩次或於36到72小時之間至少採集周邊血液檢品兩次。多次投與藥物之動物，應於最後一次投藥後18到24小時之間採集骨髓檢品一次或於36到48小時之間採集周邊血液檢品一次。
14. 可採用Acridine-orange螢光劑或其他螢光染劑之染色方法。可以觀察網狀紅血球(reticulocytes)的產生取代多染性紅血球(polychromatic erythrocytes)。
15. 若體外試驗結果呈現陽性反應，則須考量是否與下列因素有關：(1)陰性或空白對照組的反應是否增加，是否與細胞遺傳毒性有關。(2)該陽性反應是否具濃度依存性。(3)若陽性反應不甚明顯，則該作用是否具有再現性。(4)陽性反應結果是否為特定代謝活化途徑或特定活化代謝物所導致的結果。(5)產生的作用是否因極端的體外培養條件(在體內中不會產生)，例如，極端的pH值、滲透濃度、沈澱物所造成的。(6)陽性反應是否只在少數存活的哺乳類細胞中觀察到。(7)類似化合物會否出現相同的測試結果。
16. 體外的基因毒性
 - (1) 有助於對缺乏相關基因毒性的證據權重之機制資訊常產生於體外，例如，在鱘鼠淋巴瘤分析法中，誘導染色體變異或基因突變的受試物不是DNA損傷劑的證據(例如，除了細菌突變分析外的其他突變/DNA損傷測試結果陰性；結構考量)，或與體內試驗可能不相關的間接機制證據，或有閾值(例如，抑制DNA的合成，只在高濃度下產生的活性氧)。類似的試驗也用於體外微核試驗陽性結果的後續試驗，或在證據包含有染色體遺失/非整倍體等已知機制，或者在著絲粒染色實驗顯示有染色體遺失的情況下。多倍體常見於體內染色體變異測試法。雖然非整倍體誘發劑可誘導多倍體，但單有多倍體並不表示有非整倍體潛力，僅能表示細胞週期受干擾，通常也與細胞毒性增加有

關。如果在體外微核測試法見到的是多倍體，而不是結構性的染色體斷裂，在確保有充分暴露的體內微核試驗上的陰性結果，將提供缺乏非整倍體誘導潛力的足夠證明。

如果上述機制資訊和證據權重支持缺乏相關的基因毒性，僅需有充分暴露證據的單一體內試驗便可確立沒有基因毒性。這通常會是細胞基因學試驗，並且當後續有染色體遺失的可能性時，體內微核試驗會被要求。如果沒有足夠的證據權重或機制訊息來排除相關的基因毒性，一般會要求兩個體內試驗，並採用適當的終點和合適的組織(通常是2個不同的組織)以及著重在體內模型獲得足夠的暴露量。

(2) 進行兩個適當的體內檢測，通常採用不同的組織，以及有支持暴露量的證據。

17. 會誤判為陽性的情況，例如，(1)微核的增加可能歸因於干擾紅血球生成，而無任何基因毒性。(2) DNA 鍵結物數據的詮釋應考量內源性鍵結物。(3)間接影響毒理變化的相關作用，可能會影響 DNA 斷鏈檢測(鹼析法和細胞培養彗星試驗)的結果。

參考文獻

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline S2B. “Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing for Pharmaceuticals” .[Step 5 (1997)]
2. JMHW (1995). Japanese Guidelines for Nonclinical Studies of Drugs Manual.
3. ICH Harmonised Tripartite Guideline S2A. “Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals” .[Step 5 (1995)]
4. Gatehouse D., Haworth S., Cebula T., Gocke E., Kier L., Matsushima T., Melcion C., Nohmi T., Ohta T., Venitt S. and Zeiger E. (1994). Report from the working group on bacterial mutation assays: International workshop on standardization of genotoxicity test procedures. *Mutat. Res.*, **312**:217-233.
5. Yahagi M., Nagao Y., Seino T., Matsushima, T., and Sugimura T. (1977).

- Mutagenicities of N-nitrosamines on Salmonella. *Mutat. Res.*, **48**:121-129.
6. Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutat. Res.*, **113**:173-215.
 7. Swierenga S.H., Heddle J.A., Segal E.A., Gilman J.P., Brillinger R.L., Douglas G.R. and Nestmann E.R. (1991). Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories. IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, **246**:301-322.
 8. Clive D., Caspary W., Kirby P.Z., Krehl R., Moore M., Mayo J. and Oberly T.J. (1987). Guide for performing the mouse lymphoma assay for mammalian cell mutagenicity. *Mutat. Res.*, **189**:143-156.
 9. Hayashi M., Sofuni T. and Ishidate M. Jr. (1984). Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberration in mouse bone marrow. *Mutat. Res.*, **127**:129-137.
 10. Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T. and Ishidate M. Jr. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.*, **245**:245-249.
 11. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guideline for the testing of chemicals:
 - No. 471: Bacterial reverse mutation test, 1997
 - No. 473: *In vitro* mammalian chromosome aberration test
 - No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test
 - No. 475: Mammalian bone marrow chromosome aberration test
 - No. 476: *In vitro* mammalian cell gene mutation test
 - No. 477: Genetic toxicology: Sex-linked recessive lethal test in *Drosophila melanogaster*

- No. 478: Genetic toxicology: Rodent dominant lethal test
- No. 479: Genetic toxicology: *In vitro* sister chromatid exchange assay in mammalian cells
- No. 480: Genetic toxicology: *Saccharomyces cerevisiae*, Gene mutatin assay
- No. 481: Genetic toxicology: *Saccharomyces cerevisiae*, Mitotic recombination assay
- No. 482: Genetic toxicology: DNA damage and repair, unscheduled DNA synthesis in mammalian cells *in vitro*
- No. 483: Mammalian spermatagonial chromosome aberration test
- No. 484: Genetic toxicology: Mouse Spot test
- No. 485: Genetic toxicology: Mouse heritable translocation assay
- No. 486: Unscheduled DNA synthesis (UDS) test with mammalian liver cells in vivo
12. ICH Guideline S2(R1) “Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use” .[Step 4 (2011)]

第 4 節 生殖與發育毒性試驗 (*Reproductive and Developmental Toxicity Studies*)

新試驗物質若可能使用於懷孕前、懷孕期及授乳期的病患，均須進行生殖與發育毒性試驗。一般生殖與發育毒性試驗將懷孕至離乳時期共分為 3 個試驗階段進行：

- (1) 生殖與發育毒性第一期試驗係測試試驗物質對雄、雌兩性的生育力影響及研究受精卵之運送與著床，其給藥週期分別在懷孕前與懷孕初期。
- (2) 生殖與發育毒性第二期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，其給藥週期自著床至器官形成完全之階段，為器官形成期。
- (3) 生殖與發育毒性第三期試驗係測試試驗物質對母體、胚胎發育及幼胎之影響，及引起畸胎之可能性，其給藥週期自著床後至授乳完全之階段。

藉著第一、二及三期試驗結果，可瞭解試驗物質對生育力、胚胎毒性、幼胎發育及母體授乳等影響及引起畸胎之可能性，然而其他的試驗方法若能達到本試驗的目的，且有助於臨床安全性評估，也可加以採用。

若由其他毒性試驗結果得知此試驗物質可能對生殖系統產生影響，而此試驗物質可能使用於多數孕婦時，則須進行更詳細的生殖與發育試驗，包括檢測試驗物質在母體與胎兒之血液、組織器官及母乳中的濃度，檢驗試驗物質的代謝，及直接對幼胎給藥，以瞭解其藥動學型態。

一、有關試驗動物及給藥處理的一般建議

(一) 試驗動物

1. 動物的種類與品系之選擇，須考慮其健康情形及生殖之相關資訊，包含生育力、生殖力、先天性畸形自然發生率及胚胎死亡率。
2. 通常採用和其他毒性試驗相同的哺乳類動物種類及品種，並選擇先天性畸形自然發生率低的種類與品種，最常使用大鼠做為主要啮齒類試驗動物的原因是因為其實用性、可與此動物種類其他實驗發現結果進行比較，並且有大量累積的背景資料庫。
3. 生殖與發育毒性試驗第一、二及三期均使用相同種類與品系之動物。
4. 在同一試驗內及不同試驗間所使用的動物，在試驗開始時應該有可以互相比擬的

年齡、體重及生產次數；最簡單方法就是使用年輕成熟的動物，並且和未交配過的雌性動物進行交配。

5. 傳統上，在胚胎毒性的試驗中需要使用另一種哺乳類動物，兔子是“非齧齒類動物”的最佳選擇。在不適合使用兔子的狀況下，可以選擇另一種非齧齒類或第二種齧齒類動物，並應依照案件的原則個別考慮。

(二) 給藥處理

1. 劑量

最高給藥劑量應根據其他所有已進行試驗(藥理、急性與慢性毒性以及動力學試驗)的資料而決定。一個為期 2-4 週的重覆劑量毒性試驗非常類似生殖試驗期設計的處理時間，可以由此參考給藥劑量，當無法獲得充分可用的資訊時，則考慮進行預試驗。一旦決定了最高給藥劑量，應以降幕方式依序選擇較低的給藥劑量，劑量間隔依據動力學及其他毒性因子來決定。雖然最好能夠決定出“不造成任何不良反應的劑量”(NOAEL)，但是應優先考慮緊密的給藥劑量組合足以顯示任何劑量相關趨勢。

2. 給藥的途徑及頻率

一般來說，給藥的途徑應該比照預期人體使用的途徑。通常的給藥頻率是每天 1 次，但顧及到動力學的變化，應考慮適時增減給藥頻率。

3. 藥動學

在開始進行生殖試驗前，最好能有一些有關藥動學的資訊，因為可據此決定是否需要調整動物種類、試驗設計及給藥安排。這些資訊通常由重覆劑量試驗中獲得。

4. 對照組

對照組動物建議比照處理組動物，以相同比例的溶媒或乳化劑進行給藥，當溶媒或乳化劑會造成影響或是改變測試物質的作用時，則應考慮進行額外的(佯裝-或是未處理的)對照組。

二、測試方法

1. 生殖與發育毒性第一期試驗：懷孕前與懷孕初期之生育力與胚胎發育試驗 (Study of Fertility and Early Embryonic Development to Implantation)

- 目的

測試在動物交配前(雄性/雌性動物)到交配及其受精卵著床過程中給予試驗物質，所造成的毒性影響或干擾作用。這包含了生殖過程中交配及著床的評估及對雌性動物發情週期、輸卵管輸送卵子能力、著床以及在著床前胚胎發育的影響。如果無法藉由組織學檢查評估其對雄性動物生殖器官的影響，也可評估試驗物質對生殖功能的影響(例如，性慾、副睪精液的成熟)。

- 不良影響的評估項目有：配子(精子、卵子)的成熟；交配行為；生育力；胚胎的著床前發育；著床。

- a. 動物數量：若以大鼠、鼯鼠(mouse)進行試驗，每劑量組使用雌雄各 16-20 隻動物[說明 1]。
- b. 給藥週期：若在為期 2 週以上重覆劑量毒性試驗沒有發現試驗物質對精子形成有任何影響，則雄性動物可以採用 2 週的交配前處理期，交配期間持續每天給藥直到交配成功至犧牲雄鼠為止[說明 2]，成熟的雌鼠則在交配前 2 週、交配期間、交配成功後至著床的期間每天給藥[說明 3]。若在重覆劑量毒性中評估試驗物質對生殖器官有影響，則需進一步檢查對生育力之毒性。

- c. 實驗步驟

- (1) 試驗期間：

- 觀察：每天至少觀察 1 次並記錄動物的死亡率、臨床症狀及行為改變。
- 動物體重：每週至少測量動物體重 2 次。
- 食物消耗量：每週至少測量食物消耗量 1 次(交配期間除外)。
- 觀察在其他毒性試驗中已證實的毒性。

- (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]，並判定是否在交配期或是交配前就已經有所影響。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經試驗物質處理的雌鼠(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) 交配成功的雌鼠在懷孕中期後任一時間點進行解剖，檢查黃體數目、胚胎的著床與被吸收數目、胚胎死亡率等[說明 5]，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。雄性動物可在交配成功後任何時間進行犧牲，但是最好在進行犧牲前先確定成功地使雌性動物懷孕。

(5) 期末的檢查項目：

- 所有成年動物的屍體剖檢(肉眼的檢查)。
- 保存肉眼觀察結果的器官，以供可能的組織學評量；保存充分的對照組相對應的器官以供比較。
- 保存所有動物的睪丸、副睪、卵巢及子宮，以供可能的組織學檢查。
- 副睪或是睪丸內的精子計數，以及精子的存活率。
- 計算黃體數及著床的位置。
- 計算存活及死亡的胎體數。

(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。

(7) 若有下列情況：由其他試驗的資料顯示試驗物質會影響到雄性或是雌性動物生殖器官的重量或組織學外觀；檢查的品質不可靠；在其他的試驗沒有相關的結果。則應該設計一個更完整的雄性動物生育力試驗(請參照 ICH S5B)[說明 6]，期末檢查使用精液分析可做為確認步驟，或是作較好的特性描述。

2. 生殖與發育毒性第二期試驗：器官形成時期之胚胎發育試驗 (Study for effects on embryo-fetal development)

● 目的

在雌性動物從著床至器官形成完全期間，測試試驗物質曝露對懷孕的雌性動物及胚胎發育所造成的不良影響。使用至少 1 種雌性啮齒類及非啮齒類動物，一般最常使用鼠和兔子。給藥途徑與未來臨床使用的給藥途徑相同。

註 不良影響的評估項目有：試驗物質對非懷孕雌性動物相關的毒性是否增強；胚胎死亡；胚胎生長之改變；胚胎結構上的改變。

a. 動物數量：每劑量組需要 16-20 隻動物[說明 1]。

b. 給藥週期：在器官形成期間每天給藥[說明 3]。

c. 實驗步驟

(1) 試驗期間：

- 觀察：每天至少觀察 1 次並記錄動物的死亡率、症狀。
- 動物體重：每週至少測量動物體重 2 次。
- 食物消耗量：每週至少測量食物消耗量 1 次。
- 觀察在其他毒性試驗中已證實的毒性。

(2) 期末時的檢查項目：

- 在分娩前一天(鼠在懷孕第 20 天，兔子則在懷孕第 30 天)全部雌性動物進行解剖，所有親代動物的屍體剖檢(肉眼的檢查)[說明 7]。
- 保存各器官肉眼發現異常的結果以進行可能的組織學評量；保存足夠的對照組相對應的器官以供比較。
- 計算懷孕成功率、黃體數，存活及死亡的胚胎著床數目[說明 5]。
- 個別的幼胎體重[說明 7]。
- 幼胎畸形。
- 有關胎盤的肉眼評量。

(3) 齧齒類動物，最高劑量組及對照組之雌性動物，每 1 胎中 1/2 的幼胎進行骨骼檢查，另 1/2 的幼胎進行內臟組織檢查，若最高劑量組發現異常現象，則全部動物均須進行內臟組織與骨骼檢查。而非齧齒類動物則全部幼胎進行內臟組織與骨骼檢查。兔子幼胎軟組織及骨骼畸形的檢查最好使用新鮮顯微解剖技術(fresh microdissection techniques)。

3. 生殖與發育毒性第三期試驗：週產期前後之幼胎發育試驗 (Study for effects on pre- and postnatal development)

● 目的

觀察雌性動物從著床至離乳過程中曝露於試驗物質的影響，其所誘導的影響可能會延

遲，因此對懷孕/授乳之雌性動物及胎體發展及其子代的不良影響，需持續觀察到子代性成熟為止。

- 不良影響的評估項目有：試驗物質對非懷孕雌性動物的相關毒性是否增強；子代週產期前後的死亡率；子代生長及發育的變化；子代的功能性缺陷，包括行為習性、成熟度(青春期)及生殖能力(第1子代)。

a. 動物數量：若以大鼠、鼯鼠進行試驗，每劑量組使用雌雄各16-20隻動物[說明1]。

b. 給藥週期：著床到離乳期間每天給藥[說明3]。

c. 試驗步驟

允許雌性動物分娩及養育其子代至斷乳，在離乳時每一窩仔畜中應該各選擇一隻雄性及雌性子代飼養到成年(應於報告中詳述選擇的方法)，並且進行交配以評估其生殖的能力。

(1) 試驗期間：

- 觀察：每天至少觀察1次並記錄動物的死亡率、症狀。
- 動物體重：每週至少測量動物體重2次。
- 食物消耗量：每週至少測量食物消耗量1次至分娩生產時止。
- 觀察在其他毒性試驗中已證實的毒性。
- 懷孕期間的變化。

(2) 全部雌性動物均以自然分娩方式生產，並餵養其幼胎。分娩時，觀察母鼠有無異樣[說明8]，檢查幼胎之數目、死亡率、性別及外觀變化並測量其體重。

(3) 每天觀察幼胎的外觀及記錄死亡率。出生的第0、4、7、14與21天計算幼胎存活的數目。同一胎之幼胎在出生第0、4(剔除動物前後)、7、14天進行稱重，第21天則每隻動物分別稱重。

(4) 期末時的檢查項目(針對親代的動物及適當的子代)：

- 所有成年動物的屍體剖檢(肉眼的檢查)。
- 保存各器官並盡量設法對各器官以肉眼觀察的結果進行組織學評估；保存足夠的對照組相對應的器官以供比較。

- 著床情形，
- 幼胎畸形，
- 出生時存活的子代數目，
- 出生時死亡之子代數目，
- 出生時的體重，
- 斷乳前後之存活及生長/體重，成熟度及生育力[說明 9]，
- 身體的發育，
- 感覺功能及反射動作，
- 行為習性。

(5) 若試驗需要，可進行第 2 代幼胎之檢查。

三、結果分析

以清楚簡明的方式將各個數值製表，將編入試驗中的每隻動物計入。附錄或列表中的個別數值，例如，體重、食物消耗量以及各窩仔畜的評估應簡單扼要，儘可能地以絕對值來取代計算過的數值以避免不必要的重複。

列表中低頻率出現的觀察，例如，臨床症狀、屍體剖檢觀察以及畸形等等，應適當地將有陽性報告的個體(少數)分別歸類在一起。特別是在描述有關構造改變(幼胎畸形)的資料時，主要的列表應清楚地確認含有異常幼胎的仔畜窩，確認各窩中受影響的幼胎，以及報告所有在受影響的幼胎所觀察到的改變。若需要時，可以改變列表方式呈現結果。

討論中應說明試驗物質對親代生殖及子代發育不產生影響之劑量(NOEL)，並儘可能與類似試驗物質的試驗結果作比較。

試驗的統計分析是說明結果所需的方法。所使用的統計方法應證明其正當性。當使用推論性的統計時，應以配對動物或仔畜窩數(litter)作為比較的基本單位，而不是使用胚胎數或是剛出生的幼胎數。

四、單一試驗設計(齧齒類動物)

針對齧齒類動物的生殖毒性試驗，可將第一期生育力試驗及第三期週產期前後試驗的給藥期間合併成單一試驗，但合併後的單一試驗必須包括整個生殖過程評估及幼

胎檢查。若試驗結果為陰性，可不需要再進行後續其他啮齒類動物的生殖毒性試驗；但是，若發現新藥有生殖毒性，則需視實驗結果另外選擇一、二或三期試驗，或另設計生殖毒性試驗以說明毒性機轉。單一試驗也可再加上 1 個(或多個)第二期胚胎發育試驗檢查幼胎構造畸形而形成一組雙試驗處理的實驗設計。除了啮齒類動物生殖毒性試驗可進行單一試驗外，第二種動物的第二期胚胎發育試驗仍需要執行。

五、雙試驗設計(啮齒類動物)

針對啮齒類動物的生殖毒性試驗，最簡單的兩期實驗設計乃由第一期生育力試驗加上第三期週產期前後發育試驗所構成，其中第三期週產期前後發育試驗需包含幼胎檢查。或是可以選擇在第一期生育力試驗中，將雌性動物的給藥處理持續到幼胎器官形成完全，進而根據第二期胚胎發育試驗的實驗步驟進行幼胎檢查，再加上 1 個第三期週產期前後試驗，如此將可使動物之使用數目減到最低，卻可提供所有檢查所需的各種資料。除了啮齒類動物的生殖毒性雙試驗外，第 2 種動物的第二期胚胎發育試驗仍需要執行。

說明

1. (a) 此處的動物數目在第一期試驗中是指用來交配的動物，而在第二、三期是指懷孕成功的雌性動物。
(b) 若試驗採用大鼠、鼯鼠、兔子以外的動物，則動物使用數量要能足以評估試驗結果。
2. 若由重覆劑量毒性試驗(2 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，雄鼠交配前的給藥週期可改為 2 週。
3. 一般生殖與發育毒性試驗將懷孕至離乳這段期間共分成 3 個給藥階段，因給藥週期過長會對胎兒造成多重的不良影響，而影響到結果分析的正確性。以下為雌性動物在交配成功後給藥時期的說明(第 0 天為確定受孕日)：
第一期：大鼠、鼯鼠，自懷孕的第 0 天到第 6 天。
第二期：大鼠、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。
第三期：大鼠、鼯鼠，自懷孕的第 15 天到生產後的第 21 天。

4. 計算交配指數與生育力指數之公式如下：

$$\begin{array}{l} \text{交配指數} \\ \text{(Mating Index)} \end{array} = \frac{\text{交配成功的動物數目}}{\text{動物同居的數目}} \times 100$$

$$\begin{array}{l} \text{生育力指數} \\ \text{(Fertility Index)} \end{array} = \frac{\text{雌性動物懷孕的數目}}{\text{交配成功的雌性動物數目}} \times 100$$

5. 儘可能估計胚胎在子宮中死亡的時間。

6. 影響精子生成的化合物幾乎不會影響到後減數分裂時期及睪丸重量；在測定對精子生成過程的影響中，和雌性動物交配是一項不敏感的方法。睪丸的組織學檢查經證明是測定對精子生成影響的最佳方法。利用好的雄性生殖器官病理學及組織病理學檢查(例如，鮑因氏固定(Bouin's fixation)、石蠟包埋、2-4 微米的睪丸橫切片、副睪縱切片、過碘酸-史奇夫氏(PAS, periodic acid-Schiff)及蘇木紫染色)可提供直接的測定。精液分析(精子計數、精子活動力及精子的形態)能做為合適的確認方法，並且可進一步地描述影響的特性。當使用來自輸精管或是副睪尾端的樣本時，常更進一步地以精液分析資料來評估生育力。

7. 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。

8. 懷孕指數之計算公式：

$$\begin{array}{l} \text{懷孕指數} \\ \text{(Gestation Index)} \end{array} = \frac{\text{產下活幼胎的雌性動物數目}}{\text{懷孕的雌性動物數目}} \times 100$$

9. 出生指數、第四天存活指數、離乳指數

(a) 為了使同一窩幼胎的成長速率一致，過多的幼胎可在出生不久後隨機剔除，而使同一窩幼胎之雄、雌數目相同。以大、鼯鼠為例，一般在出生後第四天剔除多餘的幼胎，使每一窩的幼胎降至 8 隻左右。

(b) 從出生到離乳的期間，依下列公式計算出生指數、存活指數及離乳指數。

$$\begin{array}{lcl} \text{出生指數} & & \text{出生時存活幼胎的數目} \\ \text{(Birth Index)} & = & \frac{\text{著床的數目}}{\text{著床的數目}} \times 100 \end{array}$$

$$\begin{array}{lcl} \text{第四天存活指數} & & \text{出生後第 4 天仍存活幼胎的數目} \\ \text{(Viability Index)} & = & \frac{\text{出生時存活幼胎的數目}}{\text{出生時存活幼胎的數目}} \times 100 \end{array}$$

$$\begin{array}{lcl} \text{離乳指數} & & \text{離乳時仍存活動物的數目} \\ \text{(Weaning Index)} & = & \frac{\text{出生後第 4 天仍存活或經剔除後的幼胎的數目}}{\text{出生後第 4 天仍存活或經剔除後的幼胎的數目}} \times 100 \end{array}$$

(c) 若發現幼胎有任何異常現象，視試驗需要進行由代母授乳的授乳試驗，以便分析動物在週產期前後的那一個時期受到影響。

參考文獻

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline S5(R2) “Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility” .[Step 5 (2000)]
2. FDA (2000). Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients (Redbook 2000).
3. International Conference on Harmonization (1996). Guideline on Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products: Addendum on Toxicity to Male Fertility. Federal Register 61(67):15360-15361.
4. International Conference on Harmonization Topic S5B Document (2000). Reproductive Toxicology: Male Fertility Studies.

第 5 節 致癌性試驗 (Carcinogenicity Study)

執行致癌性試驗的目的在於確認新藥在動物產生癌症的情形，並據此評估其在人類產生癌症的危險性。基本上凡對於(1)未來須經持續給藥 6 個月以上之試驗物質[說明 1]，(2)過去之數據顯示此類別之試驗物質可能引起致癌性者，(3)試驗物質之作用機制推測可能有致癌性者，(4)重覆劑量毒性試驗之結果顯示有腫瘤生成現象的試驗物質，(5)試驗物質之成分或其代謝物長期滯留在組織中，產生局部的組織作用或病理生理反應，或(6)基因毒性試驗結果顯示有致突變性之試驗物質等，均應進行致癌性測試。但是若試驗物質只針對有限的特定疾病或病患進行治療，同時該試驗物質對病患的治療十分有效時，則不在此範圍內。

若局部治療(皮膚、眼睛)之試驗物質其引起全身性作用非常低，則不須進行致癌性試驗，但若經皮膚吸收之試驗物質會因光反應產生致癌性者，則須進行經皮給藥之致癌性試驗。

一般使用於基因治療的內源性物質(例如，內生源胜肽或蛋白質)，其類似產品(例如，動物胰島素、腦下垂體分泌之生長激素及降血鈣素)已在臨床使用，則不須進行致癌性試驗。但若生物藥品之生物效能與相對的天然產品有顯著差異者，或生物藥品經修飾後，在人體中的血液或器官的濃度高於相對的天然產品者，則應進行致癌性試驗。

若新藥擬治療的病患預期只有短期壽命時(即短於 2~3 年)，致癌性試驗即無須執行，例如，治療晚期全身性癌症的抗癌新藥。致癌性試驗一般必須於申請新藥查驗登記前完成，除非對於病患種類有特殊之考量，才須於臨床試驗執行前完成。對於治療嚴重疾病之新藥，致癌性試驗則不必於新藥查驗登記前完成，只需於新藥上市後完成，有利於儘快獲得治療威脅生命及嚴重疾病的新藥，特別是沒有其他有效藥物治療時。

基本的致癌性測試組合包含一個齧齒類長期致癌性試驗加上另外一個試驗，此一試驗應能提供長期致癌性試驗以外的資訊。另一體內致癌性試驗可為(a)或(b)：

(a) 短期或中期齧齒類體內測試系統

是否採用此一測試系統應著眼於此一系統是否可以提供更多資訊有助於瞭解致癌的原因，這些測試系統包括齧齒類起始-促進的動物模式，或轉殖基因及新生齧齒類動物模式。

(b) 在第 2 種齧齒類動物進行的長期致癌性試驗

以下係介紹長期致癌性試驗：長期致癌性試驗之目的在於以不同劑量的試驗物質適當投予試驗動物，投予期間為試驗動物的生命週期的大部分，觀察其腫瘤產生之情形是否產生變化。

一、試驗動物

1. 一般應基於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種類及品種。另外，也須考量試驗物質之下列各性質：(a)藥理學；(b)重覆劑量毒性；(c)代謝；(d)毒理動力學；(e)給藥途徑(較少見的途徑，例如，皮膚給藥及吸入給藥)。若由上述因素，顯示不出以何種動物進行致癌性試驗較為恰當，則建議以大鼠作為優先的試驗動物。
2. 初步及長期致癌性試驗須使用相同的動物品種。

二、試驗方法

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時，則以下試驗可部分或全部刪除：

a. 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單一劑量毒性試驗方法(本章第一節)。

b. 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，詳細試驗方法可參閱重覆劑量毒性試驗方法(本章第二節)。

- (1) 動物品種：使用 1 至 2 種的齧齒類動物，雄、雌兩性並用，試驗最好採用藥物代謝特性與人體相似的動物，一般最常使用鼯鼠、大鼠和倉鼠。試驗開始時動物一般在 6-8 週齡。
- (2) 動物數量：每個劑量組使用雄、雌動物各 10 隻或以上。
- (3) 給藥途徑：與長期致癌性試驗使用相同的給藥途徑[說明 3]。

- (4) 劑量範圍：每個性別進行至少 3 個劑量組及對照組[說明 4、5]。
- (5) 給藥週期：給藥期 3 個月或以上，每週給藥 7 天[說明 6]。若試驗物質具遲發毒性或累積效應的特性，則須延長給藥的時間。
- (6) 試驗步驟
 - (a). 每天至少觀察動物 2 次，以確定死亡情形。
 - (b). 每天至少觀察與記錄所有動物的症狀 1 次。
 - (c). 試驗開始給藥前，測量動物體重；給藥期間每週至少測量 1 次。定期測量動物的體重及食物消耗量。若試驗需要，則須同時測量動物的飲水消耗量。
 - (d). 試驗期間死亡或在試驗終結行安樂死的動物應解剖，並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
 - (a). 估算最高耐受劑量(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、尿液、臨床生化等參數，肉眼或組織病理變化等改變。
 - (b). 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

- a. 動物種類：使用 1 至 2 種的齧齒類動物，雄、雌兩性並用。
- b. 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。若執行毒理動力學試驗，則應包含衛星試驗組(satellite group)，毒理動力學試驗中所需進行天數及採血點數需視試驗物質藥動性質而定，一般而言，每次採血宜有 3-5 動物/性別/組，每次採血宜有 6 個採血點，整個試驗中以有 2 個以上採血日為恰當，而最後一次採血日以不超過試驗開始的六個月為原則。

- c. 給藥途徑：一般有口服，皮膚及吸入 3 種給藥途徑，應考慮與臨床給藥途徑相同或相近的給藥途徑[說明 3]。
- d. 劑量範圍：每個性別進行至少 3 個劑量組及對照組，選擇劑量原則如下：
- (1) 高劑量：以最高耐受劑量(MTD)[說明 7]、25 倍 AUC (藥物及其代謝產品在齧齒類動物與人體之血液濃度之比值)[說明 8]、藥效作用[說明 9]、藥物之吸收飽和量[說明 10]或最高可給藥之劑量[說明 11] 為高劑量。若試驗物質為非基因毒性藥物且人體使用劑量為不超過 500 mg/day，且以上之高劑量選擇準則均不適用，其高劑量可設定為 1500 mg/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)：若試驗物質給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。
- e. 對照組：(1) 必須進行陰性對照組。(2) 若試驗物質給藥時需使用溶媒或乳化劑，則給予陰性對照組的動物該溶媒或乳化劑。若試驗需要，也可同時進行空白對照組。
- f. 給藥週期：以大鼠進行試驗，給藥期為 24 個月，而鼯鼠與倉鼠則給藥期至少為 18 個月，每週給藥 7 天 [說明 6]。
- g. 試驗期間：試驗在完成給藥後或給藥後的 1-3 個月結束。若以大鼠進行試驗，則試驗期最長為 30 個月，鼯鼠或倉鼠則為 24 個月 [說明 15、16]。
- h. 觀察與檢驗
- (1) 觀察
 - (a). 每天至少觀察動物 2 次，以確定死亡情形。
 - (b). 每天至少觀察與記錄試驗動物的症狀 1 次，記錄包括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。

(2) 體重與食物消耗

定期測量動物的體重及食物消耗量。若試驗需要，則須同時測量動物的飲水消耗量。

(a). 體重：試驗開始給藥前，測量動物體重；給藥期間每週至少測量 1 次。

(b). 食物消耗量：試驗開始給藥前，視試驗需要測量食物消耗量；給藥期間每週至少測量 1 次 [說明 5]。

(3) 病理檢驗

(a). 血液檢驗(Hematology)

全部動物須在解剖前採樣 1 次以進行血球檢驗[說明 17]。視試驗需要，給藥期間可採血 1 次以進行血球檢驗，在試驗第 15 個月進行為宜，且應考慮使用衛星試驗組。

(b). 血清生化檢驗(Clinical Chemistry)

視試驗需要，給藥期間可採血 1 次以進行血清生化檢驗，在試驗第 15 個月進行為宜，且應考慮使用衛星試驗組[說明 18]。

(c). 尿液分析(Urinalysis)

視試驗需要進行。每個劑量組選擇雄、雌各 10 隻動物或以上在試驗開始給藥前、給藥期間(在試驗第 15 個月進行為宜)及試驗結束前進行尿液分析[說明 19]。

(4) 眼科檢查

視試驗需要進行，動物在試驗開始及試驗結束時進行 1 次眼睛檢查[說明 20]。

(5) 組織病理檢驗[說明 21]

(a). 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瞭解所有增生物引發的變化與損傷(包括腫瘤)。

(b). 為了獲得更充足的毒性資訊，瀕死的動物均行安樂死。動物在安樂

死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，以瞭解血液有無呈現異常的現象，例如，貧血及淋巴結、肝、脾腫大所造成的影響。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，以瞭解所有不正常增生 (proliferation) 引發的變化與病變，若試驗需要，記錄主要臟器的重量。

- (d). 試驗結束(給藥期或復原期)，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，以瞭解血液有無呈現異常的現象，例如，貧血及淋巴結、肝、脾腫大所造成的影響。屍體解剖時，觀察及記錄動物的器官與組織之肉眼變化，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病變，則所有的動物都要進行組織病理檢驗。此外，若以肉眼觀察動物器官發現有損傷情形，則必須對同劑量組所有動物進行組織病理檢驗，次低劑量組的所有動物也必須進行組織病理檢驗，直至較低劑量組沒有損傷之發現為止 [說明 22]。

三、結果分析

1. 長期致癌性試驗結果之描述應依不同給藥組或對照組分別提供各組雌、雄動物之下列資料：
 - a. 受檢驗動物的數目及其個別肉眼病理檢查及組織病理檢驗結果。
 - b. 各組織所產生特定腫瘤的動物數目。
 - c. 非預期的動物死亡時間(time to each unscheduled death)。
 - d. 產生任何腫塊(以臨床觸摸方式偵測)的時間及其進展速度，及其最終的組織病理結果。
2. 長期致癌性試驗結果之分析應依數據的種類及試驗之設計選擇適當的統計學分析方法及統計學的顯著意義，下列各項發現應加以討論：
 - a. 腫瘤之發生情形及與腫瘤相關之非腫瘤病變
 - b. 產生腫瘤的動物數目及全部受檢的動物數目

- c. 若可行，同源腫瘤合併計算時腫瘤發生的機率
- d. 計算惡性腫瘤發生之機率
- e. 若可行，同一組織良性及惡性腫瘤合併計算時，腫瘤發生之機率
- f. 腫瘤產生潛伏期之時間

藉由上述之討論，應推論下列兩點：

- a. 藉由比較 3 個給藥組及對照組之結果，評估試驗物質是否會引起任何致癌作用。
- b. 藉由低劑量組、中劑量組及高劑量組所產生反應之統計學上之趨勢，判斷所產生之作用是否呈現劑量相關性(dose-related)。

若有歷史對照組資料(historical control data) [說明 23]可協助試驗之解讀，則應於試驗報告中包含此一資料。試驗中有腫瘤發生頻率增加之情形，可進一步依照歷史對照組之資料來解讀，若有罕見腫瘤之發生，即使在統計學上尚無到達有意義之增加，也仍應視為具有生物學上之意義，同理，若有腫瘤造成動物較早死亡，雖然未到達統計上之意義，也應視為具有生物學上之意義。

若有上述任何的反應或腫瘤產生的潛伏期縮短出現，則應將試驗物質視為對測試動物為具有致癌性，若有上述一種以上的反應出現，且具劑量－反應關係，則應視試驗物質為活性較強之致癌物。

不論致癌機轉為何，若測試物質造成腫瘤產生的機率增加，皆為主要的發現，就風險評估(risk assessment)的角度而言，在試驗物質增加腫瘤發生機率時，應依所有的證據解讀此一發現，包括：測試物質藥理作用，基因毒性結果，動物飼養情形，食物，動物健康狀態的改變。

其他也應一併加入探討之因素尚包括：

- a. 惡性腫瘤產生機率增加及產生潛伏期時間縮短(reduced latency)；
- b. 良性腫瘤產生機率增加；
- c. 投藥部位產生局部之腫瘤；
- d. 腫瘤增加的生物學上的意義：例如，於對照組罕見的腫瘤或只在非常高的藥物曝露量才造成腫瘤之增加所代表之意義。

試驗報告中應包括試驗的結論。

說明

1. 任何擬在臨床連續使用達 6 個月以上的藥物，皆應進行致癌性試驗。某些種類的藥物可能不會連續使用達 6 個月，但可能會間歇性的重覆使用，科學上很難斷定臨床藥物使用多久會引起致癌性的考量，尤其是針對長期間歇性使用之藥物，但對於此類長期間歇性使用藥物，一般認為致癌性試驗還是需要的，例如，治療過敏性鼻炎、憂鬱及焦慮的藥物。對於某些以特別的途徑給予且會造成長時間之曝露量者，亦須進行致癌性試驗。但對於不常使用之藥物或只是短期使用之藥物(例如，麻醉藥物及輻射顯影劑)，除非有特別因素，否則致癌性試驗則並不需要。藥物在基因毒性試驗的結果顯示具明顯毒性，若在無其他的資料可提出反証，則此藥物應視為對各動物種類皆具致癌性，包括對於人類，此種藥物即無需再執行致癌性試驗。然而若此種藥物要長時間投予人體時，仍應先執行一個至少一年的慢性毒性試驗，以偵測在動物最先會產生的腫瘤為何。
2. 目前有幾種試驗方法已被提出，其有用性目前正受到研究，一般而言，要選擇何種方法應依據所推測可能造成人體之致癌機轉。這些試驗需可提供額外的資訊以補長期致癌性試驗之不足。以下所列是一些目前已知符合上述要求的試驗方法，而這些試驗方法仍有可能隨著科學知識的進步而有所修改。
 - (a) 嚙齒類初始化—促進模型(initiation-promotion model in rodent)：嚙齒類初始化—促進模型目前多用於研究藥物對於肝臟的致癌作用，其方法為將一種已知的致癌起始物投予動物，之後再投予試驗物質幾週時間，觀察肝臟產生腫瘤的機率是否增加；但也有少數模型用於測試多器官的致癌作用，例如，利用至少 5 種已知的致癌起始物投予動物，之後再投予試驗物質幾個月的時間，觀察於多器官產生腫瘤的情形。
 - (b) 基因轉殖鼯鼠測試法，包括 P53+/-缺陷模型，Tg. AC 模型，TgHras2 模型，XPA 缺陷模型等。
 - (c) 新生嚙齒類致癌模型：此模型係利用一般新生鼯鼠進行試驗，用以偵測基因毒性物質之致癌性，其方法為投予測試物質至新生（出生後 1 至 15 天）動物持續 1 年時間，觀察動物產生腫瘤的情形。

3. 口服給藥可以強迫餵食、或混入飲食（飼料或飲用水）中以進食方式進行。
4. 一般每個劑量組的劑量相差 2 到 3 倍。
5. 若試驗物質是以混入飼料或飲用水的方式給藥，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。
6. 若以強迫餵食給藥，每週給藥 7 天。若無有效數據，一般應在所使用的動物種類先做 28 天的重覆劑量毒性試驗，再作此 90 天的試驗。
7. 最高耐受劑量是指在致癌性試驗過程中，會產生輕微毒性反應的劑量。此劑量可由 90 天的重覆劑量毒性試驗結果來決定，係觀察試驗中產生輕微毒性的劑量。考量的因素為此劑量下不可影響動物正常壽命或干擾試驗結果的判讀，通常給藥組動物於此劑量下，體重增加不能比對照組少 10%以上，且沒有標靶器官的毒性，臨床病理學參數也沒有顯著地改變。
8. 由藥動學試驗結果決定致癌性試驗之最高容許劑量，只適用於非致突變性之藥品，且人體及齧齒類動物之代謝情況相似，同時對齧齒類動物為低器官毒性。依據動物與人體之曲線下總面積(AUC)比較選擇最高劑量之準則：
 - a. 藥動學試驗與致癌性試驗使用相同的動物品種、給藥途徑及劑量範圍，以獲得有效的藥動數據。
 - b. 藥動學試驗的試驗期應足夠，以便在選擇的劑量範圍中觀察劑量與藥動參數改變之相關性。
 - c. 在評估試驗結果時，要以科學判斷決定 AUC 之比較是基於化合物本身、化合物與其代謝物或代謝物的數據。
 - d. 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藥物與血漿蛋白質結合之差異。
 - e. 人體的藥動數據要由人體建議每日最高劑量試驗測得。
9. 若以藥效指標選擇最高劑量須依每個化合物的特性而不同。最高劑量為此藥物在動物身上產生的藥效反應已達到最高程度，同時該劑量不會干擾動物之生理或原穩定狀態，而影響到試驗結果的有效度，例如，引發高血壓及抑制血液凝結等。

10. 若以吸收的飽和程度選擇最高劑量，則低劑量應依代謝及排泄途徑的飽和程度來選擇。
11. 若試驗物質是以混入飲食給藥，則最高可進食劑量為飲食量的 5%。
12. 在選擇致癌性試驗的劑量時，應比較藥物及其代謝物在啮齒類及在人體的曝露量，由這些比較，若發現 1500 mg/kg/day 在動物產生之曝露量不及人體的曝露量，則 1500 mg/kg/day 這個極限之劑量仍不能被接受。1500 mg/kg/day 應在啮齒類動物至少產生 10 倍人體在使用該藥物作治療時所產生曝露量。(若不能達到上述的曝露量，則要視個案重新考慮增加在啮齒類的曝露量)。如果藥物在人體劑量超過 500 mg/person/day，則該藥物致癌性試驗高劑量組之劑量應增加至該動物最大可行劑量。
13. 致癌性之中低劑量之選擇應考慮下列各項因素：
 - a. 藥動的線性狀況與代謝途徑的飽和狀態。
 - b. 人體接受試驗物質與實際獲得療效的藥量。
 - c. 正常啮齒類動物之生理狀態的改變。
 - d. 啮齒類動物的藥效反應。
 - e. 反應機制及可能產生效用之起始劑量。
 - f. 在短期試驗中觀察到之不可預測性的毒性。
14. 一般最低劑量須大於最高劑量的十分之一，但若最低劑量與臨床使用的劑量相差甚遠，則亦可小於最高劑量的十分之一。
15. 試驗結束時，非腫瘤導致的動物死亡率要低於 50%。
16. 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可超過 10%。
在試驗期間，若試驗動物出現衰弱或頻死的現象，應將動物隔離或行安樂死進行解剖。
17. 血液檢測項目：hematocrit、hemoglobin、erythrocyte count、total and differential leukocyte counts、platelet count 及凝血因子(clotting time、prothrombin time 或 activated partial thromboplastin time)等之測量。
18. 血清生化檢測項目：alanine aminotransferase、albumin、alkaline phosphatase、

aspartate aminotransferase、bilirubin (total)、calcium、chloride、creatinine、鵝-glutamyl transferase、glucose (in fasted animals)、phosphorus、potassium、protein (total)、sodium、urea nitrogen 等。

19. 尿液分析項目：顯微鏡觀察 urine sediment、urine volume、pH value 與 specific gravity，及測量尿液中之 protein、glucose、ketones、bilirubin 與 occult blood 等的含量。

20. 眼科檢驗包括肉眼檢驗與鏡檢眼睛的外部、視覺介質及眼底。

21. 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：

a. 臟器稱重：分別稱重 adrenals、brain、kidneys、liver、gonads、及其他可能的標靶器官。

b. 組織病理檢驗：器官與組織包括 adrenals、aorta、bone (femur)、bone marrow (sternal/femoral)、brain (at least 3 different levels)、cecum、colon、corpus and cervix uteri、duodenum、epididymis、esophagus、eye(s)、gall bladder (if present)、Harderian gland*、heart、ileum、jejunum、kidney(s)、lacrimal gland*、larynx*、liver、lung(s)、lymph nodes (cervical、mandibular*、mesentric)、mammary gland、nasal cavity*、optic nerve*、ovaries and fallopian tubes、pancreas、pharynx*、pituitary、prostate、salivary gland、sciatic nerve、seminal vesicle、skeletal muscle、skin、spinal cord (at least 2 different locations)、spleen、stomach、testes、thymus (or thymic region)、thyroid/parathyroids、trachea、urinary bladder、uterus、vagina*、Zymbal' s gland* and all gross lesions/tumors。

*視試驗需要才進行。

22. 病理檢驗所有的動物有助於數據的評估。

23. 同步對照組(concurrent control)為給藥組主要的比較對象，但如果歷史對照資料也列入比較時，應以相同品系及測試機構之資料為限。歷史對照資料應以5年內不同的試驗為主，但必須考量動物基因上的變化。文獻上的資料也可列入考

量。

参考文献

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline S1A “Guideline on the Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals” .[Step 5 (1995)]
2. ICH Harmonised Tripartite Guideline S1B “Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals” .[Step 5 (1997)]
3. FDA (2000). Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients (Redbook 2000).
4. International Conference on Harmonization S1C(R2). Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. [Step 5 (2008)]
5. OECD Guideline for Testing of Chemicals (1981) Carcinogenicity Studies.
6. ICH Harmonised Tripartite Guideline S1C “Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals & Limit Dose (including: Addendum: Addition of a Limit Dose and Related Notes)” .[Step 5 (1997)]
7. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (2003). Note for guidance on carcinogenic potential.
8. Storer R.D. (2000). Current status and use of short/medium term models for carcinogenicity testing of pharmaceuticals—scientific perspective. *Toxicol. Lett.*, **112-113**: 557-566.
9. Laan J. W. van der (2000). Current status and use of short/medium term models for assessment of carcinogenicity of human pharmaceuticals: regulatory perspectives. *Toxicol. Lett.*, *112-113*: 567-572.

第 6 節 皮膚過敏性試驗 (Skin Sensitization Study)

一般所有會與皮膚接觸的新產品須進行皮膚過敏性測試。本章節僅提供標準的皮膚過敏性測試方法。

一、試驗方法

1. 試驗物質的準備

- a. 固體試驗物質：以水或適當之溶媒混合均勻備用。
- b. 半固體試驗物質：以未稀釋之試驗物質進行測試。
- c. 液態試驗物質：以未經稀釋之試驗物質進行測試，但噴霧式之試驗物質，若試驗需要，可稀釋進行測試。

2. 試驗動物

使用皮膚敏感性高的動物，一般以天竺鼠作為試驗動物。

3. 測試方法

- a. Adjuvant and patch 測試法
- b. Buehler 測試法
- c. Draize 測試法
- d. Freund' s complete adjuvant 測試法
- e. Maximization 測試法
- f. Open epicutaneous 測試法
- g. Optimization 測試法
- h. Split adjuvant 測試法

上述測試方法對試驗物質的過敏反應程度有所不同，一般均接受以 Freund' s complete adjuvant (FCA)增加過敏反應的靈敏度，使測試方法能偵測低過敏性試驗物質。

4. 測試結果的評估

以採用之測試方法的評估標準，評估每隻動物的皮膚反應程度。

二、試驗步驟

上述過敏性測試方法均可使用，以下僅敘述 Maximization 及 Adjuvant and patch 測試方法之測試步驟。

1. 動物品種

一般使用天竺鼠。

2. 動物數量

每組至少 5 隻動物。

3. 試驗組

一般包含測試組、陽性對照組 [說明 1] 與陰性對照組 [說明 2]。

4. 測試步驟

a. Maximization 測試方法

(1) 過敏性誘發反應(Induction)

(a) 剃除動物背部之毛髮，於頸背處開始左右對稱地分為兩半(大約 2x4 公分面積)，分別皮內注射下列三種物質 [說明 3]：

(i) 蒸餾水與 FCA (1:1) 混合之乳化物(E-FCA)

(ii) 試驗物質

(iii) 試驗物質與 FCA 之混合乳化物。

“(b) 一週後，將含 10% lauryl sodium sulfate 之凡士林塗抹於先前皮內注射之部位。

(c) 次日，覆蓋含試驗物質之透氣繃帶於同一部位 48 小時 [說明 4]。

(2) 過敏性攻擊反應(Challenge exposure)

經試驗物質處理兩週後，將含試驗物質之透氣敷料覆蓋於已除毛之試驗動物的肋腹部或背部 24 小時 [說明 5]。

(3) 過敏性評估

試驗物質處理後的第 24 及 48 小時，觀察敷藥部位的皮膚反應，評估試驗物質的皮膚過敏性 [說明 6]。

b. Adjuvant and patch 測試方法

(1) 過敏性誘發反應 (Induction)

- (a) 剃除動物背部之毛髮，於背部(大約 2x4 公分面積)的四個角各皮下注射 0.1 mL 的蒸餾水與 FCA (1:1)混合之乳化物(E-FCA)。
- (b) 在 E-FCA 注射部位，以注射用針將表皮磨損出井字形狀。
- (c) 在該部位覆蓋含試驗物質之透氣繃帶 24 小時 [說明 5]。
- (d) 連續 3 天，重覆步驟(b)與(c)。
- (e) 一週後，將含 10% lauryl sodium sulfate 之凡士林塗抹於皮內注射的部位。
- (f) 次日，覆蓋含試驗物質之透氣敷料於同一部位 48 小時 [說明 4]。

(2) 過敏性攻擊反應 (Challenge exposure)

經試驗物質處理兩週後，將含試驗物質之透氣敷料覆蓋於已除毛之試驗動物的肋腹或背部 24 小時 [說明 7]。

(3) 過敏性評估

試驗物質處理後的第 24 及 48 小時，觀察敷藥部位的皮膚反應，評估試驗物質的皮膚過敏性 [說明 6]。

以上僅描述試驗組的測試步驟，陽性對照組與陰性對照組以相同的步驟進行測試。

說明

1. 陽性對照組可用會引發皮膚過敏的物質，例如，
1-chloro-2,4-dinitrobenzene、p-phenylenediamine 與 neomycin sulfate 等。
2. 陰性對照組之試驗動物可不作任何試驗物質處理，若試驗物質須使用溶劑，則以溶劑、或溶劑與 FCA 混合之混合物處理。
3. 一般注射 0.1 mL 的試驗物質。
4. 一般以 0.2 mL 或 0.2 g 的試驗物質處理。
5. 一般以 0.1 mL 或 0.1 g 的試驗物質處理。
6. 紅斑與紅腫的發生頻率與程度可藉由與陽性對照組與陰性對照組的比較加

以評估。

7. 一般以 0.01 mL 或 0.01 g 的試驗物質處理。

參考文獻

1. JMHW (1995). Japanese Guideline for Nonclinical Studies Drugs Manual.
2. Sato Y., Katsumura Y., Ichikawa H., Kobayashi T., Kozuka, T., Morikawa F. and Ohta S. (1981). A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens. *Contact Dermatitis*, **7**:225-237.
3. Buehler E. V. (1965). Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch. Dermatol.*, **91**:171-177.
4. Draize J. H., Woodgard G. and Calvery H.O. (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**:377-390.
5. Klecak G., Geleick H. and Frey J.R. (1977). Screening of fragrance materials for allergenicity in the guinea pig. I. Comparison of four testing methods. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **28**:53-64.
6. Magnusson B., Kligman A. M. (1969). The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.*, **52**:268-276.
7. Maurer T. H., Weirich E.G. and Hess R. (1980). The optimization test in the guinea pig in relation to other predictive sensitization methods. *Toxicology*, **15**:163-171.
8. Maguire H. C. Jr. and Chase M. W. (1972). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Part XIII. Sensitization of guinea pigs with picric acid. *J. Exp. Med.*, **135**:357-375.

第 7 節 皮膚感光過敏性試驗 (Skin Photosensitization Study)

一般對皮膚可能引起感光過敏性，或與感光過敏性物質的化學結構相似之皮膚用藥須進行此測試。本章節僅提供皮膚感光過敏性試驗物質標準的測試方法。

一、試驗方法

1. 試驗物質的準備

- a. 固體試驗物質：以水或適當之溶媒混合均勻備用。
- b. 半固體試驗物質：以未稀釋之試驗物質進行測試。
- c. 液態試驗物質：以未經稀釋之試驗物質進行測試，但噴霧式之試驗物質，若試驗需要，可稀釋進行測試。

2. 試驗動物

使用皮膚敏感性高的動物，一般以天竺鼠作為試驗動物。

3. 測試方法

- a. Adjuvant and Strip 測試法
- b. Harber 測試法
- c. Horio 測試法
- d. Jordan 測試法
- e. Kochever 測試法
- f. Maurer 測試法
- g. Morikawa 測試法
- h. Vinson 測試法

二、試驗步驟[說明 1]

上述感光過敏性測試方法均可使用，以下僅敘述 Adjuvant and Strip 測試方法之測試步驟。

1. 動物品種

一般使用天竺鼠。

2. 動物數量

每組至少 5 隻動物。

3. 試驗組

一般包含測試組、陽性對照組[說明 2]與陰性對照組[說明 3]。

4. 測試步驟

a. Adjuvant and Strip 測試方法

(1) 感光過敏性之誘發反應(Photosensitization induction)

(a) 剃除動物背部之毛髮，於背部，於背部(大約 2x4 公分面積)的四個角各皮下注射 0.1 mL 的蒸餾水與 Freund' s Complete Adjuvant (FCA) (1:1)混合之乳化物(E-FCA)。

(b) 用透明膠帶磨損注射部位的角質層。

(c) 將試驗物質塗抹於受損之角質層部位[說明 4]。

(d) 使用長波長之 UV 光照射(10 Joules/cm²)。

(e) 連續 5 天重覆步驟(b)至(d)。

(2) 感光過敏性攻擊反應(Photosensitization Challenge)

試驗動物經初步過敏性引發後 3 週進行下列步驟：

(a). 以動物的背脊線為對稱軸，在動物背部左右對稱地分別剃除兩塊 1.5x1.5 cm² 的毛髮作為測試部位。

(b). 將試驗物質塗抹於該部位[說明 5]。

(c). 以錫箔紙覆蓋將其中一個測試部位，以長波長的 UV 光照射(約 10 Joules/cm²) 另一個測試部位。

(3) 感光過敏性評估

UV 光照後第 24 及 48 小時，觀察皮膚經光照及無光照的過敏性反應程度，評估試驗物質的感光過敏性[說明 6]。

以上僅描述試驗組的測試步驟，陽性對照組與陰性對照組以相同的步驟進行測試。

說明

1. 進行測試時要注意以下各點：

- a. 光源：使用 Xenon 燈、日光燈(solar simulator)或 UV 燈。
 - b. 光源的波長特性：使用長波長的 UV 光源或中、長波混合的 UV 光源，中波紫外線 280-320 nm，長波紫外線 320-400 nm。
 - c. 光源強度。
2. 陽性對照組可用會引發皮膚感光過敏的物質，例如，6-methylcumarin 與 3,3'-,4'-,5-tetrachlorosalicylanilide。
 3. 陰性對照組之試驗動物可不作任何試驗物質處理，若試驗物質須使用溶劑，則以溶劑、或溶劑與 FCA 混合之混合物處理。
 4. 一般注射 0.1 mL 或 0.1 g 的試驗物質。
 5. 一般以 0.02 mL 或 0.02 g 的試驗物質處理。
 6. 紅斑與紅腫的發生頻率與程度可藉由與陽性對照組與陰性對照組的比較加以評估。

參考文獻

1. JMHW (1995). Japanese Guideline for Nonclinical Studies Drugs Manual.
2. Ichikawa H., Armstrong R.B. and Harber I.C. (1981). Photoallergic contact dermatitis in guinea pigs: Improved induction technique using Freund's complete adjuvant. *J. Invest. Dermatol.*, **76**:498-501.
3. Harber I.C., Harris H. and Baer R.L. (1967). Contact photosensitivity patterns to halogenated salicylanilides. In man and guinea pigs. *Arch. Dermatol.*, **96**:646-656.
4. Jordan W.P. (1982). The guinea pig as a model for predicting photoallergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, **8**:109-116.
5. Kochever I. E., Zolar GL, Einbinder J and Harber LC. (1979). Assay of contact sensitivity to musk ambrette in guinea pigs, *J. Invest. Dermatol.*, **73**, 144-146.
6. Maurer T., Weirich E.G. and Hess R. (1980). Predictive animal testing for

- photocontact allergenicity. *Br. J. Dermatol.*, **103**:593-605.
7. Morikawa F. (1974). Technique for evaluation of phototoxicity and photoallergy in laboratory animals and man. In: Sunlight and man : Normal and Abnormal Photobiologic Responses 1974, Edited by Fitzpatrick T.B., Pathak M.A., Harber L.C., Seiji M. and Kukita A. ; Fitzpatrick TB consulting editor., Tokyo University Press, Tokyo, pp. 529-557.
 8. Vinson L.J. and Borselli V.F. (1966). A guinea pig assay of photosensitizing potential of topical germicides. *J. Soc. Cosm. Chem.*, **17**:123-130.

第 8 節 皮膚刺激性試驗 (Skin Irritation Study)

一般所有會與皮膚接觸的新產品須進行皮膚刺激性測試。本章節僅提供標準的皮膚刺激性測試方法。

一、試驗物質的準備[說明 1]

1. 固體試驗物質：以水或適當之溶劑混合均勻備用，若使用溶劑須評估其對皮膚刺激性的影響。
2. 半固體試驗物質：以未經稀釋之試驗物質進行測試。
3. 液態試驗物質：以未經稀釋之試驗物質進行測試。

二、動物品種

一般使用大白兔(albino rabbit)進行試驗。

三、動物數量

每組至少 3 隻動物以上，可使用雄性與/或雌性動物。

四、劑量範圍

液體試驗物質為 0.5 mL，固體或半固體試驗物質為 0.5 g。

五、試驗步驟

1. 測試前一天，剃除動物背部毛髮，檢查皮表是否完整，若皮表有刮痕或皮膚病，則不予使用。
2. 測試當天，試驗物質塗抹於動物背部皮表(約 6 cm²)，並覆蓋上透氣繃帶。在同一隻動物另選擇相同大小的皮表，給予溶劑作為溶劑對照組，及/或不給予任何試驗物質作為空白對照組。
3. 若試驗物質為液體或半固體，則須將試驗物質塗抹於透氣繃帶上，再將繃帶蓋在測試部位。
4. 經試驗物質處理後(一般 4 小時)，以水或適當溶劑清除皮表之試驗物質。

六、刺激性評估

1. 經試驗物質處理後的第 1、24、48 及 72 小時，以皮膚刺激性計分系統，觀察及記錄敷藥部位的皮膚反應，包括所產生的紅斑、浮腫情形、刺激作用、腐蝕作用與恢復情形的程度與性質及其他毒性作用。

2. 若試驗物質對皮膚引起之刺激反應超過 72 小時，則須持續觀察及記錄皮膚刺激性反應至第 14 天止，以評估該皮膚傷害性為可逆性或非可逆性。

說明

1. 若試驗物質屬於下列任何一種性質，則不須進行皮膚刺激性試驗：
 - a. 試驗物質為強酸($\text{pH} < 2$)或強鹼($\text{pH} > 11.5$)性物質。
 - b. 試驗物質為高毒性物質，其經皮急性毒性試驗所得之 $\text{LD}_{50} < 200 \text{ mg/kg}$ 。
 - c. 試驗物質在經皮急性毒性試驗，以 2000 mg/kg 的劑量處理，並不引起皮膚刺激性者。

參考文獻

1. Draize J.H., Woodard G. and Calvery H.O. (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**:377-390.
2. Patrick E. and Maibach H.I. (1994). Dermatotoxicity. *In Principles and Methods of Toxicology*, pp767-803, 3rd Ed., Hayes A.W., ed., Raven Press Ltd, New York.
3. Rush R.E., Bonnette K.L., Douds D.A. and Merriman T.N. (1995). Dermal Irritation and Sensitization. *In: CRC Handbook of Toxicology*, pp105-162, Derelanko M.J. and Hollinger M.A., ed., CRC Press, Boca Raton.
4. OECD (2002). Guideline for Testing of Chemicals No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion.

第 9 節 眼睛刺激性試驗 (Eye Irritation Study)

一般所有會與眼睛接觸的新產品須進行眼睛刺激性評估，瞭解試驗物質對眼睛及相關黏膜可能造成的傷害。使用動物執行眼睛刺激性試驗前，必須先評估試驗物質對於眼睛及相關黏膜可能造成傷害的所有已知資訊，這些資訊包括已經在人和動物執行過的試驗、化學結構相關的物質對於眼睛及相關黏膜造成傷害的證據、試驗物質具有強酸或強鹼特性和已經執行的體外(*in vitro*)或活體外(*ex vivo*)皮膚刺激性試驗和眼睛刺激性試驗。若試驗物質經過評估後可能需執行動物眼睛刺激性試驗，亦應先執行體外或體內皮膚刺激性試驗，再決定是否需執行動物眼睛刺激性試驗。本章節僅提供標準的眼睛刺激性測試方法。

一、試驗物質的準備[說明 1]

1. 固體試驗物質：若試驗物質為固體或顆粒，須將其研磨成精細粉末。
2. 半固體試驗物質：以未經稀釋之試驗物質進行測試。
3. 液態試驗物質：以未經稀釋之試驗物質進行測試。

二、動物品種

一般使用大白兔(*albino rabbit*)進行試驗。

三、動物數量

每組至少 3 隻動物以上，可使用雄性與/或雌性動物。

四、劑量範圍

液體試驗物質為 0.1 mL，固體或半固體試驗物質不超過 100 mg 或體積不超過 0.1 mL。

五、試驗步驟

1. 將試驗物質放入動物一隻眼睛的結膜囊中，而另一隻眼睛不作任何處理作為空白對照組。
2. 若試驗物質會引起劇痛反應，則在試驗物質處理前須對實驗動物進行局部麻醉。
3. 若試驗需要，試驗動物眼睛經試驗物質處理 24 小時後可以水清洗眼睛，但須注意清水的體積與流速不會傷害動物之眼睛。

六、刺激性評估

1. 動物的眼睛經試驗物質處理後第 1、24、48 與 72 小時，以眼睛刺激性計分系統，

觀察及記錄眼睛刺激反應，包括檢查眼角膜、虹膜、及結膜。

2. 若在 72 小時後眼睛沒有呈現明顯刺激反應，則可終止此試驗。
3. 若試驗物質會引起持久的角膜或其他眼睛刺激現象，須持續觀察及記錄眼睛刺激性反應至第 21 天止，以評估該眼睛傷害性為可逆性或非可逆性。
4. 除結膜、虹膜、及角膜外，其他眼睛組織若出現損傷都應加以記錄。

說明

1. 若試驗物質屬於下列任何一種性質，則不須進行眼睛刺激性試驗：
 - a. 試驗物質為強酸($\text{pH} < 2$)或強鹼($\text{pH} > 11.5$)性物質。
 - b. 在皮膚刺激性試驗中顯示明顯的腐蝕性或刺激性的試驗物質。
 - c. 體外試驗結果顯示此試驗物質具有腐蝕性或刺激性。

參考文獻

1. Draize J.H., Woodard G. and Calvery H.O. (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**:377-390.
2. Dunn B.J. (1995). Toxicology of the Eye. *In CRC Handbook of Toxicology*, pp163-216, Derelanko M. J. and Hollinger M. A., Eds., CRC Press, Boca Raton.
3. OECD (2012). Guideline for Testing of Chemicals No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion.
4. United States Environmental Protection Agency (1998). Health Effects of Test Guidelines OPPTS 870.2400 Acute Eye Irritation.

第 10 節 毒理動力學試驗 (Toxicokinetic Study)

毒理動力學乃是依據藥動學之原理，於非臨床動物毒性試驗中，評估動物全身性曝露量(systemic exposure)及重覆投予後之曝露藥量變化，以協助毒性試驗結果之解讀、藥品安全係數之評估及其臨床安全性試驗之設計。

一、毒理動力學的目標

- 瞭解動物全身性藥品曝露量、劑量、與毒性的關係，及其於毒性試驗時程中，經重覆投予後之藥品曝露量的變化。
- 瞭解毒性試驗中測得的藥品曝露量與所觀察到毒性反應結果的相關性，並協助評估臨床安全性及臨床試驗設計。
- 支持 [說明 1] 非臨床毒性試驗中所選用的動物種類及給藥設計。
- 結合毒性試驗結果來幫助設計後續長期投予的非臨床毒性試驗。

這些目標可藉由設計得當的試驗，量測和藥品曝露量相關之藥動參數而達成。例如，常用血中(血清、血漿或全血)濃度-時間曲線下總面積(AUC)、最高血中濃度(C_{max})及在特定時間所達的濃度(C_{time})來評估毒理動力學試驗的藥品及代謝物曝露量。

毒理動力測量通常合併在毒性試驗中一起執行，另外，在某些毒理實驗，為了減少干擾動物的毒性反應，也可於模擬毒性試驗條件下進行。

二、需要考量的通則

1. 曝露量的定量

測試藥品及/或代謝物的曝露量可以血中濃度或曲線下總面積(AUC)來表示。在某些情況下，應測量組織的濃度。比較動物種類間的數據時，利用毒理動力學資料會比用劑量/體重(表面積)更佳。毒理動力學曝露量如果呈非線性藥動學特性[說明 1]應特別注意所會引起之相關毒性反應。

2. 採樣時間點之選擇

毒理動力試驗採集點應足以表達藥品之曝露程度，但應避免對動物正常的處理造成過分之干擾[說明 2]。採樣時間點之選擇應依據先前的毒性試驗、預試驗或根據劑量選擇試驗、相同動物模型的其他試驗決定之。

3. 劑量選擇

毒性試驗劑量之選擇，通常以毒理的發現及藥效反應而定。

若毒理動力學資料顯示試驗藥品及/或代謝物的曝露量會受因吸收飽和而受限制[說明 3]，此時，可產生最大的曝露量的最低劑量，應作為使用的最高劑量(當沒有其他劑量限制時[說明 4])。毒理動力學可以幫助評估曝露量與劑量間的關係。若選擇的劑量範圍呈現非線性藥動學特性時，必須謹慎解讀毒性試驗結果[說明 1]。

4. 評估在毒性試驗曝露量的程度

毒理動力學所需要的動物得來自主要試驗組或特別的衛星試驗組[說明 5]。一般而言，較大動物的毒理試驗數據是由主要試驗而得，而較小動物(啮齒類動物)的數據可由衛星試驗組而得。需要的動物數目以能得到適當的毒理動力數據為原則。一般皆需要有雄性與雌性動物來預測曝露量，除非有某些特殊理由方可只選用 1 種性別動物。

5. 影響曝露量解讀的因素

雖然上述藥品曝露量之評估可幫助解讀毒性試驗，並與人體藥品曝露量比較進行安全性評估，但下列數點必需要注意。不同種類的蛋白質結合、組織攝入、接受器特性及代謝情形都要考量。例如，高蛋白結合率藥品的曝露量以未結合濃度來表示較適合。另外，代謝物的藥理活性、代謝物的毒性、生物科技產品的免疫原力可能都是複雜的因素。在血中濃度相對較低，在特定組織或器官中有較高的化合物及/或代謝物也需注意。

6. 給藥途徑

若毒理動力學試驗使用替代的給藥途徑時，例如，使用吸入、局部或非腸胃道投予，應以臨床給藥途徑之藥品的藥動特性做為考量。欲改變藥品臨床上給藥方式時，如果原本為口服投予後改變為靜脈投予方式，應要考慮是否會改變藥品曝露量的安全範圍並比較現行給藥方式及預期給藥方式的藥品及/或代謝物的全身性曝露(AUC 及 C_{max})。若新的給藥途徑會增加曲線下總面積(AUC)及/或最高血中濃度(C_{max})，則應再進行新投予途徑之動物毒理學及藥動學試驗以確認其安全性。若曝露量並沒有很明顯的增加或不同，則新的給藥途徑與現行給藥途徑只需著重局部毒性即可。

7. 代謝物的測定

毒理動力學的主要目標係評估藥品於試驗動物的全身曝露量。然而，在某些情況下，代謝物於血中或生體其他體液的曝露程度對解釋毒性反應特別重要[說明 6]。在下列

情況時，需要測量代謝物濃度。

- 當化合物會代謝成 1 至多個具有藥理或毒理活性代謝物。
- 化合物進入動物體會快速完全地被代謝，測量主要代謝物於血中或組織中濃度是唯一可預測原型藥暴露量的方法[說明 7]。

8. 數據的統計分析

數據的表達應該以可進行暴露量的評估為原則。然而，動力學參數有很大的個體間或個體自身之變異，且參與的實驗動物數目不多，故一般而言不需要高精確性的統計。計算平均值、中位數、變異性即可，但某些情況下計算個體數值會比計算整體數值來得重要。如果數據有轉換(例如，對數)的處理，也應一併提供。

9. 分析方法

毒理動力學試驗所使用的分析方法應具專一性(specificity)及有良好的準確度(accuracy)及精密度(precision)[說明 8]。最低偵測極限應可適當地分析毒理動力學試驗中預期所得的數據範圍。在執行毒理動力學試驗時，應選擇具代表性的分析基質，可能是血漿、血清、全血、其他體液或組織，同時也應描述選用的分析方法，並討論內生性物質(來自各動物種類)是否會影響分析方法的準確性。若藥品為消旋物或其他鏡像異構物，應要額外說明選擇分析物之緣由(消旋物或鏡像異構物)。

10. 報告

應將所有毒理動力學的數據彙整，一同評估並解釋毒性試驗結果。分析方法應有綱要敘述或列出文獻來源。此報告的角色端看這些數據是否只適用於某一個毒性試驗或是支持所有的毒性試驗。

說明

1. 藥品暴露量與劑量之間呈非線性增加，其原因可能是排除途徑已呈飽和。化合物如果有特別長的半衰期也可能造成暴露量的增加。相對的，自體誘發代謝的酵素也可能造成比預期低的暴露量。
2. 如果檢品是從主要試驗組動物取得，應該標示是否從所有給藥組及對照組的動物取得。
3. 當此情形產生時，顯示影響暴露量的主因在於吸收，而非清除率的增加。

4. 當非毒性物質以口服溶液或懸浮液投予動物，會因投予體積的限制而限制投予的劑量。
5. 衛星試驗組(satellite groups)：包含在毒性試驗中的動物組，其處理及給藥條件皆與主要試驗的動物相同，但其目的主要是用來採取樣品做毒理動力學試驗。
6. 當必須測量代謝物於人體的曝露量時，為了探討其適當的毒性試驗，可能需在非臨床毒性試驗中測量代謝物的濃度。
7. 一般而言，代謝物的測量隸屬於毒理動力學評估的一部份，其僅評估最終代謝物的曝露量，並不包括不穩定的中間代謝物。
8. 一個完整的分析方法確效應涵蓋準確度、精密度、選擇性、基質效應、檢體安定性及最低定量濃度等資料，並應注意系統適用性。

參考文獻

1. International Conference on Harmonization Topic S3A Document “Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies” .[Step 5 (1994)]
2. International Conference on Harmonization Topic S1C (R2) Document Carcinogenicity: Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. [Step 5 (2008)]
3. International Conference on Harmonization Topic S5(R2) Document Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility. [Step 5 (2000)]

第 11 節 免疫毒性試驗 (Immunotoxicity Study)

本節之目的在於提供(1)非臨床測試方法之建議辨別具潛在免疫毒性的化合物，與(2)為免疫毒性測試所做之證據權重決策方法制定參考規範。本章節目前僅限於對非預期性的免疫抑制及免疫增強的探討，並未包括過敏或藥物引起特異的自體免疫。現有對過敏或刺激性的參考規範仍然有效，不受此節影響。本節試驗適用於新藥(不適用於生技衍生性藥品及其他生物性產品)，以及已上市藥物變更適應症或現有產品仿單之改變，所造成相關的免疫毒性議題。除此之外，本節也可適用於在臨床試驗中及核准上市後才發現具免疫毒性臨床症狀的藥物。

本節建議遵守的免疫毒性評估決策程序如下：基本上所有的人用新藥都應該評估其造成免疫毒性的可能，採用方法包括標準毒性試驗組及額外的免疫毒性試驗。是否需要額外的免疫毒性試驗應由下列考量因素來決定：(1)從標準毒性試驗組發現有免疫毒性之潛力；(2)藥物的藥理特性顯示有影響免疫功能的可能性(例如，抗發炎藥物)；(3)預期的病人族群是由疾病狀態或併用療法而導致免疫功能不全；(4)與已知免疫調節劑的結構相似；(5)藥物會在體內的免疫系統蓄積；與(6)臨床試驗發現有免疫毒性。整體的利弊評估應該參照以上描述之所有因素的資訊，視證據強度判斷是否須進行額外的免疫毒性分析。若沒有執行額外的免疫毒性試驗，廠商應提供理由解釋。詳細說明請參照 ICH S8。

額外的免疫毒性測試時機點可由測試化合物的效力性質及臨床測試類型需要而定，這些試驗通常應在用藥於大量病人，通常是第三期臨床試驗執行前完成。臨床試驗中可建議加入免疫系統參數的監測。如果療效目標是免疫功能不全的病人，則免疫毒性測試可在藥物開發早期時即著手。

一、從標準毒性試驗進行初步免疫毒性試驗項目 (Standard Toxicity Studies, STS)
標準毒性試驗可初步篩選潛在的免疫毒性，可從短期到較長期的嚙齒類和非嚙齒類重覆劑量試驗設計中，增加下列觀察項目。

第四章 生物藥品之非臨床試驗規範(Guidelines for Nonclinical Safety Studies of Biopharmaceuticals)

生物藥品的來源非常廣泛，且產品種類眾多，涵蓋由基因工程、細胞工程及蛋白質工程方法製造而得之藥物或檢驗試劑，基於生物藥品的多樣性，而生物活性亦隨結構的變化而改變，因此傳統的毒性測試方法不一定適用於此類產品，均採用較彈性的方式，依試驗物質特性而進行評估。生物藥品的非臨床安全性試驗、臨床試驗及查驗登記的流程可參考第一章[圖二 新生物藥品上市之考量]。

基於生物藥品的產品類型眾多，依據 ICH 之指導原則，本章節僅適用於基本的生物藥品，包括以細菌、酵母菌、昆蟲、植物及哺乳類動物細胞等製造的生物藥品，此類產品一般應用於醫學診斷、治療或預防，其有效成份包括經基因工程或細胞培養技術製造所得的蛋白質、胜肽、及其衍生物等，例如，細胞激素(cytokines)、血纖維分解原酶活化劑(plasminogen activator)、基因重組的血漿蛋白及凝血因子(recombinant blood plasma factors)、生長激素(growth factor)、荷爾蒙(hormones)與單株抗體(monoclonal antibodies)等。本章節中部分內容亦適用於基因重組蛋白疫苗(recombinant DNA protein vaccines)、合成胜肽(chemically synthesized peptides)、由血漿中抽取的成份(blood plasma extracted factors)、人體組織分離之內生性蛋白(endogenous proteins extracted from human tissue)、及寡核苷藥物(oligonucleotide drugs)。對於細菌和病毒疫苗、基因疫苗、細胞和基因療法、抗生素、過敏性萃取物(allergenic extracts)、肝素(heparin)、血球細胞組成物(cellular blood component)、維生素、及微生物等產品，將依科技的發展及國際上管理的趨勢，依個案方式另行審核。

一、生物藥品的品質

生物藥品在生產及製造過程中可能因宿主細胞株(細菌、酵母菌、昆蟲、植物及哺乳類細胞)的來源被污染而造成危害，而細胞株本身所製造之蛋白質如果未純化完全則會引起過敏性反應或其他免疫病理效應。產品中如果有核酸的污染也須考量是否可能嵌入人體染色體。若生物藥品是利用昆蟲、植物或哺乳類細胞、或基因轉殖動物

製造的，更應確定是否受病毒感染。因此生物藥品在製程過程中必須能除去或不活化這些病毒及其他不純物，以確保其安全性，並詳細鑑定產品中的成份，方可進入非臨床試驗。

一般而言，在製劑研發過程中常會修改製程以求達到更好的品質和產量，因此非臨床試驗與臨床試驗使用之產品須做比較，若產品的製造過程有所改變時，為確定產品在不同的製造過程中產品品質的一致性，可藉由產品的生化特性(例如，性質、純度、穩定性、力價)或藥動試驗來鑑定，同時評估此改變可能造成的影響。

二、非臨床試驗

一般非臨床試驗的目的為：(1)決定人體臨床試驗的安全起始給與劑量及劑量增加之方式；(2)測定試驗物質在標靶器官中引起的毒性與其可逆性；(3)決定臨床試驗的觀察檢測參數。基於生物藥品的多樣性，而生物活性亦隨結構的變化而改變，因此當傳統的毒性測試方法不適用於此類產品時，則可考慮採用較彈性的方式，依試驗物質特性而進行評估。

所有毒性試驗均需依循 GLP 規範進行，然而當生物藥品的測試系統，無法依循現行 GLP 規範時，則須說明是那些試驗，及其廠內(In-house)之 GLP 規範，作為產品安全性評估時之依據。

1. 生物活性/藥效學試驗

生物藥品的活性可利用體內及體外測試方法獲得。體外試驗包括利用細胞株或初代細胞(primary cell)培養，檢驗試驗物質對細胞的反應與細胞增殖現象。由於某些生技藥品對動物品種有很高的專一性，因此須選擇適當的動物品種進行毒性試驗，而使用哺乳類動物細胞進行體外試驗有助預估生體之活性及不同生物品種對該試驗物質的感受性，例如，測定受體的親和力、藥理作用，同時輔助選擇適當的動物品種進行體內藥理及毒性試驗。藉由體內試驗評估產品的藥理作用、作用機制，以利於評估試驗物質在臨床試驗中的作用。結合體內與體外試驗結果，有助於預測試驗物質在人體內可能產生的作用。對於單株抗體產品，抗體的免疫性質包括其抗原特性、補體結合、任何非預期的作用、及對非標靶器官的細胞毒性等都須詳細敘述。

2. 動物品種的選擇

由於生物藥品不同於一般藥品，其藥效活性具有品種或組織的特異性，因此標準毒性試驗使用的動物品種(例如，鼠與狗)在此並不一定適用，雖然一般藥品的安全性評估須使用至少 2 種哺乳類動物，某些情況下，可以考慮只進行 1 種動物試驗，但須提出說明。此外，雖然短期毒性試驗可能要求要在兩種相關的動物品種執行，若這兩種動物所得到的毒理結果相似，則長期試驗可考慮只使用其中最合適的 1 種動物。

一般進行毒性試驗的試驗動物，其產生的藥理須與人體相關，然而若體外非臨床試驗無法確定其相關的動物品種時，仍須進行 1 種動物的毒性試驗(例如，14 天以內的重覆劑量毒性試驗)，以評估此產品對主要器官功能(例如，心血管、呼吸系統)可能產生的毒性。

近年來已發展出與人體疾病型態相類似的動物，這些動物具有自發性疾病，或失去某些基因，或是帶著重組 DNA 分子(基因轉殖動物)，都可提供良好的動物模式可進一步測定生技藥品的藥理反應、藥動特性及藥量，同時有助於測定此類產品的安全性。若能經由科學證明，具有特定疾病之動物亦可取代一般動物進行毒性試驗 [說明 1]。

3. 動物數量

動物的數目與性別須視實驗的需要做彈性的調整。每劑量組的試驗動物應足夠觀察出產品的毒性，若試驗動物數量太少，則只能觀察出產生毒性的機率，而無法觀察出其毒性的嚴重程度。若因試驗動物(靈長類)的數量有限時，則以提高觀察的頻率與期間來彌補此種限制。一般試驗須雄、雌兩性並用。

4. 給藥途徑

非臨床試驗中使用的給藥途徑、給藥頻率及時間應儘量與臨床所用的相同，但須考量產品的藥動特性、生體可用率，及對試驗動物較安全與人道的劑量。若試驗物質的主成份溶解度較低、或試驗動物具較佳的藥物排除能力，可藉增加對試驗動物的給藥頻率，使試驗動物的給藥劑量與臨床使用劑量相近。此外也要考慮到藥物體積、濃度、配方及給藥途徑對整個實驗的影響。同時也要計算出藥物在試驗動物體內的血中濃度。若由於生體可用率、動物品種(生理性質、大小)等限制

而不能以臨床給藥途徑投藥，則可採用替代的給藥方式。

5. 劑量選擇

劑量須包含會產生毒性、能達到劑量反應，及不造成任何不良反應的劑量(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)。若試驗物質的毒性較低或不具毒性，無法確定最高劑量之極限，則須提出劑量選擇的依據，並應包含數倍於人體使用劑量的劑量。最高劑量之選擇應依據藥效與生理作用、試驗物質的取得及臨床使用情形。若動物細胞對試驗物質的親和性或效能比人體細胞低，則應進行更高劑量的試驗。每種生物藥品的安全劑量範圍及臨床應用均不盡相同，利用數倍於人體使用劑量的劑量有助於決定適當的安全劑量範圍及臨床應用。試驗動物給予試驗物質時，須考慮每種動物之每次最高耐受劑量，若超過動物本身負荷時，應分次適當給予，以達試驗之目的。

6. 免疫活性

大多數生物藥品在動物體內中都具有免疫性，因此應在重覆劑量毒性試驗中測量抗體與該生物藥品結合的量，同時鑑定抗體反應的特性(中和性或非中和性)，以了解其與藥動、藥效或毒性變化的關係。

在數據分析時，須評估抗體生成對藥動或藥效參數的影響、是否增加不良反應的發生率與嚴重程度、是否會活化補體以及是否產生新的毒性。此外也要留意抗原—抗體免疫複合物的沉積是否會使組織產生病變。

不能只憑偵測到抗體而作為終止非臨床試驗或修改試驗的時間的標準，除非大部份的實驗動物均顯示該免疫反應會中和生物藥品對動物體內的藥效或引起毒性作用。一般動物對不同基因工程蛋白的免疫反應不同(人體亦然)，須評估因免疫補體等成份的形成或沈澱而導致的病理改變，並配合以上各項因素評估其安全性試驗的數據。

動物體內與人體對生物藥品產生抗體的反應並不相同，所以即使動物體內中產生明顯的抗體，人體卻不一定會有相同的反應。如果以天竺鼠進行蛋白質產品的過敏性試驗通常會呈陽性反應，但此現象極少可能發生於人體。因此，評估免疫活性試驗結果時，須考量此試驗是否適合用來預測人體的反應。

三、毒性試驗

非臨床試驗的目的為在進行人體臨床試驗前及臨床應用時決定試驗物質的藥效與毒性效應，若生物藥品的結構及藥理作用，特別是藥動特性與市售品相似，則可減少毒性測試的項目。

1. 安全性藥理試驗

藉著適當的動物模式，觀察生物藥品在體內中是否產生任何非預期的藥理作用，並在毒性試驗或臨床試驗時觀察此藥理作用。安全藥理試驗可提供毒性的功能指標，這些功能指標可由獨立的試驗加以觀察，或在進行毒性試驗時加以觀察。安全藥理試驗的目的為鑑定主要生理系統(例如，心血管、呼吸、腎臟、中樞神經等)的功能是否可能受藥物潛在毒性所影響，可藉著離體器官或其他體外的測試系統，觀察生物藥品的藥理性質評估其對特定器官的功能的影響。

2. 毒性與藥動學試驗 [吸收、分佈、代謝、排泄，(ADME)]

一般最常用的毒性與藥動學試驗為單一劑量藥動與組織分佈試驗，但生物藥品很難依一般的毒性與藥動學試驗規範進行，因此較難評估生物藥品在體內中之組織分佈、蓄積及排除情況。動物品種間 ADME 的差異對預測臨床現象的能力，及評估劑量與作用間之關係有很大的影響。藥動特性會因免疫之清除機制作用的改變，將會影響其 ADME 特性與毒性數據的分析。因此 ADME 試驗所使用的試驗物質應足以代表使用於臨床的藥品，而給藥途徑亦須選擇與臨床使用相近方式。

a. 分析方法

視試驗需要並依科學方法決定使用的分析方法，一般而言，一種評估分析方法已足夠。若分析中有使用經放射性標定的藥品，須確定該放射性物質的活性與生物性質與原藥品相同。動物試驗與人體臨床試驗最好使用相同的分析方法，同時評估血漿與蛋白質或抗體對分析方法的影响。

b. 動物品種的選擇

使用與人類相關的動物品種，且其結果能與藥理及毒理試驗結果相互比較。

c. 吸收

觀察藥品的吸收與生體可用率的特性，以及其與給藥途徑的關係。吸收特性會受配方、濃度或吸收部位所影響。如果可行，建議於毒性試驗中監測全身曝露量。在進行首次人體臨床試驗前，應先取得相關的動物吸收資訊，以決定安全劑量及

給藥方式。

d. 分佈

評估組織分佈與清除機制有助了解藥品的藥理與毒性性質。由於放射性胺基酸追蹤劑會因蛋白質生成，而進入不相關的蛋白質或胜肽中，因此使用具放射活性的胺基酸追蹤劑須小心控制。

e. 代謝

生技藥品的代謝方式已為人所熟知，即先分解為小片段的胜肽，再進一步代謝成胺基酸。代謝特性的評估方法有很多，例如，免疫化學偵測、色層分析、SDS-凝膠電泳分析等。

f. 排泄

生物藥品的排泄牽涉到不同的器官系統與作用機制，因此試驗須觀察各個器官的排泄速率。

3. 單一劑量毒性試驗

單一劑量毒性試驗至少使用 1 種的動物進行，觀察劑量與全身或局部毒性的關係，輔助選擇重覆劑量毒性試驗的劑量。同時可由藥理試驗或單一劑量毒性試驗觀察試驗物質之劑量與作用的關係。

4. 重覆劑量毒性試驗

試驗應使用與臨床的給藥途徑及給藥頻率相同的方式。若試驗需要，試驗方法應包含觀察試驗物質的毒性動力學。一般重覆劑量毒性試驗須包含一段復原期，以測定試驗物質造成的毒性反應是否會消失或更惡化，同時偵測遲發性的毒性作用。對於藥效或毒性反應持續較久的生技產品，必須要觀察到藥物作用完全消失。

重覆劑量毒性試驗的給藥週期須依藥品臨床使用的給藥週期及應用而定，一般生物藥品的給藥期間為 1-3 個月，若產品為短期使用(7 天以下)，或針對急性重大疾病，則兩週之試驗數據已足夠提供藥品進行臨床及上市所需之資料。若產品是治療慢性疾病，則給藥期間為 6 個月。長期毒性試驗期間的長短調整應針對不同生技產品特性提出學理上的解釋。

5. 免疫毒性

免疫毒性試驗包含免疫原性與過敏性評估。許多生物藥品是用以引發或抑制免疫系統，因此也可能會影響到體液及細胞性免疫反應。注射部位產生的發炎反應可能表示藥物在體內引起免疫反應，同時也要留意單純的注射傷口或製劑配方也可能造成注射部位的毒性反應。同時，若動物產生自體免疫的現象，表示標靶器官的表面抗原之表現有所改變，免疫毒性試驗可用以釐清這些現象。

6. 生殖與發育毒性試驗

生殖與發育毒性試驗是依據生物藥品的性質、臨床應用及給藥對象來決定是否需要進行 [說明 2]。而試驗內容與給藥頻率則依試驗動物品種特異性、免疫性、生物活性或藥物排除半衰期($t_{1/2}$)來作調整。例如，某些單株抗體，由於其作用時間長，因此特別要去測量新生子代的免疫功能以評估可能產生的發育毒性。

7. 基因毒性試驗

一般基因毒性測試方法並不一定適用於生物藥品，因無法分析動物經投入大量的胜肽/蛋白質物質而得的數據結果，同時生物藥品一般不會與 DNA 或其他染色體物質直接結合作用 [說明 3]。但若有其他因素考量，例如，蛋白質產品含有有機連接物或外來 DNA 等成份，則須進行基因毒性試驗。

8. 致癌性試驗

生物藥品須視臨床給藥的時間、給藥對象及其生物活性(例如，是否為生長因子、免疫抑制劑等等)來決定是否須進行致癌性評估，當啮齒類動物不是該產品評估毒性或免疫性的特定品種，一般傳統致癌性測試方法並不適用，則以其他試驗方法評估其致癌性。

可能會引發癌化細胞增殖或造成細胞增生而產生腫瘤的生物藥品應進行致癌性試驗，以評估該生物藥品是否會刺激細胞不正常增生。若由體外試驗發現生物藥品有誘發腫瘤之可能，則須對相關動物進行體內試驗。

若生物藥品在啮齒類動物體內中有生物活性且無免疫性，可考慮使用一種動物進行致癌性的評估。進行試驗時須小心選擇給藥劑量，可依據生物藥品的藥動學與藥效學試驗結果、受體的特性、及人體使用臨床劑量以選擇最適當的劑量。

9. 局部耐受性試驗

一般欲上市生物藥品的配方須進行局部耐受性測試，但於特殊情況下，也可測試

其代表性的配方。同時，生物藥品的局部反應可藉由單一劑量或重覆劑量毒性試驗所得之資訊進行評估。

說明：

1. 利用具有疾病的動物模式進行試驗有助於決定毒性指標、臨床療效，並找出適當的配方、給藥途徑以及治療方式。但此種動物模式一般缺乏相關數據可作為評估試驗結果的參考，因此進行試驗時同時收集對照與基線(baseline)數據以作為比較。
2. 若一新藥的作用機轉與某類產品相似，且該類產品的生殖與發育毒性資料很充足，而唯一相關的動物為非人類的靈長動物，則可免除此新藥的生殖與發育毒性試驗，但需就科學角度提出合理解釋。
3. 有些生物藥品可能會在動物體內不斷累積導致自發性突變細胞獲得生長優勢，而產生腫瘤，一般基因毒性試驗並無法偵測到這種現象，因此不適用於這類產品，而應發展其他體外或體內試驗方法進行評估。

參考文獻

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline S6 "Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals ".[Step 5 (1997)]
2. ICH Harmonised Tripartite Guideline S6(R1) "Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals ".[Step 5 (2011)]
3. ICH Harmonised Tripartite Guideline S3A" Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies" .[Step 5 (1994)]

第五章 抗癌新藥非臨床試驗規範(Guidelines for Nonclinical Studies of Anticancer Pharmaceuticals)

一、前言

由於惡性腫瘤具有生命威脅性，這些疾病的死亡率偏高，現有治療的效果有限，於是本章節將參照國際 ICH 與歐盟、美國、日本各國法規最新發展擬訂，來說明如何設計和進行非臨床試驗以支持抗癌新藥的研發，促使新藥及早應用在惡化轉移疾病和有限療法選擇的癌症病患。

本章旨在促進加速抗癌新藥的研發，以及保護病患免受不必要的不良副作用，同時避免對動物和其他資源多餘的使用。本章將提供資訊協助國內相關單位進行抗癌新藥研發，設計適當的非臨床試驗方案。此外，研發抗癌新藥也應該考慮藥品非臨床試驗安全性規範其他章節所描述的原則。

本章僅提供相關資訊給癌症治療末期階段或轉移惡化癌症病患的各類抗癌新藥，無論其給藥途徑及作用機轉，含小分子和生物藥品皆適用。本章描述抗癌新藥研發有關的非臨床試驗型態和執行時機點，某些特殊情況下，本章對非臨床測試建議的描述可能會與其他規範有所差異。若沒有進一步說明的情況下，應先參考國內衛生福利部「藥品查驗登記審查準則」及「藥品非臨床試驗安全性規範」的一般規定後引用。核醫藥物並未涵蓋在這個指引中，但是能適用某些共通性原則。本章不適用於具高預期壽命之病患、癌症預防、化學療法副作用或症狀的治療、在健康志願者的試驗、疫苗、或細胞/基因治療的藥物試驗。如果健康志願者納入到臨床試驗中，則應該遵循一般新藥臨床前研發(ICH M3(R2))的相關規定進行臨床前相關試驗。

在抗癌新藥研發過程中，臨床試驗經常收納癌症末期病患，其疾病情況常是轉移惡化和致命的。此外，抗癌新藥臨床給藥劑量經常是接近或在不良副作用的給藥劑量。因此，在設計抗癌新藥的非臨床試驗時，所要求的類型和時間點與靈活性，可有別於其他藥物。然而，抗癌新藥之非臨床評估仍需達到以下目的：(1)辨認藥物的藥理特性，(2)建立人體初始曝露的安全起始劑量，以及(3)瞭解藥物毒理特性，例如，確認標靶器官、估計安全係數和可恢復性的觀察。

新藥研發皆需設計試驗以明確地描述其藥理學和毒理學的特性。特別是當打算用

於人體時。可能需要修改"標準"的非臨床測試步驟，以滿足對用於人體新藥或方法相關的新穎特性之描述。一般來說，新藥研發的非臨床安全性試驗之進行應遵循 GLP。製造過程能在研發過程中改變。然而，用於非臨床試驗的新藥活性成分應該詳細地描述其特性，並具臨床所使用材料的代表性。

由於本章不可能涵蓋抗癌新藥研發過程中的所有情況，所以個別新藥臨床前研發應在本章的基礎上，鼓勵廠商與醫藥品查驗中心進行諮詢，根據藥物的自身特性擬訂合適的非臨床試驗方案。

二、支持非臨床評估的相關試驗

1. 藥效學試驗

抗癌新藥的藥效學試驗目的主要是探討藥物作用機轉、作用強度以及對不同類型癌症的敏感性等，提供資訊給臨床試驗中的給藥方案、選擇特定癌症種類以及安全性監測評估等參考。在進入第一期臨床試驗前，應進行初步的作用機轉探討、抗藥性與給藥時程依存性、以及體內抗癌活性之分析。必要時，這些試驗應進一步延伸與第二/三期臨床試驗同步進行。應該根據標靶分子和作用機轉來選擇適當的實驗模型，但是不需要使用與臨床擬評估的同樣腫瘤類型來試驗。這些藥理試驗應能提供臨床前的原理驗證(proof of principle)，引導給藥時程和藥量逐步提升方案，協助選擇合適的測試物種，導引臨床起始藥量的選擇，以及在某些情況下，可以提供選用新藥複方併用的理由，因為這些說明並不容易從臨床資訊得到。有些情況下，也應該研究藥物次藥效作用或標靶分子外的作用。

(1) 體外試驗

體外試驗主要用於篩選候選新藥，初步瞭解藥物作用機轉、具感受性癌症類型和作用強度，為隨後進行的體內動物試驗提供參考。

作用機轉試驗(例如，藥物作用標靶、細胞週期特異性等)對於預測藥物有效性和安全性以及整體非臨床和臨床試驗的設計，具有重要意義，應隨著研發過程不斷地深入探討。

在選擇癌細胞株標靶進行治療時，應考慮到細胞的生長和增生速率。除非有充分證據證明藥物僅作用於特定的人類細胞標靶，否則一般建議應至少選用數種人類

癌細胞株進行試驗。測試應觀察藥物對抗藥性癌細胞株和正常人類細胞的作用和影響。測試應設陽性和陰性對照組，陽性對照組為化學結構類似、具有相同或類似作用機轉的抗癌新藥，陰性對照組則為溶媒對照。

(2) 體內試驗

體內試驗用於進一步觀察藥物在對特定類型癌細胞的毒殺或生長抑制作用，探討藥物產生藥效作用的給藥劑量、途徑、頻率和週期等。

體內試驗通常採用動物癌細胞轉殖模型和人類癌細胞異體轉殖模型。由於動物癌細胞轉殖模型與臨床療效之間的相關性不強，僅可用於候選新藥的初步篩選。一般狀況下，建議以人類癌細胞異體轉殖模型試驗結果來評估抗癌新藥的有效性。人類癌細胞異體轉殖模型試驗通常在缺少胸腺的鰓鼠或先天免疫不全(SCID)鰓鼠體內轉殖人類癌細胞株，以觀察藥物對癌細胞生長的抑制作用。轉殖癌細胞的選擇主要是參考體外試驗結果、細胞株的生物學特性等因素。原則上應儘量選用多種人類癌細胞異體轉殖瘤模型；轉殖的人類癌細胞株在組織學、基因表達特性、抗藥性等方面，應與人類癌症特性儘量接近。

試驗設計一般包括高、中、低3個給藥劑量組、陽性對照組和陰性對照組。給藥組的藥物劑量選擇應呈現出劑量效應關係，高劑量不宜超過試驗動物對藥物的最高耐受量(MTD，[說明1])。並應根據藥物的藥動學特性和毒性反應等因素決定給藥頻率和週期；給藥途徑應儘量與預期臨床給藥的途徑相同。陽性對照組一般需滿足以下條件：(1)與新藥結構類似，作用機轉相同或相近；(2)對轉殖的癌細胞具感受性；(3)臨床已廣泛應用且療效確定。陽性對照組的給藥方案應呈現出最佳治療效果，其給藥劑量一般不宜超過最大耐受量。

建議使用測量腫瘤直徑的方法進行動態觀察藥物的抗癌效應。在試驗中還應觀測與藥物安全性有關的指標，例如，動物體重增減和死亡率，並將治療組的資料與陽性對照組進行比較，這對於判斷藥物的安全性和研發潛力具有重要意義。試驗中應記錄測試指標的變化與給藥時間的關係，以便瞭解藥物作用特性，並減少單次記錄試驗結果可能引起的誤差。體內抗癌試驗結果應儘可能附上相對應的照片。

對於體內試驗結果的評估應整體考量藥物作用機轉、試驗模型的臨床相關性、每

一種模型的實際試驗結果，在評估時還應特別注意試驗藥物與陽性對照組試驗結果的比較。在毒性相當的情況下(在有效性試驗中主要為動物死亡率和體重下降相當)，治療試驗組和陽性對照組癌細胞增生率的比較也是評估新藥是否可進入臨床試驗的重要指標之一。

(二)臨床前安全性評估

抗癌新藥非臨床安全性評估的試驗目的主要包括：(1)估算第一期臨床試驗的起始劑量；(2)確認藥物毒性標靶器官或標靶組織，預測藥物毒性反應的性質、程度和可恢復性；(3)為臨床試驗劑量上升(dose escalation)方案的設計及臨床最大給藥量提供參考。

抗癌新藥的毒性易發生於代謝旺盛的組織，通常毒性作用大，安全係數小，具有蓄積性和延遲性，因此與其他小分子藥物相比，其安全性試驗具有一定的靈活性和特殊性。本章提出的各項非臨床安全性試驗考量，絕大部份是基於目前癌症病人缺少有效的臨床治療手段，預期生存期較短，但事實上不同類型癌症的臨床治療現況並不完全一致。因此在對特定的藥物進行安全性試驗時，應考慮到臨床預期適應症和給藥人群的特性，不能簡單套用之。

(1)安全性藥理

對維持生命重要器官的功能評估(包括心血管、呼吸和中樞神經系統)與體外 hERG 分析結果，應該在臨床試驗開始前提供；這些參數評估可納入在一般毒理試驗中進行，在支持癌症末期或有疾病轉移惡化病患的臨床試驗，試驗藥物可不需要進行單獨的動物安全性藥理試驗。惟在對安全性藥理試驗有疑慮的情況下，應將 ICH S7A 描述的核心系列及/或後續補充性試驗納入考慮。

(2)一般毒理學

在癌症病患進行的第一期臨床試驗主要目標是估計藥物安全性。此臨床試驗包括給藥到最高耐受劑量(maximum tolerated dose, MTD)和產生藥量限制的毒性(dose limiting toxicity, DLT)。所以，在臨床前毒理試驗中決定“未發現任何不良反應的劑量”(no observed adverse effect level, NOAEL)或“不產生藥效之劑量”(no effect level, NOEL)，並不被認為是支持抗癌新藥臨床用途的必要條件。

抗癌新藥之臨床前毒理學試驗應該參照在表一所舉的案例設計，以支持臨床的給藥時程。應該提出毒性的可恢復性和毒性延遲產生的評估。證實所有藥物導致的作用可以完全恢復，並非必要條件[說明 2]。為支持第一期臨床試驗，至少一項非臨床試驗應該在試驗給藥試驗結束後加上恢復期，以評估毒性的可恢復性或在停止藥物處理後毒性繼續惡化的潛力。適當的情況下，應該進行毒理動力學評估試驗。

1. 單一劑量急毒性試驗

單一劑量急毒性試驗的主要目的是觀察藥物對動物的毒性作用，初步瞭解其毒性標靶器官，並測定其最大耐受量。試驗可採用 1 至 2 種哺乳類動物進行，給藥途徑儘可能與臨床預期的給藥途徑相同，並給予恢復期觀察至少 14 天。經結構修改獲得的化合物或藥物使用特殊給藥載體，應進行試驗新藥與原型化合物/原劑型比對的急毒性試驗。

2. 重覆劑量毒性試驗

重覆劑量毒性試驗的主要目的在於預測藥物毒性標靶器官、毒性的性質、程度、劑量反應關係和可恢復性，並進一步估算第一期臨床試驗的安全起始劑量。與其他藥物比較，抗癌新藥的重覆劑量毒性試驗需特別注意藥物的最高耐受劑量。

針對第三期臨床試驗及新藥查驗登記，應進一步提供試驗新藥在齧齒類與非齧齒類動物的重覆劑量毒性試驗結果。不管臨床是每日或斷續的給藥，給藥時程應儘可能與預期臨床試驗方式相同，臨床前重覆劑量毒性試驗的期間至少應與臨床試驗的期間相等。應特別注意對重要標靶器官的毒性嚴重程度及其毒性影響是否具有恢復性(reversibility)。

由於抗癌新藥可能具有蓄積或延遲毒性，重覆劑量毒性試驗之恢復期動物組犧牲時間點應該有科學性說明解釋，一般不短於 28 天[視藥物半衰期($t_{1/2}$)而定，通常是 7 到 10 個半衰期]。除常規觀測指標外，重覆劑量毒性試驗應根據藥物特性、文獻結果和同類藥物已知的臨床不良反應(例如，骨髓毒性、神經毒性、消化道毒性、心臟毒性等)，設計具有特殊針對性的觀測指標或執行後續的試驗。

重覆劑量毒性試驗一般至少採用高、中、低 3 個給藥劑量組和 1 個溶媒(或輔劑)對照組。經結構修改獲得的化合物或特殊給藥載體則應考慮增加原型化合物或原

劑型對照組。試驗給藥劑量應統一以體表面積換算表示。高劑量組應使動物充分曝露藥物以產生毒性反應，並儘量尋找到藥物的最高耐受劑量；低劑量組則應使動物出現較輕的毒性反應。

(3) 基因毒性

由於抗癌新藥通常先在沒有其他治療方法的癌症患者中進行臨床試驗，因此進入第一/二期試驗前，可以暫不要求基因毒性試驗。但應在申請 NDA 時提供完整的基因毒性試驗系列評估結果(參見 ICH S2(R1))。生物藥品應該根據在 ICH S6(R1) 概述的原則。

(4) 致癌性

由於臨床給藥癌症患者族群的預期生存期較短，抗癌新藥通常可暫不要求致癌性試驗。針對抗癌新藥致癌性評估的適切性說明，可參見國際 ICH S1A/B 指引中的描述。

(5) 生殖毒性試驗

胚胎毒理學評估需要進行，以評估試驗新藥是否對可能懷孕病患的發育中受精卵或胎兒具有潛在之風險。抗癌新藥的胚胎毒性試驗應該在申請 NDA 送件時提供，但是在支持末期或轉移惡化癌症病患的臨床試驗，這些試驗不被認為是必要條件。若抗癌新藥在一般毒性試驗中即確認是作用在快速分裂的細胞，或抗癌新藥的作用機轉已被歸類為會造成胚胎發育毒性的類別，則胚胎試驗也不被認為是必要條件。但參與抗癌新藥試驗之受試者須採高效率的避孕措施，孕婦也可能參與臨床試驗接受抗癌新藥，因此鼓勵試驗申請人進行探討生殖毒性潛力的試驗。

胚胎毒理學試驗通常在 2 個物種中進行。但當 1 個物種之胚胎發育毒性試驗結果是具胚胎致死性或具致畸胎性，則不需要在第二個物種做確定性試驗。針對生技衍生藥品，胚胎毒性試驗不見得是可執行的。由於這議題仍在 ICH S6 修訂討論中，將在本章後續發展中檢討修訂。在末期或轉移惡化癌症病患的臨床治療，通常沒有被要求進行生育力試驗與出生前後發育毒理學試驗。從一般毒理試驗得到對生殖器官影響的資訊，應該併入到對生殖毒性的評估中。

(6) 局部耐受性試驗

抗癌新藥可能直接對給藥局部組織產生毒性作用，應在進入第一期臨床試驗前完

成與臨床預期給藥途徑相同的局部耐受性試驗及藥物使用者安全性評估。此項試驗可單獨進行，也可結合重覆劑量毒性動物試驗進行。如果預期上市產品與試驗新藥不同，則應在第三期試驗及 NDA 前提供相關的局部耐受性試驗，包括靜脈旁注射給藥。

(7) 免疫毒性

針對抗癌新藥，一般毒理學試驗的設計組件被認為足以評估免疫毒性潛力，並可支持新藥上市。

(8) 藥動學/毒理動力學試驗

於非臨床試驗動物種類中藥動學參數在最高耐受劑量(MTD)附近給藥量的最高血中濃度(C_{max})、曲線下總面積(AUC)和半衰期($t_{1/2}$)將有助於第一期臨床試驗中劑量的選擇、給藥次數的設計及劑量的逐步提升。在動物有關吸收、分佈、代謝和排泄的詳細藥動資訊，通常應該與臨床研發同時進行，於第三期臨床試驗前提供。

毒理動力學結果既可以描述實驗動物的曝露量與給藥劑量、曝露時間和毒理學結果之間的關係、藥品是否具蓄積性，也可協助估算藥品的安全係數，為第一期臨床耐受性試驗設計提供參考。鼓勵廠商在抗癌新藥的重覆劑量毒性動物試驗中同時進行毒理動力學試驗。

有效劑量下的藥動學參數是說明藥品有效性的基礎之一。測定藥品發揮藥效時的曝露量[說明 3]與毒理動力學資料比較，將有助於判斷藥品安全係數(safety margin)；動物與人體藥動學參數進行比較，將有助於臨床試驗早期預測藥品有效性和進一步調整臨床試驗的給藥次數。因此應在臨床前測定具臨床活性之原型藥或活性代謝物的曝露量。並特別注意藥品在毒性標靶器官和癌症組織中的分佈。

對於特殊給藥載體應用於抗癌新藥(例如，微脂體、乳劑等)，其藥動學試驗的重點在於與一般製劑或已上市特殊給藥載體的比較，包括藥動學參數和藥品於組織分佈比較。如果藥品設計為癌細胞標靶製劑，應測定模型動物癌組織中的藥品濃度，以初步顯示是否達到癌標靶的設計目的。應注意藥動學差異可能導致不同的毒性反應，必要時，應進行相關的安全性試驗。

三、非臨床試驗與臨床試驗間的銜接

藥品非臨床試驗的最終目的是預測藥物臨床有效性和安全性，判斷其能否進入臨

床試驗，並為臨床試驗的設計和臨床合理給藥提供參考。因此，抗癌新藥應特別注意以下幾點：

(一)首次在人體給藥的起始藥量

如前所述，抗癌新藥的非臨床試驗目的之一是估算安全的第一期臨床試驗起始劑量。重覆劑量毒性動物試驗中測得的藥物最高耐受劑量(以體表面積計算)是估算第一期臨床試驗起始劑量的重要依據之一。選擇臨床起始藥量的目的是在給予具藥理活性的劑量時，仍可合理地安全使用。應該基於所有具備可取得之非臨床數據(例如，藥動學、藥效學或毒性)，以科學方式解釋說明並進行起始藥量的選擇[說明 4]。針對大部分全身性給藥的療法，從動物劑量進行物種間類推至等效的人體藥量，應該根據體表面積常態化(allometric scaling 體形類推)。通常第一期臨床試驗建議起始劑量不得高於啮齒類動物最大耐受量(dose severely toxic to 10% of rodents, STD₁₀)的 1/10 和非啮齒類動物未產生嚴重毒性(Highest non-severely toxic dose, HNSTD)劑量的 1/6。在估算第一期臨床試驗起始劑量時，還應同時考慮到動物和人體之間生理、生化以及藥動學等方面的差異。雖然藉由體表面積的體形類推是大致估計等效曝露的標準方式。但如果沒有詳細資訊可利用，在某些案例(例如，生物藥品)根據其他參數來外推藥量(例如，體重)也為可行之方式。

針對生物藥品不具致效活性(agonistic activity)或是意欲標靶/配合基的拮抗劑，臨床起始藥量的選擇應該如上所述使用同樣的原則。然而，針對具致活特性的蛋白質療法，則其臨床起始藥量的選擇應該考慮使用經確認的最低期望生物效應水準(MABEL)。

(二)藥量逐步提升和臨床試驗的最高劑量

一般來說，在癌症病患所進行的臨床試驗中，藥量逐步提升或最高試驗劑量不應被非臨床試驗中的最大測試劑量所限制。當在非臨床毒理學試驗中觀察到陡峭的劑量反應曲線，或者當毒性沒有預警標識可利用時，則應該考慮較緩慢的劑量逐步提升。

(三)臨床試驗癌症種類

抗癌新藥需要通過第二期臨床試驗中的癌症種類篩選，才能確定擬研發的臨床適應症。非臨床有效性試驗結果是第二期臨床試驗篩選癌症種類的重要依據。不同

的藥物研發目的(例如，針對某一適應症篩選化合物、針對某一化合物篩選適應症、已上市藥物結構修改等)會影響非臨床試驗方案的設計。不同的試驗方案可能會為第二期臨床試驗癌症種類的篩選提供不同的支持資訊。需在對第一期臨床試驗結果、藥物作用機轉、同類藥物的臨床適應症、非臨床有效性試驗結果等進行綜合性評估的基礎上，以確定第二期臨床試驗擬篩選的癌症種類為何。

(四)支持早期臨床試驗所需毒理試驗的期間和給藥時程

由於不同的給藥時程在早期的臨床試驗也許被運用，所以應該適當地選擇非臨床試驗設計。請參考表一對小分子化學藥物或生物藥品的試驗設計和試驗期間的選擇。在第一期臨床試驗，治療可因病患對治療有反應而繼續，並且在這種情況下，不要求需有新的毒理試驗支持。適當的單一物種毒理試驗，可支持更加密集的臨床給藥時程(例如，從每週1次到每週3次)。

表三、 支持抗癌新藥早期臨床試驗所對應之非臨床試驗時程 (Schedule of nonclinical studies relative to proposed Phase I/II Trial)

臨床時程	非臨床試驗時程 ^{1,2,3}
每3至4週給藥1次	單一劑量試驗
每3週，連續5天每天給藥	連續5天每天給藥
連續5至7天每天給藥，隔週停藥	連續5到7天每天給藥，隔週停藥(2個給藥循環)
連續3週每週給藥1次，停藥1週	每週給藥1次，連續3週
每週給藥2或3次	每週給藥2或3次，連續4週
持續每天給藥	每天給藥持續28天
持續每週給藥	每週給藥1次，持續4至5次給藥

1. 在表內描述的給藥時程未明定恢復期，恢復期應該併到試驗設計中。恢復期後犧牲的時間點應該有科學性地說明解釋(亦見[說明2])。
2. 非臨床給藥時程包括齧齒類和非齧齒類動物。在某些情況下，依逐案原則個別判定，可以適當地選擇其他的方法(例如，基因毒性的藥物會瞄準迅速分化的細胞)。在上述情況下，兩個齧齒類動物種類重覆劑量毒性試驗可被認為是充足的。
3. 若藥品具有較長的藥效作用或半衰期，例如，單株抗體，應該適當地修改這表中所描述的給藥時程。另外，應考慮免疫抗原性的潛在影響(參見 ICH S6)。

(五)支持後續的臨床研發和上市行銷所需的毒理試驗期間

為支持抗癌新藥在末期或轉移惡化疾病的病人的持續研發，應該在開始第三期臨床試驗之前，提供依擬定臨床給藥時程所進行之3個月期間重覆劑量毒理試驗結果。3個月的非臨床試驗期間將被認為足以支持大多數抗癌新藥上市申請所需。

(六)新藥複方合併使用

計劃用於複方的新藥應該分別單獨地進行完整的毒理學評估。在開始臨床試驗之前，應該提供數據以支持複方組合的藥理學理論基礎。應根據可利用的資訊，再決定是否要進行複方的毒理學試驗。然而，意欲治療惡化或末期階段癌症病患的新藥，一般不會被要求任何毒理試驗來評估藥物複方之安全性。

(七)支持小兒族群臨床試驗所需的非臨床試驗

大多數抗癌新藥擬在小兒科病患進行臨床研究時，需先訂出成人族群的相對安全藥量，然後再依此藥量推估用在早期的小兒科臨床試驗中之較低起始藥量。通常不會為了支持含小兒科族群的癌症治療而在未成年動物進行試驗。在本文其他段落概述的非臨床測試建議也適用於小兒族群。當人體安全性數據和先前動物試驗被認為不足以支持所擬的小兒科年齡層進行安全性評估時，則應該考慮在未成年動物進行試驗。

(八)抗癌新藥進入臨床試驗之非臨床試驗要求簡表

臨床前試驗項目	第一/二期臨床試驗	第三期臨床試驗&新藥查驗登記
藥品資料	製造過程能在研發過程中改變，但須具臨床使用的代表性	逐步要求進一步的資料
主藥效學	提供臨床前的原理驗證 (proof of principle)	
體外試驗	說明作用/抗藥性機轉、體內抗癌活性分析的初步說明 鼓勵次藥效學或標靶分子外的影響	必要時，應進一步深入探討
體內試驗	提供給藥時程依存性及體內有效性試驗	必要時，應進一步深入探討
安全性評估	需遵循 GLP 確認標靶器官、估計安全限度和可恢復性。	需遵循 GLP

安全性藥理	提供體外 hERG 分析結果 安全性藥理(呼吸道/心血管功能)評估，可併入毒性試驗進行	--
單一劑量急毒性試驗	1 至 2 個哺乳類物種	--
重覆劑量毒性試驗	一般新藥可選擇 1 個相關的哺乳類物種；新作用機轉藥物則需提供 2 個物種，啮齒類及非啮齒類各 1，試驗期間 2 至 4 週或是 1 至 2 個給藥周期，至少 1 個物種需追加恢復期	2 個哺乳類物種，啮齒類及非啮齒類各 1，試驗時間最少需與臨床試驗期間等長，試驗期間最長 3 個月，需追加恢復期
基因毒性	暫不要求	NDA 時提供完整基因毒性試驗系列評估
致癌性	暫不要求	暫不要求
生殖毒性	可暫不要求，但須全程避孕	可與 Phase III 同步進行，但須全程避孕，胚胎毒性試驗應該在申請 NDA 送件時提供
局部耐受性	給藥部位刺激性觀察 可併入一般毒性試驗觀察	給藥部位刺激性觀察(劑型改變時)
藥動/毒動試驗	鼓勵提供 C_{max} & AUC	完整的動物藥動學參數 (ADME)
臨床試驗建議安全起始劑量的依據	啮齒類 STD_{10} 的 1/10 或非啮齒類 HNSTD 的 1/6，必要時採用 MABEL	--

四、其他的考量

1. 鍵結藥品

鍵結藥品(Conjugated agents)是試驗新藥共價結合到載體分子，例如，結合到蛋白質、脂質或醣類。對結合物質的安全性評估是主要的關切重點。對未結合材料的安全性，例如，連結物的使用，可以接受有限的評估。鍵結物在測試物種和人體血漿中的安定性應有適當評估。毒理動力學評估應該同時評估鍵結和未鍵結的化合物。

1. 微脂體產品

如果未包埋的主成分或有效成分已有很好的特性描述，則沒有要求須對微脂體產品進行完整的評估。適當情況下，安全性評估應包括微脂體產品的毒理學評估，以及對未包埋主要成分和載體的有限評估(例如，在毒理學試驗中以單組進行)。

這裡所描述的原則或許也可適用於其他相似的載體。

3. 藥物代謝物的評估

某些狀況下在人體代謝物不一定可在非臨床試驗中觀察到。對癌症病患而言，不需要對個別代謝物進行一般毒理學評估。因為此類代謝物的人體安全性，可在第一期臨床試驗一併評估。如果原型化合物在胚胎毒性或基因毒性評估中是陽性時，針對不相稱代謝物的個別試驗可以不被要求進行。除非有特別令人擔心的原因，否則代謝物的非臨床測試沒有被要求進行。

4. 對不純物的評估

一般認為雜質沒有預期有任何治療好處，雜質標準根據可忽略風險(negligible risk)(例如，針對基因毒性的雜質，增加癌症的終身風險在十萬或百萬分之一)，而且這樣的標準也許不適用於意圖治療轉移惡化階段病患之抗癌新藥。在其他ICH 規範的雜質限度也許會超過，將根據逐案原則解釋說明。

說明

- 1、試驗動物的最高耐受劑量(Maximal tolerance dose, MTD)：不引起受試動物死亡的最高給藥劑量。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；或對器官重量、血液檢驗、尿液檢驗、臨床生化檢驗等參數造成無法恢復改變之劑量。
- 2、針對非啮齒類動物試驗，給藥劑量組通常包括至少三隻動物/性別/組，恢復組為每組每個性別再增加額外的兩隻動物。然而，也有例子顯示，不需要恢復組或只需在部分或所有的給藥劑量組中，但是應有符合科學的適當解釋。通常應使用兩種動物性別，若只執行單一性別則亦需提供說明解釋。
- 3、藥物曝露量(Drug exposure)：通常依藥動學參數進行描述，以反應藥物和/或其代謝物在動物局部或全身負荷的含量。最常用的參數包括曲線下總面積(AUC)和/最高血中濃度(C_{max})。特殊情況下可適用其他參數。
- 4、許多小分子普遍訂定臨床起始藥量的方法是訂在對10%啮齒類動物產生嚴重毒性劑量(Severely Toxic Dose in 10% of the animals, STD_{10})的1/10。如果非啮齒類動物是最敏感的物種，則以未見嚴重毒性最大劑量(Highest Non- Severely Toxic Dose, HNSTD)的1/6 當作是適當的起始藥量。HNSTD 被定義為不造成死亡、

威脅生命的毒性、或不可逆結果等證據的最大給藥劑量。

參考文獻

1. 藥品查驗登記審查準則 行政院衛生福利部中華民國 103 年 2 月 14 日（公布；及後續發布修正條文）
2. 藥品非臨床試驗安全性規範 行政院衛生署 編 中華民國 102 年 5 月 第四版
3. 癌症治療藥品臨床試驗基準 行政院衛生署 編 中華民國 88 年 12 月 15 日
4. Note for Guidance on the Preclinical Evaluation of Anticancer Medicinal Products. EMEA (1998)
5. Guideline on the Evaluation of Anticancer Medicinal Products in Man. EMEA (2005) CPMP/EWP/205/95/Rev. 3/Corr.
6. Nonclinical Perspective on Initiating Phase I Studies for Small Molecular Weight Compounds, Leighton JK, FDA (2006)
7. Non-Clinical Drug Development, Chris H. Takimoto, (2007)
8. Joseph J. DeGeorge, et al.(1998). Regulatory Considerations for Preclinical Development of Anticancer Drugs. *Cancer Chemother Pharmacol*, **41**: 173-185.
9. Preliminary Draft Recommendations For the Purpose of ICH Discussions: Nonclinical Studies for Anticancer Drugs and Biologicals (Draft). FDA, (2007)
10. 細胞毒類抗肿瘤藥物非臨床研究技術指導原則，中國國家食品藥品監督管理局 2006 年 12 月 19 日
11. Japanese Administrative Notification. Q&A on the Toxicology Studies for Clinical Studies and NDA of Anti-Cancer Agents. (2004)
12. Pharmaceutical Administration and Regulations in Japan, <http://www.jpma.or.jp/english/parj/0607.html>
13. P. Colombo, K Gunnarsson, M Iatropoulos and M Brughera. (2001)

Toxicological Testing of Cytotoxic Drugs. *International Journal of Oncology*, **19**: 1021-1028.

14. BA. Teicher and PA Andrews. (2004). Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval. **91**;1000.
15. ICH Topic M3(R2): Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. [Step 5 (2009)]
16. ICH Topic S6 (R1): Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. [Step 5 (2011)] (1997)
17. ICH Topic S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals. [Step 5(2000)]
18. ICH Topic S9: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals. [Step 5 (2009)]
19. Final Business Plan S9 [30 April (2007)]: Pre-Clinical Guideline on Oncology Therapeutic Development.
20. Nakae et al., (2008). Points to Consider on the Non-clinical Safety Evaluation of Anticancer drugs. *The Journal of Toxicological Sciences*, **33**: 123-126.
21. Kai Shuichi. (2005). Preclinical safety studies of anticancer agents: Non-cytotoxic agents., *The Journal of Toxicological Sciences*, **30**: S47.
22. Re: Docket No. FDA-2009-D-0006 S9 Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals by Biotechnology Industry Organization, April 20, (2009) <http://www.bio.org/sites/default/files/20090420.pdf>
23. G. Curigliano et al., (2009). QTc prolongation assessment in anticancer drug development: Clinical and methodological issues. *Ecancermedicalscience*, **3**:130

第六章 附錄

第一節 名詞對照表

英 文	中 文
Absorption	吸收
Adenosine diphosphate (ADP)	二磷酸腺苷
Allergenic extracts	過敏性萃取物
$AUC_{(0-\tau)}$	時間零至最終採血點時間之曲線下總面積 (τ : 最終採血點時間)
$AUC_{(0-\infty)}$	時間零至無限大之曲線下總面積($AUC_{0-\infty}$)
Antagonistic effect	拮抗作用
Autoradiography	自體放射線攝影術
Baseline	基線
Barbiturate	巴比妥鹽酸衍生物
Birth Index	出生指數
Blood concentration vs cumulative excretion	血液濃度與排除累積量之曲線圖
Blood concentration vs time curve	血液濃度與時間之曲線圖
Blood plasma extracted factors	血漿中抽取的成份
Carcinogenicity test	致癌性試驗
Cellular blood component	血球細胞組成物
Challenge	攻擊反應
Chemically synthesized peptides	合成胜肽
Chromosomal aberration test with mammalian cells in culture	哺乳類細胞的染色體異常分析法
Chromosomal aberrations in bone marrow cells of rodents	啮齒類骨髓細胞之染色體異常測試法
CL	清除率
Clinical Chemistry	血清生化檢驗
Clinical trial	臨床試驗 (人體)
C_{max}	最高血中濃度
Collagenase	膠原酶
Conditioned Avoidance Response	條件下迴避反應
Ctime	在特定時間的血中濃度。
Cytokines	細胞激素

Distribution	分佈
Dose escalation	劑量遞增
Dose ranging	劑量範圍尋找
Electroencephalogram	腦電波
Endogenous	內源性
Endogenous proteins extracted from human tissue	人體組織分離之內生性蛋白
Entero-hepatic circulation	腸肝循環
Excretion	排泄
Exposure	藥品曝露量
Eye irritation test	眼睛刺激性試驗
F	生體可用率
Fertility index	生育力指數
First-pass effect	首渡效應
Genotoxicity test	基因毒性試驗
Gestation Index	懷孕指數
Glomerular Filtration Rate (GFR)	腎小球過濾速率
Good Laboratory Practices (GLP)	非臨床試驗優良操作規範
Glycosylation	醣化作用
Growth factor	生長激素
Hematology	血液檢驗
Heparin	肝素
Hormones	荷爾蒙
In-house	廠內
In vitro mouse lymphoma tk assay	體外小鼠淋巴瘤 tk 分析法
Induction	誘發反應
International Conference on Harmonization (ICH)	國際醫藥法規協會會議
Investigational New Drug (IND)	試驗中新藥之申請
Isotope-labeled	同位素作標記
JMHW (Japan Ministry of Health and Welfare)	日本厚生省
MABEL (minimally anticipated biologic effect level)	最低期望生物效應水準
Mating index	交配指數

Maximum Tolerated Dose (MTD)	最高耐受劑量
Metabolic activation	代謝活化
Metabolism	代謝
Micro-dose	微劑量
Micronuclei in bone marrow cells of rodents	嚙齒類骨髓細胞之微核測試法
Micronuclei in peripheral blood of rodents	嚙齒類紅血球細胞之微核測試法
Monoclonal antibodies	單株抗體
MRT	平均滯留時間
Maximum Tolerated Dose (MTD)	最高耐受劑量
Mutagens	致突變劑
Necropsy	剖檢
New Drug Application (NDA)	新藥上市查驗登記
No Effect Dose Level (NOEL)	不產生影響之劑量
No Observed Adverse Effect Level (NOAEL)	不造成任何不良反應的劑量
Oligonucleotide drugs	寡核苷酸藥品
Ophthalmological examination	眼科檢查
Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)	經濟合作與發展組織
Pharmacodynamic (PD) study	藥效學試驗
Pharmacokinetic (PK) study	藥動學試驗
Photosensitization	感光過敏性
Plasma protein binding	血漿蛋白質結合
Plasminogen activator	血纖維分解原酶活化劑
Plate incorporation method	平板混合試驗法
Polychromatic erythrocytes	多染性紅血球
Polyploid	多套染色體
Primary cell	初代細胞
Preincubation method	前置培養法
Prothrombin	凝血酶原
Qualification	安全性評估試驗
Recalcification coagulation	加鈣後凝集時間

Recombinant blood plasma factors	基因重組血漿蛋白及凝血因子
Recombinant DNA protein vaccines	基因重組蛋白疫苗
Renal Plasma Flow (RPF)	腎臟血流量
Repeated dose toxicity test	重覆劑量毒性試驗
Reproductive and developmental toxicity test	生殖與發育毒性試驗
Reticulocytes	網狀紅血球
Revertants	逆突變的菌落或回復突變體
Single dose toxicity test	單一劑量毒性試驗
Skin irritation test	皮膚刺激性試驗
Skin photosensitization test	皮膚感光過敏性試驗
Skin sensitization test	皮膚過敏性試驗
Spontaneous Locomotor Activity	自發性活動力
Synergistic	協同作用
$t_{1/2}$	排除半衰期
Tissue homogenate	組織均質物
t_{max}	服藥後達到最高濃度的時間。
Urinalysis	尿液分析
V_d	分佈體積
Viability Index	存活指數
Weaning Index	離乳指數