

# 歐盟「非臨床重覆劑量毒性試驗法規指引」導讀

汪徽五<sup>1</sup>

## 前言

歐盟於 2010 年 9 月 1 日正式生效最新的「非臨床重覆劑量毒性試驗法規指引 (Guideline on repeated dose toxicity)」，依照最新的科學發展及外界建議，針對該指引的內容做部分修正更新。閱讀該指引時，必須和歐盟 2001/83 指令，以及所有適用的 ICH 和 CHMP 指引一併閱讀，才能獲得正確訊息。試驗動物飼養則須參照 86/609/EEC 動物福利法和保護脊椎動物歐洲公約(1999/575/EC)的規定。上述最新資訊可供國內相關新藥研發單位參考，以提早因應國際法規的更新。

為發展安全的重覆給藥醫藥產品，臨床前重覆給藥動物毒性試驗的主要目的是描述試驗藥物在重覆給予狀況下，對動物產生的毒理學影響。試驗包括查明潛在的毒性標靶器官和顯示暴露/反應關係，並包括觀察毒性作用是否具潛在的可逆性。所進行的毒性試驗將提供相關訊息作為申請人體臨床試驗和查驗登記審查的安全評估部分依據。

該指引提到，在毒性試驗進行前，需提供試驗物質的品質和賦型劑說明。試驗進行時需考慮到動物種類選擇、各組動物數目和動物飼養條件。應根據預定的臨床使用來訂定毒性試驗的劑量給藥方式、給藥期間和給藥途徑的選擇。該指引也提供試驗動物在試驗期間需進行監測的參數，以及具特殊活性藥品所需要的特定毒理試驗。並將需進行病理組織學試驗的組織清單附列於後。重覆劑量給藥的動物毒性試驗操作應符合優良實驗室操作規範 (Good laboratory practice, GLP) 的有關規定。該法規指引除了新增控制組動物要進行受試驗物質污染的監測外，關於實驗動物的一般操作建議則是與先前的相關法規雷同。包括試驗動物品種的選擇、劑量、給藥途徑和頻率等試驗設計，應根據現有的藥效學、藥物動力學和毒理學訊息，以及依預定的臨床使用來擬定試驗計劃，試驗執行單位也應說明選擇該試驗設計的理由。本指引也特別針對動物毒性試驗的試驗物質品質做進一步更新說明，若使用新賦型劑，需提供該新賦型劑的毒理與藥動資訊，必要時，需以活性物質連同賦型劑(s)的最終產品進行試驗。針對吸入性藥物，也有特殊的試驗設計建議。以下針對該法規指引內容，做進一步說明。

---

<sup>1</sup>財團法人醫藥品查驗中心基礎醫學組

## 新增有關試驗物質品質的建議

重覆劑量毒性試驗所使用的每一批物質都應作確認。廠商應提供每批試驗物質的理化特性和產品認證書，以及材料的安定性資料。此外，也應提供試驗物質在測試給藥劑型的安定性資料。使用在重覆劑量毒性試驗的試驗物質應提出類似用於人體(臨床試驗和上市)產品的雜質含量組成說明。如果上市藥品的雜質有顯著不同於動物測試批次，無論是品質還是含量方面，都需要進一步的確認(詳見雜質指引要點：新原料藥中的雜質指引要點 ICH Q3A(R2)，以及新藥品雜質指引要點 ICH Q3B(R2))。

若使用在製藥領域的新賦形劑，則應提供毒理學和藥物動力學的研究資料。原則上，應該執行針對新活性物質的樞紐性試驗。但在某些情況下，以最終產品的活性物質連同賦形劑(s)進行試驗，可能是必要的。

## 關於實驗動物的建議

在經常用於毒性試驗的常用實驗動物種類中，選擇動物品種時，應優先考量該動物的藥物動力學特性與人體具相似性，包括在生物體內的轉化(biotransformation)。若發現人體暴露的主要代謝物(s)，也應進一步確認。如果原型化合物不能用於毒性試驗時，應考慮改以代謝物(s)進行試驗。當治療的產品是前驅藥物時，應在所試驗的動物品種中確認可轉換為活性物質。所選的動物品種也應盡其所能，反應出試驗物質的主要藥效作用。在某些情況下，例如當藥理作用本身會造成毒性時，可能需要以疾病動物模型來進行毒理試驗。

一般情況下，應該使用數目相等的雄性和雌性動物。各組的動物數目大小應該足以讓產生的數據有實質意義的科學解釋。然而，考量倫理因素以及實際的可行性也很重要。以下幾點應列入試驗設計時的考量：

- 應在試驗的物種品系(species and strains)進行有關監測係數變異範圍的背景值收集，這會影響各組動物數目多寡的考量。
- 如果試驗進行期中將犧牲動物，則各組動物數目應大到足以允許在試驗結束前有足夠的動物來進行犧牲，而不會干擾到最後數據的統計分析。
- 如果增加恢復期設計，各組完成所有給藥的動物應留下足夠數目的動物，使可以評估在給藥結束後毒性變化的可逆性。

在一般情況下，重覆劑量毒性試驗應在二種哺乳動物進行，其中一種必須是非啮齒類動物。當有明顯合理性的依據時，使用一個物種是可以接受的。高標準的動物飼養是必要的，應加以控制動物飼養環境條件，整個試驗期間的食物飲水

都應該了解其質量和組成，這些條件應該和原始數據存儲在一起。

## 劑量和給藥方式的建議

劑量和給藥途徑的設計，應根據預期的臨床使用來選擇，試驗動物要暴露在足夠的試驗藥物和其代謝產物進行試驗為原則。設計試驗時，所有可用的資料都應予以考慮，包括試驗藥物的藥效學、藥物動力學和毒理學資料。

重覆劑量毒性試驗的持續時間取決於所提出的試驗藥物在人體治療的持續時間，並應符合進行人體臨床試驗和查驗登記藥品所需的非臨床安全性試驗規範的相關說明(ICH M3(R2))，以及慢毒性動物試驗期間指引(ICH S4B)。

一般來說，動物試驗之試驗藥物應該採用與人體相同的途徑來給藥。若是藥理、藥物動力學/毒理動力學和/或毒理學資料有合理的解釋，可以改以其他給藥途徑進行試驗。除了全身毒性評估，對給藥部位以及不同於預定給藥部位的影響，都應進行評估。

給藥頻率應根據個案的特性來決定，要同時考慮預期的臨床給藥方式以及試驗藥物的毒理學/藥物動力學/藥效學特性。在某些情況下，以比預期在臨床使用更頻繁的給藥頻率來進行動物試驗可能是較適當的。一般來說，給藥組應包括：

- 適當的對照組：在特殊情況下，可能需要陽性對照組，例如在具有特殊生物觀察指標的毒理學試驗時（如：遺傳毒性試驗，詳參閱 ICH S2 (R1)）；
- 低劑量組：劑量應足以產生藥理作用或預期的治療效果，或可導致預期在臨床使用的全身性暴露；
- 高劑量組：劑量的選擇需足以確認毒性標靶器官或其他非特异性毒性，或直到產生劑量或體積的給藥限制。除了 ICH M3(R2)規範中所討論的例外情況，齧齒類動物和非齧齒類動物的急性、亞慢性和慢毒性試驗的限制劑量通常為 1000 毫克/公斤/日，通常可適用於所有情況；
- 中劑量組：劑量選擇取介於高、低劑量間的幾何平均數。

理想情況下，在毒理試驗的高劑量組，動物全身暴露於藥物和/或主要代謝物應是明顯倍數於預期的臨床全身暴露。試驗藥物若藉由混入在飲食或飲水中給藥時，將需要定期調整試驗藥物在飲食或飲水中的量，以補償生長和消耗的變化。如果試驗過程中出現意外的毒性反應或缺乏反應時，可以機動調整各組給藥劑量。當試驗藥物是藉由吸入給藥，應確定所吸入的劑量。試驗應對控制組進行特別照護，以排除試驗化合物的污染（請見測試物質的污染檢查 (CPMP/SWP/1094/04)）。

## 試驗觀察的注意事項

對於齧齒類和非齧齒類動物，形態學、生化學和生理參數變異的試驗都可以應用歷史參考數據。在非齧齒類動物的案例中，應先從所使用的試驗動物中取得治療前觀測值。

在試驗過程中，食物攝取量、一般行為、體重、血液學、臨床生化學、尿液分析和眼科檢查都應當進行監測。應在非齧齒類動物進行心電圖記錄。上述各項參數的選擇應足以確認試驗藥物的毒性。參數監測時，要考慮到藥效/藥物動力學，在相關的時間點測定。除了最後一次觀察外，這些參數監測的進行頻率需允許可隨時間變化的評估。應根據當前最新的技術來選擇各種監測的方法。所選擇物種若僅使用少量的動物，則應在所有動物進行各項檢測。在齧齒類動物，可在每個劑量組的動物次群體進行特殊檢測。試驗期間的檢測也應在控制組動物進行。測試/採樣不應該同時執行，這可能會影響到試驗的結果和可靠性。若動物在試驗過程中死亡或進行期中犧牲，則應對死亡動物進行剖檢，必要時，也需進行顯微鏡病理檢查。

在重覆劑量毒性試驗中的試驗動物全身性暴露是解釋試驗結果不可或缺的訊息，特別是針對後續試驗設計和人體安全性評估。詳細監測說明請見毒理動力學指引要點（CPMP/ICH/384/95）。對照組動物的血液樣本分析應考慮檢測在試驗中未受試驗藥物污染下的全身性暴露（請見非臨床安全性試驗控制組樣本評估指引 CPMP/SWP/1094/04）。

應盡可能在試驗結束時觀察，所有試驗動物都必須進行剖檢。在非齧齒類動物，由於使用少量的動物，應該在各劑量組的所有動物進行表列器官和組織（附錄一）的組織病理學檢查。在齧齒類動物，應該在高劑量組和控制組動物中進行表列器官和組織（附錄一）的組織病理學檢查。低劑量組的織病理學檢查可能會僅限於剖檢時有發現外觀上病理變化的器官和組織。此外，如果在高劑量組動物發現病理變化，則應進一步檢查低劑量組動物的這些器官和/或組織，以釐清試驗藥物暴露/毒性反應關係。應當對生殖器官進行組織學檢查。睪丸和副睪的組織學評估可觀察對精子發生的影響。有關雄性生殖道評估可參照相關指引（對雄性的生育毒性 ICH S5B(M)）。

進一步的病理檢查，可能需要根據不同的試驗藥物而定。應從所有的動物製備骨髓抹片，但只在組織/器官或周邊血液中發現懷疑與治療相關的變化時，進行病理觀察。抹片病理檢查以目視評估細胞結構、分佈及形態，並評估髓細胞：紅血球的比例。在中樞神經系統藥物的案例中，除了列於附錄一的構造外，全身性組織病理學檢查應擴大到因為試驗物質受體結合特性或其他物質相關的藥效

學作用，而在給藥期間直接受到影響的標靶細胞或 CNS 區域。若結果顯示是特定的神經毒性，應進行進一步的試驗，以確認與評估功能的損害和影響。以呼吸途徑進行的毒性試驗中，所有動物的肺部應加以秤重，並針對所有暴露劑量的呼吸道和相關淋巴組織進行組織病理學檢查。如果試驗藥物預期有免疫影響，或在重覆劑量毒性試驗中有證據顯示具免疫激活或抑制活性，應按照人類藥品免疫毒性指引(ICH S8)探討該試驗物質的免疫毒性。試驗中，所有動物的所有組織(見附錄一)應當妥善保存，並製備蠟塊。這種試驗的材料應存檔，存檔位置應當記錄。

## 數據分析、結果呈現和結論

試驗報告應以充分和可靠的方式反映出在試驗的過程中所有收集的原始數據和資料。試驗結果應根據科學最新發展進行數據分析，包括相關的統計分析。結果應以清晰、簡明的方式呈現。各組的摘要值應該以反應變量分佈的形式呈現。所有記錄參數的個別值都應被附加到試驗報告後。最後，可基於此試驗結果而導出結論。儘管統計數字是分析數據的重要部分，也應根據生物學意義和合理性來解釋得到的結果和結論。

### 附錄一 在重覆給藥毒性試驗中，需要深入進行組織病理學研究的名單

Adrenal gland 腎上腺	Pancreas 胰臟
Aorta 主動脈	Parathyroid gland 副甲狀腺
Bone with bone marrow 骨與骨髓	Peripheral nerve 周邊神經
Brain 大腦	Pituitary 腦下垂體
Cecum 盲腸	Prostate 前列腺
Colon 大腸	Salivary gland 唾液腺
Duodenum 十二指腸	Seminal vesicle 貯精囊
Epididymis 副睪	Skeletal muscle 骨骼肌
Esophagus 食道	Skin 皮膚
Eye 眼	Spinal cord 脊髓
Gallbladder 膽囊	Spleen 脾
Harderian gland 哈氏腺	Stomach 胃
Heart 心	Testis 睪丸
Ileum 迴腸	Thymus 胸腺
Jejunum 空腸	Thyroid gland 甲狀腺
Kidney 腎	Trachea 氣管
Liver 肝	Urinary bladder 膀胱
Lung 肺	Uterus 子宮
Lymph node(s) 淋巴結節(s)	Vagina 陰道
Mammary gland 乳腺	Other organs or tissues with gross lesions 其他肉眼有病變的器官或組織
Ovary 卵巢	Tissue masses 組織塊

## 參考文獻

1. EMA Guideline on repeated dose toxicity. CPMP/SWP/1042/99 Rev1. (18 March 2010) <http://www.tga.gov.au/docs/pdf/euguide/swp/104209enrev1.pdf>
2. Guideline on repeated dose toxicity. CPMP/SWP/1042/99Rev1 Corr\*. (18 March 2010)  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/03/WC500079536.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf)
3. Overview of comments received on Guideline on repeated dose toxicity (CPMP/SWP/1042/99 Rev 1). EMA/402716.2088 Corr\*.(23 Sep. 2010)  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Other/2010/03/WC500079535.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2010/03/WC500079535.pdf)