

指导原则编号：

【	H	】	G	P	T	2	-	1
---	---	---	---	---	---	---	---	---

化学药物长期毒性试验 技术指导原则

二〇〇五年三月

目 录

一、概述	1
二、立题原则	2
三、基本原则	2
四、基本内容	3
五、结果分析和评价	7
六、结语	10
七、参考文献	10
八、附录	12
九、著者	14

化学药物长期毒性试验技术指导原则

一、概述

长期毒性试验（重复给药毒性试验）是药物非临床安全性评价的核心内容，它与急性毒性、生殖毒性以及致癌性等毒理学研究有着密切的联系，是药物从药学研究进入临床试验的重要环节。

在药物开发的过程中，长期毒性试验的目的是通过重复给药的动物试验表征受试物的毒性作用，预测其可能对人体产生的不良反应，降低临床试验受试者和药品上市后使用人群的用药风险。具体包括以下五个方面：①预测受试物可能引起的临床不良反应，包括不良反应的性质、程度、剂量—反应关系和时间—反应关系、可逆性等；②判断受试物反复给药的毒性靶器官或靶组织；③推测临床试验的起始剂量和重复用药的安全剂量范围；④提示临床试验中需重点监测的指标；⑤还可以为临床试验中的解毒或解救措施提供参考。必须强调的是，长期毒性试验的最终目的是为临床试验和临床用药服务。

本指导原则旨在为长期毒性试验提供技术参考，同时也希望能够对药品的技术审评工作提供帮助，促进药品审评机构与药品注册申请人之间就长期毒性试验达成更为广泛的共识。

本指导原则为化学药物长期毒性试验的一般性原则，仅代表目前对于长期毒性试验的基本认识，其中的内容不完全是进行药物长期毒性试验时必须完成的内容。具体药物的长期毒性试验应在本指导原则的基础上，根据药物的自身特点制订试验方案。

二、立题原则

药物开发的背景和基础研究资料各不相同,在进行长期毒性试验之前应对药物的已有资料进行综合分析,判断是否可以通过已有资料达到长期毒性试验的目的,为临床试验和临床用药提供支持。原则上,如果已有资料尚不能达到长期毒性试验的目的,从保证临床用药安全的角度就应该进行长期毒性试验;反之,则可以不必进行长期毒性试验。

三、基本原则

(一) 试验管理

根据《中华人民共和国药品管理法》的规定,药物的长期毒性试验必须执行《药物非临床研究质量管理规范》。

(二) 整体性

药物的开发是一个连续的、渐进的系统工程,长期毒性试验是药物开发的一个有机组成部分。长期毒性试验不能与药效学、药代动力学和其他毒理学研究割裂,试验设计应充分考虑其他药理毒理研究的试验设计和研究结果。长期毒性试验的结果应该力求与其他药理毒理试验结果互为印证、说明和补充。

(三) 具体问题具体分析

长期毒性试验的试验设计应该在对受试物的认知基础上,遵循“具体问题具体分析”的原则进行。试验设计应根据化合物的结构特点和理化性质、同类化合物在国内或国外的临床使用情况、临床适应证和用药人群、临床用药方案、相关的药效学、药代动力学和毒理学

研究信息等综合考虑。

(四) 随机、对照、重复

长期毒性试验的试验设计应遵循“随机、对照、重复”的原则。

四、基本内容

(一) 受试物

长期毒性试验应采用制备工艺稳定、符合临床试验用质量标准规定的样品。受试物应注明名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等，并附有研制单位的自检报告。所用辅料、溶媒等应注明批号、规格和生产厂家，并符合试验要求。

在药物开发的过程中，若受试物的制备工艺发生可能影响其安全性的变化，应进行相应的安全性研究。

(二) 实验动物

1、实验动物种属或品系的选择

一般化学药物的长期毒性试验采用两种实验动物，一种为啮齿类，另一种为非啮齿类。理想的动物应具有以下特点：①对受试物的生物转化与人体相近；②对受试物敏感；③已有大量历史对照数据。基于目前国内的现状，在大多数长期毒性试验开始时，尚无法判断不同种系实验动物和人体对受试物的生物转化的一致性，通常以大鼠和Beagle犬或猴作为长期毒性试验的实验动物。某些特殊结构的受试物应选用特殊种属或品系的动物进行长期毒性试验，必要时，也可选用疾病模型动物进行试验。鼓励在长期毒性试验前采用体外试验体系对实验动物的种属或品系进行筛选。

2、实验动物的质量控制

长期毒性试验一般选择正常、健康和未孕的动物，动物体重差异应在平均体重的 20%之内。动物应符合国家有关规定的等级要求，来源、品系、遗传背景清楚，并具有实验动物质量合格证。

应根据研究期限的长短和受试物临床应用的患者群确定动物的年龄。动物年龄应尽量一致，一般大鼠为 6~9 周龄，Beagle 犬为 6~12 月龄。

3、实验动物的性别和数量

一般情况下，长期毒性试验中每个试验组应使用相等数量的雌、雄动物。每组动物的数量应能够满足试验结果的分析 and 评价的需要。一般大鼠为雌、雄各 10~30 只，Beagle 犬或猴为雌、雄各 3~6 只。

(三) 给药方案

1、给药剂量

长期毒性试验一般至少设高、中、低三个剂量给药组和一个溶媒（或辅料）对照组，必要时还需设立空白对照组或阳性对照组。因为理论上群体中毒性反应的发生率随暴露量的增加而增加，所以高剂量原则上应使动物产生明显的毒性反应，甚至出现个别动物死亡。低剂量原则上应高于动物药效学试验的等效剂量，并不使动物出现毒性反应。为考察毒性反应剂量-反应关系，应在高剂量和低剂量之间设立中剂量。

2、给药途径

原则上应与临床用药途径一致，否则应说明原因。

3、给药频率

原则上长期毒性试验中动物应每天给药，给药期限长（3个月或以上）的药物每周至少应给药6天。特殊类型的受试物由于其毒性特点和临床给药方案等原因，应根据具体药物的特点设计给药频率。

4、给药期限

长期毒性试验的给药期限通常与拟定的临床疗程、临床适应证和用药人群有关。

临床单次用药的药物，给药期限为2周的长期毒性试验通常可支持其进行临床试验和生产。

临床疗程不超过2周的药物，给药期限为1个月的长期毒性试验通常可支持其进行临床试验和生产。

临床疗程超过2周的药物，可以在临床前一次性进行支持其进入III期临床试验（及生产）的长期毒性试验；也可以通过不同给药期限的长期毒性试验来分别支持其进入I期、II期或III期临床试验（及生产）。一般1个月的长期毒性试验可支持用药时间不超过2周的I期临床试验，其他情况详见附录（一）。

通过给药期限较短的毒性研究获得的信息，可以为给药期限较长的毒性研究设计提供给药剂量、给药频率等方面的参考；同时，临床试验中获得的信息有助于给药期限较长的动物毒性研究方案的设计，降低药物开发的风险。

以不同给药期限的长期毒性试验来分别支持药物进入I期、II期或III期临床试验（及生产）时，不同给药期限的长期毒性试验的内容应完

整、规范，对结果的分析评价应科学、合理。

（四）检测指标和检测时间

长期毒性试验必须检测的指标详见附录二。除必需的检测指标外，长期毒性试验应根据受试物的特点，有针对性地增加相应的检测指标。

试验前，啮齿类动物至少应进行 5 天的适应性观察，非啮齿类动物至少应驯养观察 1~2 周，应对实验动物进行外观体征、行为活动、摄食量和体重检查，非啮齿类动物还至少应进行 2 次体温、心电图、血液学和血液生化学指标等的检测。此外，实验动物相关指标的历史背景数据在长期毒性试验中也具有重要的参考意义。

试验期间，应对动物进行外观体征、行为活动、摄食量、体重、粪便性状、给药局部反应、血液学指标、血液生化学指标等的观测。非啮齿类动物还应进行体温、心电图、眼科检查和尿液分析。应根据试验周期的长短和受试物的特点确定检测时间和检测次数。原则上应尽早发现毒性反应，并反映出观测指标或参数的变化与给药期限的关系。

给药结束后，应对动物（除恢复期观察动物）进行全面的大体解剖，主要脏器应称重并计算脏器系数。组织病理学检查对判断动物的毒性靶器官或靶组织具有重要的意义，病理学检查报告应经检查者签名和病理检查单位盖章，如发现有异常变化，应附有相应的组织病理学照片。非啮齿类动物对照组和各给药组主要脏器组织均应进行组织病理学检查；啮齿类动物对照组和高剂量给药组动物，以及尸检异常者

应详细检查，如某一组织发生病理改变，其他剂量组动物该组织也应进行组织病理学检查。

长期毒性试验应在给药结束后对部分动物进行恢复期观察，以了解毒性反应的可逆程度和可能出现的延迟性毒性反应。应根据受试物的代谢动力学特点、靶器官或靶组织的毒性反应和恢复情况确定恢复期的长短。

（五）毒物代谢动力学

本指导原则中的毒物代谢动力学（简称毒代动力学）系指结合长期毒性试验进行的考察药物系统暴露的代谢动力学研究。毒代动力学可以描述实验动物的系统暴露与暴露剂量、暴露时间和毒理学结果之间的关系。本指导原则中毒代动力学研究的主要目的在于解释长期毒性试验的结果。

毒代动力学试验应选择合适的时间点采样测定，从而获得药时曲线下面积（ AUC ）、峰浓度（ C_{max} ）、达峰时间（ T_{max} ）等参数。某些药物应结合药物血浆蛋白结合率来评价系统暴露量。毒代动力学数据可以来自长期毒性试验的全部动物，也可以来自部分动物。建议此部分动物应包括低、中、高剂量组的动物，以便估算高剂量药物在动物体内的动力学过程是否属非线性动力学过程。

鼓励创新性药物进行毒代动力学研究。

五、结果分析和评价

长期毒性试验的最终目的在于预测人体可能出现的毒性反应。只有通过研究结果的科学分析和评价才能够清楚描述动物的毒性反应，

并推断其与人体的相关性。长期毒性试验结果的分析 and 评价是长期毒性试验的必要组成部分，必须对研究结果进行科学和全面的分析和评价。

（一）研究结果的分析

分析长期毒性试验结果的目的是判断动物是否发生毒性反应，描述毒性反应的性质和程度（包括毒性起始时间、程度、持续时间以及可逆性等）和靶器官，确定安全范围，并探讨可能的毒性作用机制。

1、正确理解试验数据的意义

在对长期毒性试验结果进行分析时，应正确理解均值数据和单个数据的意义。啮齿类动物长期毒性试验中组均值的意义通常大于单个动物数据的意义，实验室历史背景数据和文献数据可以为结果的分析提供参考。非啮齿类动物数量少、个体差异大，因此单个动物的试验数据往往具有重要的毒理学意义。此外，非啮齿类动物试验结果必须与给药前数据、对照组数据和实验室历史背景数据进行多重比较，文献数据参考价值有限。

在分析长期毒性试验结果时应综合考虑数据的统计学意义和生物学意义。正确利用统计学假设检验有助于确定试验结果的生物学意义，但具有统计学意义并不一定代表具有生物学意义。在判断生物学意义时应考虑到参数变化的剂量-反应关系、其他相关参数的改变，以及与历史背景数据的比较。

此外，在对长期毒性试验结果进行分析时，应对异常数据进行合理的解释。

2、正确判断毒性反应

给药组和对照组之间检测参数的差异可能来自于与受试物有关的毒性反应、动物对药物的适应性改变或正常的生理波动。在分析试验结果时，应关注参数变化的剂量—反应关系、组内动物的参数变化幅度和性别差异，同时综合考虑多项毒理学指标的检测结果，分析其中的关联和作用机制，以正确判断药物的毒性反应。单个参数的变化往往并不足以判断化合物是否引起毒性反应，可能需要进一步进行相关研究。此外毒代动力学研究可以为毒性反应和毒性靶器官或靶组织的判断提供重要的参考依据。

(二) 动物毒性反应对于临床试验的意义

将长期毒性试验结果外推至人体时，不可避免地会涉及到受试物在动物和人体内毒性反应之间的差异。首先，不同物种、同物种不同种属或个体之间对于某一受试物的毒性反应可能存在差异；其次，由于在长期毒性试验中通常采用较高的给药剂量，受试物可能在动物体内呈非线性动力学代谢过程，从而导致与人体无关的毒性反应；另外，长期毒性试验难以预测一些在人体中发生率较低的毒性反应或仅在小部分人群中出现的特异质反应；同时有些毒性反应目前在动物中难以检测，如头痛、头昏、头晕、腹胀、皮肤搔痒、视物模糊等。鉴于以上原因，动物长期毒性试验的结果一般不会完全再现于人体临床试验。但如果没有试验或文献依据证明受试物对动物的毒性反应与人体无关，在进行药物评价时必须首先假设人最为敏感，长期毒性试验中动物的毒性反应将会在临床试验中再现。

进行深入的作用机制研究将有助于判断动物和人体毒性反应的相关性。

（三）综合评价

长期毒性试验是药物非临床安全性研究的有机组成部分，是药物非临床毒理学研究中综合性最强、获得信息最多和对临床指导意义最大的一项毒理学研究。对其结果进行评价时，应结合受试物的药学特点，药效学、药代动力学和其他毒理学研究的结果，以及已取得的临床研究的结果，进行综合评价。对于长期毒性试验结果的评价最终应落实到受试物的临床不良反应、临床毒性靶器官或靶组织、安全范围、临床需重点检测的指标，以及必要的临床监护或解救措施。

六、结语

长期毒性试验的试验设计，以及对于结果的分析 and 评价都应围绕其目的而进行。通过长期毒性试验，应该能够对于受试物的临床不良反应、临床毒性靶器官或靶组织、安全范围、临床需重点检测的指标，以及必要的临床监护或解救措施做出合理的预测和判断。

七、参考文献

1、Michael A. Dorato and Melvin E. Andersen. The Toxicological Assessment of Pharmaceutical and Biotechnology Products. A. Wallace Hays. Principles and Methods of Toxicology. The Fourth Edition. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001. 243~283.

2、Nelson H. Wilson, Jerry F. Hardisty, *etal*. Short-Term, Subchronic, and Chronic Toxicology Studies. A. Wallace Hays. Principles and Methods

of Toxicology. The Fourth Edition. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001.
917~957.

3、化药药品重复给药毒性研究指导原则（试行）。国家药品监督管理局，2001.

4、Non-clinical safety studies for the conduct of human trials for pharmaceuticals. ICH/M3, 1997.

5、Duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non-rodent toxicity testing). ICH/S4, 1998.

6、Note for Guidance for Repeated Dose Toxicity. EMEA, 2000.

7、Carla L. Bregman , Rick R. Adler, Daniel G. Morton, *etal.* Recommended tissue list for histopathologic examination in repeat-dose toxicity and carcinogenicity studies: a proposal of the Society of Toxicologic Pathology (STP). *Toxicol. Pathol.* 2003, 31: 251~253.

8、Note for guidance on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies. ICH/S3A, 1994.

9、周宗灿. 毒理学基础. 第二版. 北京医科大学出版社, 2000. 第81页。

10、Harry Olson, Graham Betton, Denise Robinson, *etal.* Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and in Animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2000, 32: 56 – 67.

11、Curtis D. Klaassen. Casarett & Doull' s Toxicology: the basic science of poisons. The fifth Edition. United States of America: The

八、附录

(一) 长期毒性试验的给药期限

药物临床疗程	长期毒性试验给药期限		可以支持的临床试验阶段
	啮齿类动物	非啮齿类动物	
2周~1个月	1个月	1个月	II期
	3个月	3个月	III期（及生产）
≤3个月	3个月	3个月	II期
	6个月	6个月	III期（及生产）
≤6个月	6个月	6个月	II期
	6个月	9个月	III期（及生产）
>6个月	6个月	9个月	II期
	6个月	9个月	III期（及生产）

注 1：此表为分别支持临床疗程超过 2 周的药物进行 II 期和 III 期临床试验的长期毒性试验的给药期限。

注 2：表中长期毒性试验给药期限不包括恢复期。应根据具体情况设计恢复期（详见“检测指标和检测时间”部分）。

(二) 长期毒性试验中必须检测的指标

1、血液学指标

-
- 红细胞计数
 - 红细胞容积
 - 平均红细胞血红蛋白
 - 网织红细胞计数
 - 血小板计数
 - 血红蛋白
 - 平均红细胞容积
 - 平均红细胞血红蛋白浓度
 - 白细胞计数及其分类
 - 凝血酶原时间
-

2、血液生化指标

- 天门冬氨酸氨基转换酶
 - 碱性磷酸酶
 - 尿素氮
 - 总蛋白
 - 血糖
 - 总胆固醇
 - γ -谷氨酰转移酶（非啮齿类动物）
 - 氯离子浓度
 - 丙氨酸氨基转换酶
 - 肌酸磷酸激酶
 - 肌酐
 - 白蛋白
 - 总胆红素
 - 甘油三酯
 - 钾离子浓度
 - 钠离子浓度
-

3、尿液分析指标

- 尿液外观
 - pH 值
 - 尿蛋白
 - 尿胆原
 - 潜血
 - 比重
 - 尿糖
 - 尿胆红素
 - 酮体
 - 白细胞
-

4、组织病理学检查的脏器组织

长期毒性试验中需称重并计算脏器系数的器官：

- 脑
- 肝脏
- 肾上腺
- 脾脏
- 附睾
- 心脏
- 肾脏
- 胸腺
- 睾丸
- 卵巢

● 子宫

● 肺脏

长期毒性试验中需进行组织病理学检查的组织或器官：

- | | |
|-------------------------|--------------|
| ● 脑（大脑、小脑、脑干） | ● 脊髓（颈、胸、腰段） |
| ● 垂体 | ● 胸腺 |
| ● 甲状腺 | ● 甲状旁腺 |
| ● 食管 | ● 唾液腺 |
| ● 胃 | ● 小肠和大肠 |
| ● 肝脏 | ● 胆囊* |
| ● 肾脏 | ● 肾上腺 |
| ● 脾脏 | ● 胰腺 |
| ● 气管 | ● 肺 |
| ● 主动脉 | ● 心脏 |
| ● 附睾 | ● 睾丸 |
| ● 卵巢 | ● 子宫 |
| ● 前列腺 | ● 乳腺 |
| ● 坐骨神经 | ● 膀胱 |
| ● 眼（眼科检查发现异常时）* | ● 视神经* |
| ● 给药局部 | ● 骨髓 |
| ● 淋巴结（包括给药局部淋巴结、肠系膜淋巴结） | |
-

注：*为啮齿类动物可不进行组织病理学检查的组织或器官。

九、著者

《化学药物长期毒性试验技术指导原则》课题研究组