

ICH S5(R3) :

人體藥品之生殖與發育毒性檢測指引

**(Detection of Reproductive and Developmental
Toxicity for Human Pharmaceuticals)**

衛生福利部食品藥物管理署

中華民國 114 年 1 月

前言

國際醫藥法規協和會(International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH)於 2020 年發布 ICH S5(R3)(Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals)指引，針對 DART 相關試驗提出符合國際標準之建議。本文將說明各種用以補充現有資料並鑑別、評估、傳達藥品風險之可用策略與試驗設計。同時本文亦針對試驗資料之詮釋提出必要的整體性概念與建議。

目錄

簡稱列表	i
一、引言	1
(一)試驗目的	1
二、涵蓋範疇	2
三、生殖毒性試驗之一般性考量	2
(一)目標病人族群/療效適應症之考量	3
(二)藥理方面之考量	3
(三)毒性之考量	3
(四)時機之考量	4
(五)毒物動力學性質(toxicokinetics, TK)	4
四、哺乳類 <i>in vivo</i> 試驗之設計與評估	4
(一)生殖能力與胚胎早期發育(FEED)之評估策略	5
1.生物製劑之考量	5
(二)胚胎-胎兒發育(EFD)之評估策略	6
1.生物製劑之考量	6
2.評估 EFD 風險的替代性方法	7
I.替代性試驗的使用	7
3.推遲整合式試驗策略中決定性 <i>in vivo</i> 試驗之可能做法	7
(三)產前與產後發育(PPND)影響之評估策略	8
1.生物製劑之考量	8
五、試驗體系之選擇	8
(一)常用於測試之物種	8
1.DART 試驗所用物種之選擇	8
2.預防性與治療性疫苗所用物種之選	9
(二)較少用於測試之物種	9
(三)動物疾病模式、基因改造模式、替代分子藥品之使用	9
六、劑量選擇、給藥途徑和時程	10

(一)劑量選擇.....	10
1.毒性為基礎的指標.....	10
2.以全身性暴露飽和量為指標.....	11
3.以暴露臨界(exposure margin)為基礎之指標.....	11
I.適用於生物製劑之以暴露量為基礎的做法.....	11
4.以最高可能投予劑量為指標.....	12
5.以上限劑量為指標.....	12
6.較低劑量之選擇.....	12
(二)給藥途徑.....	12
(三)時程.....	12
(四)疫苗之劑量選擇與試驗設計.....	13
七、適用於齧齒類之組合式試驗設計.....	14
八、數據報告與統計分析.....	14
(一)數據報告.....	14
(二)統計分析.....	14
九、風險評估之原則.....	15
十、註釋.....	16
十一、名詞解釋(以下的定義僅限此指導原則所用).....	17
十二、參考文獻.....	19
附錄 1 <i>in vivo</i> 試驗設計.....	20
(一) <i>in vivo</i> 試驗設計之考量.....	25
1.生殖能力與胚胎早期發育(FEED)試驗.....	25
2.胚胎-胎兒發育(EFD)毒性試驗.....	28
I.劑量範圍探索胚胎-胎兒發育毒性試驗.....	28
II.初步胚胎-胎兒發育(pEFD)毒性試驗.....	28
III.決定性胚胎-胎兒發育毒性試驗.....	28
3.產前與產後發育(PPND)毒性試驗.....	31
I.非人屬靈長類(NHP)之加強型產前與產後發育(ePPND)毒性試驗.....	33
4.組合式試驗設計.....	34

I.FEED 與 EFD.....	34
II.雄性生殖能力與重複劑量毒性試驗.....	34
附錄 2 替代性試驗.....	35
(一)預測 MEFL 之替代性試驗的驗證.....	35
(二)採用替代性試驗之 EFD 試驗策略範例.....	37
1.將替代性試驗納入整合性試驗策略以推遲 <i>in vivo</i> 試驗之可行做法.....	37
2.預期對胚胎-胎兒具毒性之藥品.....	37
3.針對令病人極度衰弱或有生命危險(SDLT)之特定疾病的藥品.....	39
4.針對老年才發作(LLO)的疾病之藥品.....	39
縮寫列表.....	41

簡稱列表

AUC：曲線下面積

C_{\max} ：最大血漿濃度

C_{\min} ：最小血漿濃度

DART：發育與生殖毒性

DRF：劑量範圍找尋

EFD：胚胎胎兒發育

ePPND：強化出生前後發育的

FEED：生育力與胚胎早期發育的

GD：孕期天數

GI：胃腸的

GLP：藥品非臨床試驗優良操作規範

ICH：國際醫藥法規協和會

IV：靜脈內的

LOAEL：最低明顯反應劑量

LLO：晚年發病

MOA：作用機制

MEFL：畸形或胚胎胎兒致死性

MFD：最高可投與劑量

MRHD：人體建議最高劑量

NHP：非人靈長類

NOAEL：無明顯不良反應劑量

PD：藥效學

pEFD：初步胚胎胎兒發育

PK：藥物動力學

PND：出生後天數

PPND：出生前後發育

SDLT：嚴重衰弱或危害生命

TK：毒物動力學

WOCBP：具生育力之女性

ICH S5(R3)：人體藥品之生殖及發育毒性檢測

一、 引言

藥品欲進行人體臨床試驗與申請上市許可時須提交發育與生殖毒性 (developmental and reproductive toxicity, DART) 之非臨床評估結果。本指導原則之目的即針對 DART 相關試驗提出符合國際標準之建議。本文將說明各種用以補充現有資料並鑑別、評估、傳達藥品風險之可用策略與試驗設計。同時本文亦針對試驗資料之詮釋提出必要的整體性概念與建議。

本指導原則係基於國際醫藥法規協和會於 2020 年公布之 ICH S5(R3) 所撰寫，ICH S5(R3) 係對於 1993 年公布之醫藥產品生殖毒性試驗規範 (ICH guideline S5 Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products) 加以修正，以便與其他 ICH 規範銜接。ICH S5(R3) 擴充了使用暴露量來選擇試驗劑量之方法，增加風險評估專章，並將疫苗與生物製劑納入範疇之中。此外，ICH S5(R3) 說明了替代性試驗方法之驗證與使用的情況，並提供推遲發育毒性試驗之選項。

評估人用藥品對生殖與發育功能之影響時，一般須備齊可評估暴露於該藥品下可能遭受衝擊之資料。必要時，亦須提出該藥品代謝物對於所有發育與生殖階段產生之影響。沒有任何一份準則能涵蓋所有的可能性，故試驗策略得視需要彈性調整。

(一) 試驗目的

DART 試驗之目的在於發現藥品對哺乳類生殖之影響，以進行人體風險之評估。若條件合適，所採行之各式試驗需包含完整生命週期 (自一特定世代受孕開始，於次世代受孕終了) 之觀察結果，且需能發現立即不良影響與潛在不良影響。一般而言，需進行試驗之生殖階段如下：

- A) 交配前至受孕 (成年雄性與雌性之生殖功能、配子之發育與成熟程度、交配行為、受精作用)
- B) 受孕至著床 (成年雌性之生殖功能、著床前發育、著床)
- C) 著床至硬顎閉合 (成年雌性之生殖功能、胚胎發育、主要器官成形)
- D) 硬顎閉合至懷孕期終了 (成年雌性之生殖功能、胎兒發育與成長、器官發育與成長)
- E) 出生至斷奶 (分娩與泌乳、新生兒適應子宮外環境、斷奶前之發育與成長)
- F) 斷奶至性成熟 (斷奶後之發育與成長、適應獨立生活、進入青春期末至完全性成熟)

熟、對次世代之影響)

除非該階段與目標藥品所針對的使用對象無關，原則上每個階段所面臨的風險均應進行評估。試驗委託人得自行判斷個別試驗所需涵蓋之階段，但在藥品開發過程中，何時進行試驗應視其試驗對象與藥品開發階段而定(參閱 ICH M3、ICH S6 與 ICH S9 (3))。

二、 涵蓋範疇

此指導原則適用於所有藥品，含生物製劑與針對傳染性疾病之疫苗(及其新組成成份)，以及構成最終產品之新賦形劑。在本指導原則中，藥品一詞泛指前述所有治療模式。此指導原則不適用於細胞治療、基因治療、組織工程之產品。本文所列有關方法學之原則(例如試驗設計、劑量選擇、物種選擇等)適用於一切適合進行生殖毒性及/或發育毒性試驗之化合物。此指導原則應與 ICH M3、ICH S6、ICH S9 合併考量，以決定是否進行非臨床 DART 試驗以及進行該類試驗之時機。

三、 生殖毒性試驗之一般性考量

開發中的藥品多數需要依前文所列各生殖週期階段進行試驗，但如下文所示可能有例外存在，此時須提出合理性說明。為配合新藥之臨床研發，生殖週期各階段一般以三種 *in vivo* 方式進行試驗：

- 1) 生殖能力與胚胎早期發育(fertility and early embryonic development, FEED)試驗-A 與 B 階段；
- 2) 兩個物種的胚胎-胎兒發育(embryo-fetal development, EFD)試驗(亦常稱為致畸胎試驗)-C 與 D 階段；
- 3) 產前與產後發育(pre- and postnatal development, PPND)試驗-C 階段至 F 階段。

每一項化合物均應訂出需進行評估的生殖發育階段與最合宜的試驗方式。制定整體試驗策略評估藥品對生殖與發育之影響時，應考量的關鍵因素有：

- 使用對象(病人)與使用條件(尤其是與生殖能力和疾病嚴重程度有關者)。
- 藥品的配方與施用於人體時的給藥途徑。
- 相關之毒性資料(可含 *in vitro*、*ex vivo*、非哺乳類研究之數據，以及結構-活性關係)、藥物動力學、藥效動力學等方面之相關數據，以及與其他藥品之藥理相似性的資料。
- 藥品作用標靶的一般生物學特質，或作用標靶已知在生殖與發育學上所扮演的角色。

在不損及整體評估結果的前提下，試驗的策略應盡量避免使用實驗動物。達成動物減量目標的作法包括整合常用試驗類型(見第 7 節)，並且使用經過適當驗證之替代性試驗進行風險評估(見附錄 2)。由於許多臨床研究計畫均在第三期前即告終止，所以依據 ICH M3 選擇適當的試驗與進行中臨床計畫的時程相配合(例如以胚胎-胎兒發育階段之毒性數據協助招募具生育能力之女性)，亦可減少實驗動物之用量。

整體來說，DART 試驗應遵循優良實驗室操作規範(Good Laboratory Practice, GLP)才能做為風險評估之用。然而，若某項相關 DART 風險評估已被未遵循 GLP 試驗(non-GLP study)所證實，在符合 GLP 條件下重複進行該試驗以確認試驗結果並非必要之舉。所謂相關風險係指該藥品達到或接近臨床暴露量時所發生的風險，可合理認定其影響也可能發生於人類身上者(見第 9 節)。雖然因為採用特殊試驗系統或方法的緣故，某些特定類型的試驗或試驗的特定部分難以依循 GLP 規範，但是仍須以科學性的高標準進行這些試驗，並應能隨時提供所蒐集資料之相關紀錄，在試驗報告應列出未依循 GLP 規範之處，並由整體安全性的觀點評估未依循 GLP 規範是否影響其成果/數據之分析。

(一) 目標病人族群/療效適應症之考量

需考量目標病人族群與適應症可影響 DART 試驗的程度及範圍，若藥品的 DART 對目標族群造成影響的風險微乎其微，則無須對所有的生殖與發育階段進行試驗。例如，若目標族群是已停經的女性病人，或兒童與青春期前之少年，或因住院中而排除懷孕可能的病人族群，則未必需要對所有的生殖與發育階段都進行試驗。

(二) 藥理方面之考量

設計試驗策略之前，應該先確認該藥品之藥理作用是否已知會與生殖能力、正常 EFD，或特定指標(如全身麻醉或交合行為之評估)的分析產生衝突。前述評估可以依據有相似藥理性質的其他藥品數據、目標藥效的已知影響、或相關之人類遺傳疾病的相關知識為基礎。例如，若藥品的開發目的為防止早產，則修改 PPND 的試驗設計即為合理之舉。若藥品之藥理作用與試驗之評估指標產生衝突，可以在有正當理由下，不對特定生殖能力指標進行檢測。

(三) 毒性之考量

以性成熟動物所進行的重複劑量毒性試驗可以提供藥品對於生殖器官的重要毒性資料，進而影響 DART 試驗設計。DART 試驗設計必須參考該藥品的既有

毒性資料，將劑量、毒物動力學特性以及給藥間隔等納入考量。例如，針對影響睪丸組織的化合物，可修正其標準生殖能力試驗之設計，以改變其給藥間隔或雌雄同籠的起始時間。

(四) 時機之考量

ICH M3、ICH S6、ICH S9 對於分析生殖與發育指標的試驗時機已有提出一般性的指引。決定何時進行特定 DART 試驗之前，應考量該特定試驗所產出的數據是否為支持該藥品安全應用於臨床試驗或目標病人族群所必須。因此，必要時可改變評估特定生殖階段的時機。

(五) 毒物動力學性質(toxicokinetics, TK)

藥品暴露量的數據可透過生殖毒性試驗[包含劑量範圍(dose range finding, DRF)試驗或樞紐試驗]或重複劑量毒性試驗取得。但是，考量到 TK 參數可能會因為懷孕而產生有意義的變化，建議先確認懷孕是否會改變暴露量。若試驗劑量是以暴露量比率為選擇基礎，則應提出符合 GLP 規範的懷孕動物 TK 數據，並須說明採血日期的合理性。

若對於發育危害出現證據不一致或不夠明確，必要時，可透過測量胚胎或胎兒體內的藥品濃度來幫助解讀試驗結果。這些數據可以在獨立的試驗中蒐集，以確定實際的暴露量。然而，不宜將所得數據直接用以推測人類胎體中的可能濃度。

必要時，可藉由乳汁採樣或測量子代在斷奶前體內的暴露量來取得藥品經乳汁泌出的證據。

四、 哺乳類 *in vivo* 試驗之設計與評估

評估一項藥品在生殖與發育方面可能造成的風險時，所採用的策略一般會包括一或多項的 *in vivo* 試驗。重點在於所做的試驗必須確保各生殖發育階段之間沒有留下空隙，可以完整評估整個生殖過程的所有階段。然而，在某些物種身上是難以做到對所有階段的完整評估，例如非人類靈長類(non-human primate, NHP)即是一例。對大多數的藥品而言，採用三階段試驗(FEED、EFD 及 PPND)的設計通常已足夠，而且各種試驗設計還可以進一步組合，以符合產品的特殊需求以及減少實驗動物的使用。關於 FEED、EFD 和 PPND 等試驗以及其組合的相關細節，可參閱附錄 1。試驗委託人可自行決定各項試驗所涵蓋的階段，惟在決定應採何種試驗設計時，應將該藥品所有可取得之藥理學、毒物動力學、毒理學相關數據皆納入考量。

(一) 生殖能力與胚胎早期發育(FEED)之評估策略

FEED 試驗之目的在於測定不良影響是否於雄性及/或雌性交配前即因給藥而產生，且持續至交配與著床階段。因此，須評估生殖過程的 A、B 兩階段。雖然短週期的毒性試驗往往不足以揭露所有的不良影響，但透過持續至少兩週的重複劑量毒性試驗所取得之結果，通常即足以用來設計生殖能力試驗，毋需進一步作劑量範圍試驗。

若需進行 FEED 試驗以支持目標族群暴露於該藥品的安全性時，大多數情況須包含交配階段，此類試驗通常係以嚙齒類動物進行。若不預期藥品對生殖能力造成不良影響，則同一試驗中可以將藥品施用於雌雄兩性身上並令其同居。若該試驗發現藥品對於生殖能力有不良影響，則應進一步確認雌雄兩性究竟是哪一方受到影響。反之，若基於藥品作用模式或重複劑量毒性試驗結果而預期會對生殖能力造成不良影響，則給藥的雌雄兩性均只能與未給藥的異性同居。這點可以透過在同一 FEED 試驗中區分不同的實驗組，或進行兩個獨立的 FEED 試驗來達成。不良影響的可逆性對於生殖能力與早期胚胎發育的風險評估極為重要。

雌性嚙齒類的 FEED 試驗設計(見附錄 1)可用於偵測藥品對發情週期、受精卵輸卵管傳輸、著床以及胚胎著床前發育等作用。評估發情/月經週期時，務必取得週期的基線數據(2-3 個週期)，以區分給藥造成的影響與動物個體之間/內在的差異造成的影響。對發情期的週期性監測必須在確認交配期間持續進行。

對雄性嚙齒類採用同居前給藥 2-4 週的 FEED 試驗設計可以偵測藥品對精子生成與副睪運輸的影響。若重複劑量毒性試驗的結果顯示藥品對睪丸具有毒性，可適當將同居前的給藥期延長至 10 週，此舉有助於評估藥品對完整精子生成週期與副睪運輸之影響。此外，FEED 試驗亦能偵測到對雄性生殖器官進行組織病理檢查時難以發現的功能性影響，如性慾、副睪中精液成熟過程和射精等。

若對藥品作用模式或前述試驗的結果有所顧慮，則可在重複劑量毒性試驗及/或生殖能力試驗中增添額外的檢查項目(如採集精液計算精子數量與進行精子形態學/運動能力評估、測量賀爾蒙濃度、監測發情/月經週期等)，以進一步確認藥品對生殖能力的潛在影響。

1. 生物製劑之考量

若檢測之生物製劑在嚙齒類或兔類身上呈現藥理活性，則建議於此類物種中擇一進行 FEED 試驗。使用非嚙齒類的動物(如犬類與 NHP)評估交配行為往往不可行，例如，若 NHP 是對某些生物製劑(如許多單株抗體)唯一具有藥理相關性的物種，則對 NHP 進行重複劑量毒性試驗為期 3 個月以上的生殖器官組織作組織病

理檢查，可作為取代生殖能力評估的方案，這樣的做法應針對雌雄兩性的生殖器官進行詳細的組織病理檢查(註 1)。此外，所用之實驗動物須在試驗開始前已達性成熟，以便對其生殖器官/組織做出適當評估，除非該生物製劑係以治療晚期癌症為目標(可不需進行 FEED 試驗)。然而，上述評估方式所取得之數據僅能提供生殖器官在組織結構方面的訊息，並無法對生殖能力進行功能性的評估，所以僅以組織病理檢查的結果未必能充分預測生物製劑對 FEED 之影響。

(二) 胚胎 - 胎兒發育(EFD)之評估策略

EFD 試驗之目的在於探討當懷孕母體在胚胎形成時期接受給藥(C 階段)後，藥品對於 EFD 和懷孕動物的不良影響。EFD 試驗須包括對胚胎發育與存活(縱貫 C、D 階段)方面所作的評估。

對多數小分子藥品而言，一般係以兩個物種，即齧齒類與非齧齒類(通常為兔類)動物來進行 EFD 評估，兩個物種中至少要有一方呈現期望的藥效學反應。若該藥品在任何常用的物種(見 5.1 節)均未呈現藥效反應，則應考慮改以較少用的物種(見 5.2 節)或基因改造動物，或使用針對特定物種的替代分子藥品(見 5.3 節)(如寡核苷酸)，前提是這些模式已作過充足的特性分析能確保其藥理方面的相關性。一般而言，基因改造動物與替代分子藥品在危害辨識最為有效，但在運用於風險評估時卻有其局限。即使沒有相關的動物模式(例如藥效的目標均僅存於正常或罹病人體中)，仍應以兩個物種來進行 EFD 試驗，以偵測脫靶效應或次級藥理方面的不良影響。

只要有一個物種在相當於人類最高建議劑量(maximum recommended human dose, MRHD)的暴露量下，即會造成明顯的畸胎或胚胎-胎兒致死(malformations or embryo-fetal lethality, MEFL)，此種陽性結果即足以應用在風險評估之目的。

在某些特殊情況下亦可採用其他方法取代確認性 EFD 試驗(見附錄 2)，若有足夠的資料進行風險溝通，亦可以省略 EFD 試驗。目標藥品的藥理機制對 EFD 具有不良影響的證據(如作用機制、取自基因改造動物之表現型數據等)，即足以達成風險溝通之目的。

1. 生物製劑之考量

若有兩個物種(齧齒類與非齧齒類)對於生物製劑具有藥理相關反應，一般應以兩個物種(齧齒類與非齧齒類各一)評估該生物製劑對 EFD 之影響。然而，當齧齒類對此生物製劑不具藥理相關反應，可以只用一個非齧齒類(藥理相關物種)進行 EFD 試驗。若 NHP 為唯一藥理相關物種，則可以使用加強型的 PPND(ePPND)試驗來取代 EFD 試驗(見附錄 1)。針對癌症晚期所使用的生物製劑通常僅需以一個藥

理相關物種進行評估即可(見 ICH S9)。

若該生物製劑不會跟任何生殖毒性測試物種體內的同源標靶反應，因而無法找到藥理相關物種時，可考慮採用 ICH S6 所述之替代分子藥品或基因轉殖模式。以替代分子藥品的結果計算人體暴露量的安全係數並非合適的做法。若是藥理相關物種、基因改造動物或是替代分子藥品均不可得，則進行 *in vivo* 生殖毒性試驗並不具意義，在這種情形之下，均需對風險評估所採用的方法或是決定不進行試驗的原因提供合理的說明。

2. 評估EFD 風險的替代性方法

I. 替代性試驗的使用

目前已有數種替代性之 *in vitro*、*ex vivo*、以及非哺乳類 *in vivo* 試驗方法(以下以「替代性試驗」稱之)可用來檢測藥品對 EFD 所可能造成的危害。這些替代性試驗已經應用於探索或篩選具有 EFD 不良反應的藥品，也可用來探討毒性的作用機制。這些應用對於使用非臨床數據以推估藥品對人體的風險(尤其當目標僅限於人類時)頗有助益，因此運用替代性試驗於上述用途是值得鼓勵推廣的做法。

若通過適當的驗證，替代性試驗可以推遲傳統 *in vivo* 試驗的進行時機，甚至在特定情況下可取而代之，此舉有助於減少實驗動物的使用。關於驗證替代性試驗所應考量的觀念，以及適當使用替代性試驗的實例，可參閱附錄 2。欲將替代性試驗整合入試驗程序者，必須能提供至少與前文所述之現行試驗規範同等信賴程度之人身安全保障。基於編纂本指導原則時的科學發展走向，可以預見為了符合法規要求，多種替代性試驗將被應用在層級式(tiered)或組合式(battery)的評估程序(例如，附錄圖一及圖二的層級式評估程序，或下文所述之一物種替代性試驗搭配第二物種 pEFD 的組合式評估程序)。這些試驗策略須依特定的使用情境進行驗證，而使用情境係依所採用試驗方法之化學適用範圍，以及該試驗方法所涵蓋之生物學機制的特性而定。

3. 推遲整合式試驗策略中決定性 *in vivo* 試驗之可能做法

設計適當的試驗策略須依賴累積性證據權重法則。ICH M3 允許在進行決定性 EFD 試驗之前，使用兩個物種的初步胚胎-胎兒發育(preliminary embryo-fetal development, pEFD)毒性數據，做為在臨床試驗中限量收納具生育能力之女性(women of childbearing potential, WOCBP)(至多 150 名且最長為期 3 個月)的考量依據。基於這些條件，為了支持在第三期臨床試驗前納入 WOCBP，本指導原則以 ICH M3 為本，新增以下兩種方案：

1) 利用能預測單一物種試驗結果且經驗證的替代性試驗(見附錄 2)，並且搭配第

二個物種之 pEFD 試驗，就足以支持在臨床試驗中有限度地收納 WOCBP(至多 150 名且最長為期 3 個月)。一般而言，此替代性試驗與第二個物種 pEFD 試驗應包含齧齒類與非齧齒類各一。

- 2) 如果將額外的評估指標整合入至少一個利用藥理相關物種所進行之 GLP pEFD 試驗(亦即特定增加待評估幼仔的數目，並且包括骨骼檢查)之中，並搭配第二個物種所進行之 pEFD 試驗，則可允許第二期臨床試驗(含)前無限額地收納 WOCBP。

(三) 產前與產後發育(PPND)影響之評估策略

PPND 試驗之目的在於偵測懷孕母獸暴露在目標藥品下，是否會在胚胎著床至產後斷奶這段期間產生不良影響，進而評估該藥品對懷孕或泌乳中的母獸，以及對其子代發育所產生之作用，考量到此一期間受到影響而產生的表徵可能會延後顯現，須持續追蹤子代發育至性成熟期(即 C 至 F 階段)。PPND 試驗一般係使用齧齒類，然而在適當情況下亦可使用其他物種(見附錄 1)。

在多數情形下，可無需進行初步(劑量範圍探索)PPND 試驗，因為前述的試驗數據通常已提供足夠的資訊。但是，在斷奶前或斷奶期犧牲幼獸的初步 PPND 試驗可用以選擇劑量或是供試驗設計做為參考，並/或提供幼獸暴露量的數據。若考量以改良式 PPND/ePPND 試驗協助探討小兒發育，可參閱 ICH S11(5)。

1. 生物製劑之考量

對於只能以 NHP 進行試驗的生物製劑，由於追蹤子代至成熟期通常並不可行，ePPND 試驗只能有限度的評估產後發生的影響(見附錄 1 與 ICH S6)。

五、 試驗體系之選擇

(一) 常用於測試之物種

DART 試驗應以哺乳類物種進行之。使用原本已經完成毒性試驗之相同物種與品系，可避免採用額外的實驗動物或試驗來探討藥物動力學、代謝特性及/或進行劑量範圍探索。所採用的物種必須已有充分的特性分析，而且與所作試驗欲評估之指標與效果相關(例如健康狀態、生殖能力、潛在生殖能力、背景畸胎率與死胎率等)。

1. DART 試驗所用物種之選擇

大鼠通常適用於 DART 試驗，亦是最常使用的齧齒類物種，因為考量其實用性、對其藥理特性的廣泛瞭解、可用以解讀非臨床毒性試驗結果的全面性毒理資料，以及大量歷史背景值資料等因素。此外，小鼠亦是常用的齧齒類物種，其使用原因多與大鼠雷同。

通常只有在評估 EFD 時會需要非齧齒類的第二哺乳類物種，但也有例外(例如疫苗與生物製劑)。兔類試驗已知能檢測出在齧齒類試驗中未能檢出的人類致畸物，由於其詳盡的歷史背景資料、可得性、和實用性等因素亦使兔類成為常用的非齧齒類物種。

2. 預防性與治療性疫苗所用物種之選

用於評估疫苗(無論有無佐劑)的動物物種須能展現出對於該疫苗的免疫反應。基於所觀察到的免疫反應及施予劑量的合適與否，說明擬進行的發育毒性試驗類型及所選動物模式的合理性。一般而言，疫苗之發育毒性試驗通常會使用兔類，大鼠或小鼠。即便各物種可能存有性質上或數量上的反應差異(如體液免疫與細胞免疫指標)，發育毒性試驗通常僅需使用單一物種即可。雖然各物種由母體透過胎盤傳遞抗體的程度與時間有所差異，以免類、大鼠或小鼠進行之發育毒性試驗仍然能提供該疫苗之成分/配方潛在的胚胎-胎兒毒性與懷孕期安全性的重要資訊。僅於其他物種均無法展現出免疫反應時，才建議使用 NHP。

若缺乏適當的動物模式(含 NHP)，以免類、大鼠或小鼠所作之 EFD 毒性試驗仍能針對該疫苗之成分/配方可能具有的胚胎-胎兒毒性與懷孕期安全性提供重要資訊。

(二) 較少用於測試之物種

除了兔類、大鼠或小鼠，其他物種亦可用於評估藥品對各生殖階段的影響。在考慮使用其他物種時，應就擬測試之藥品、試驗設計與評估指標、以及能否將試驗結果推論至人體等層面，來評估該物種的優缺點(列於附錄 1 之表 1)。

NHP 應歸類為非常態使用之測試物種。如 ICH S6 所述，牠們多半被用於評估僅對靈長類具藥理活性之生物藥品在 EFD 與產後早期發育的影響。然而，尚有其他考量因素會限制 NHP 在 DART 風險評估試驗中某些指標的應用(見附錄 1 與 ICH S6)。

(三) 動物疾病模式、基因改造模式、替代分子藥品之使用

動物疾病模式、基因改造模式，以及替代分子藥品對於探討預期之藥理作用在生殖與發育方面的影響極有價值。當收集自健康動物的數據造成誤導或不適用於臨床上疾病狀況時，以疾病模式進行的試驗更顯出其價值性，該疾病模式必須具有藥理相關性並可適用於待分析的發育及生殖指標。應先剖析該疾病模式在病程中的病理生理學特性，即使該疾病模式與人體的病理生理學特性有些許差異，只要這些差異不干擾數據解讀，便無須以此為由排除該疾病模式的使用，此外應該在試驗中對於動物與動物之間的差異性進行特性描述。若控制組的歷史數據有限，為幫助數據判讀，應另行備妥試驗指標的參考數據或直接於試驗中產生參考數據。

基因改造模式可透過永久性或條件性地改變標靶活性，進而探討藥品作用於標靶時對於 DART 參數產生的作用，此種基因改造模式可顯示標靶的生物特性是否與常用試驗物種在生殖與發育方面的不良反應間有緊密關連。

若試驗之藥品對常用試驗物種的體內標靶不具有適當的活性，可改用替代分子藥品來分析可能對生殖與發育帶來的不良影響。

六、劑量選擇、給藥途徑和時程

劑量選擇、給藥途徑和時程都是試驗設計中極為重要的因素，且應以所有可取得的資訊做為基礎，例如藥理特性、重複劑量毒性、藥物動力學特性以及劑量範圍探索試驗等。關於小分子藥品與生物製劑的劑量選擇原則可分別參閱 ICH M3 與 ICH S6。若是在試驗體系中無法得到足夠的耐受性資料，建議可先進行劑量範圍探索試驗。

(一) 劑量選擇

在進行 DART 試驗時有數個可使用的劑量選擇指標，從試驗設計的觀點來看，本節所討論的每個劑量選擇指標都具有同樣的合適性。在決定性試驗中所用的高劑量應符合下文所示的單一或多項概念，選擇的劑量應以過去試驗(如重複劑量、TK、DRF 等)的數據觀察為考量，有時少於三種劑量即足以提供風險評估所需的資訊。若所選用的高劑量未使用下文所述的指標，則應以個案為基礎說明其合理性。

1. 毒性為基礎的指標

此指標係以高劑量時在親代動物引發微量毒性為基礎，依據先前試驗結果所

決定之高劑量的限制性因素應包括但不限於以下數點：

- 體重變化(體重增幅或體重絕對值;減少或增加)。不宜以體重增幅或體重的細微短暫變化作為選擇劑量的標準。評估體重變化的影響時，應以該試驗完整給藥期間的體重值做整體考量。
- 過度的藥理反應，例如過多的鎮靜效果或低血糖。
- 毒理學反應(如抽搐、過度的胚胎-胎兒致死性、臨床病理檢驗值的變動等)。在預定的DART試驗期間會干擾試驗指標的特定標靶器官毒性。

2. 以全身性暴露飽和量為指標

達到全身性暴露之飽和量也是用來選擇高劑量的一種適當做法，其中應以試驗藥品相關物質的全身性可利用率來評估暴露量是否達到飽和。若無法再提升原型藥或其代謝物在血漿中的濃度，則無須再提高給藥劑量。

3. 以暴露臨界(exposure margin)為基礎之指標

以相對於最大建議人類用量(MRHD)去預測暴露臨界，也是選擇給藥劑量的一種適當做法。對於小分子藥品，若採用的全身性暴露量係依據 MRHD 而選擇數倍於 AUC 或 C_{max} 值，則可以此全身性暴露量做為高劑量選擇的合適指標。此外，若給藥劑量可使懷孕動物的暴露量達到 MRHD 暴露量的 25 倍以上，則此劑量一般可以做為 DART 試驗的最高劑量(註 2)，此 25 倍暴露臨界值則應建立在以原型藥的濃度進行符合 GLP 規範的 DRF/pEFD 或決定性試驗，但亦應考量原型藥在人體的主要代謝物是否也能達到合適的暴露臨界(見 ICH M3 與 ICH M3 問答集)。在前驅藥品(prodrug)的試驗中，尤其當實驗動物體內的活性代謝物及前驅藥比例較人類為低時，較適當的做法是以活性代謝物來決定暴露量的倍數。至於選用何者(原型藥或代謝物)來比較暴露量則應予以說明其理由。

對於只有在比 MRHD 暴露量高 25 倍以上才能在實驗動物體內顯現藥效動力活性的藥品而言，可以採用更高的給藥劑量以利評估藥理反應增強後的不良影響，但是也可能同時增加無關的脫靶效應。

以暴露量為基礎選擇 EFD 試驗劑量時，應由符合 GLP 規範的試驗取得懷孕動物之 TK 數據。對於選用總暴露量或非結合態的藥品暴露量之理由應予以說明，並且與所有非臨床試驗的規劃一致，如 ICH S3A 規範所示。

I. 適用於生物製劑之以暴露量為基礎的做法

根據 ICH S6，利用以暴露量為基礎的臨界值來選擇生物製劑的給藥劑量也是一個適當的做法，一般而言，所選擇的給藥劑量將以下述兩個劑量較高者做為給藥標準：須能在臨床前物種體內達到最大的預期藥理效果，或是能夠達到比臨床最大暴露量高約 10 倍的劑量。此外應參考 ICH S6，依與標靶結合的親和力或其他相關因素之差異而調整劑量。

4. 以最高可能投予劑量為指標

當與給藥途徑/頻率以及實驗動物解剖/生理屬性相關的藥品(或配方)物化性質會限制給藥的劑量時，則可選擇最高可投予劑量 (maximum feasible dose, MFD) 做為試驗的高劑量。根據 ICH M3 問答集 (1)，採用 MFD 是為了將實驗動物的暴露量最大化，而不是將給藥的劑量最大化。此外改變給藥頻率視同提高該藥品實際可行之每日總暴露量(見 6.3 節)。

5. 以上限劑量為指標

當無法以較低劑量滿足其他劑量選擇因子時，一般可採用 1 g/kg/day 做為上限劑量(若有其他考量可參閱 ICH M3)。

6. 較低劑量之選擇

一般而言，須針對 DART 建立無明顯不良反應劑量(no observed adverse effect level, NOAEL)。選擇較低的劑量時，應將暴露量、藥理性質以及毒性納入考量，以期適當地建立試驗結果的劑量反應關係。低劑量通常會採用 MRHD 人體暴露量的較低倍數，比如 1-5 倍。若所選的劑量在人體內所達到的暴露量不足以產生治療效果，則必須說明其合理性。

(二) 給藥途徑

一般而言，給藥途徑應該與臨床途徑相同。然而，若使用的臨床途徑無法在試驗動物體內達到足夠之暴露量，或是採用臨床途徑並不可行，則應考慮選用其他給藥途徑。若有數種人類的給藥途徑正在評估當中，則只須以一種給藥途徑進行動物實驗即可，但前提是與所有臨床給藥途徑相比，動物的給藥途徑必需能達到足夠的全身性暴露量且適當涵蓋藥品之代謝物。

(三) 時程

暴露量概況可由毒性試驗所採用的給藥時程決定，而暴露量概況在風險評估中相當重要。雖然模仿臨床給藥時程通常即已足夠，然而增加或是減少給藥頻率的時程也是可以接受。例如，若某藥品在實驗動物體內會迅速被代謝，其給藥時程就可以改為一日兩次，但如欲增加給藥頻率則須考量實務因素(如試驗的後勤作業、對實驗動物造成的負擔等)。此外，為確保藥品在試驗中欲評估的每個關鍵生殖及/或發育階段皆能達到適當的暴露量，改變給藥時程也是一個相當重要的方法。

(四) 疫苗之劑量選擇與試驗設計

本指導原則亦涵蓋用於以傳染性疾病為適應症之預防性及治療性疫苗(無論有無佐劑)。雖然用於其他適應症(例如癌症)之疫苗不在本指導原則的範疇之內，但本文所敘述的方法學原則亦可適用於這類疫苗的非臨床試驗。

預防性及治療性疫苗所需之生殖及/或發育毒性試驗的類型須依該疫苗之目標族群以及相關的生殖風險而定。一般而言，疫苗的對象若是新生兒、青春期前的兒童或年長者則不需要進行 DART 試驗。

疫苗的生殖毒性試驗通常只須評估在動物模式中引發免疫反應之單一劑量(見 5.1.2 節)，且採用臨床途徑作為給藥途徑。此單一劑量應為未依體重校正的最大人體劑量(亦即 1 人體劑量=1 動物劑量)。若因可施打的總體積限制或因為劑量限制性毒性(無論是作用於局部或全身)等因素而不能對實驗動物施打最大人體劑量時，可以 mg/kg 為基礎採用超過人體劑量的劑量進行動物試驗。若於動物模式中選擇降低劑量，則應說明為何無法使用人體劑量之理由。

疫苗之給藥方案應能最大化胚胎期、胎兒期、產後早期母親體內之抗體效價及/或免疫反應。給藥的時機與次數須視該疫苗之免疫反應的開始時間與歷時多長而定。當研發懷孕期施打之疫苗時，應以疫苗預期的作用(例如保護孕婦或保護新生兒)為基礎，說明採用此特定試驗設計之理由。

由於每日給藥可能導致疫苗成分的過度暴露，建議對懷孕動物採取間歇式給藥而非每日給藥，此外，間歇式給藥比較接近多數預防性與治療性疫苗之建議接種時程。考量到常用動物物種的妊娠期較短，一般建議在實驗動物交配前數日至數週前施打一劑或多劑促發劑量的疫苗，以期能在懷孕期之重要階段(即器官成形階段)達到免疫反應的高峰。給藥方案可依在人類身上所施打的預定時程進行調整。

器官成形的早期階段至少須施打一劑疫苗，不僅可由此評估疫苗配方中的化合物是否具有直接影響胚胎之毒性，並且使剩餘的妊娠期維持高度的抗體反應。

若發現疫苗的胚胎-胎兒毒性，可以利用在特定時間點給藥的實驗動物次群組做進一步分析。若疫苗含有新型活性組成成分(含新型佐劑)，亦可採用類似於非疫苗產品的額外試驗策略。

七、適用於齧齒類之組合式試驗設計

雖然多數藥品的開發過程會應用到三階段各自獨立的試驗設計-FEED(A、B階段)、EFD(C、D階段)和PPND(C至F階段)，為了減少實驗動物之使用量，可針對此三階段試驗設計進行各種組合。組合式試驗設計的主要優勢在於可利用較少的實驗動物分析各個相關的生殖階段。此外，組合式的動物試驗設計也較能模擬臨床情況下的暴露時間，尤其是半衰期較長的藥品。較為常見的組合方式是將生殖能力與EFD兩種試驗相結合(A至D階段)，再搭配一組獨立的PPND試驗(C至F階段)。

參閱附錄1可以得知FEED、EFD和PPND三種試驗的設計與細節以及彼此間可行的試驗組合。

當雄性或雌性生殖能力不預期會受到藥品影響，或是重複劑量毒性試驗中觀察到生殖器官毒性而需延長給藥時程的情況下，皆可考慮將重複劑量毒性試驗與生殖能力試驗作結合。在重複劑量毒性試驗中經過一定的給藥時程後，便可將雄性實驗動物與性成熟的雌性(未給藥或是於交配前至少給藥兩週)相配對，這樣的試驗組合可以減少實驗動物用量，但每一組仍應維持至少有16對雌雄配對。此外，可對雌性的給藥時程自交配前兩週延長至器官形成期結束，藉此評估各項EFD指標(附錄1)。

八、數據報告與統計分析

(一) 數據報告

試驗動物各項數據應以清楚而簡潔的表格呈現，且表格須能方便追溯每一隻動物與其胚體自試驗開始至結束之變化。

描述胚胎的形態異常時應使用業界統一的術語，每窩的相關發現應依其胚體清楚列舉，並依照異常類型摘要式的條列。摘要列表應清楚標示包含或排除未懷孕動物數據之處。

對於試驗數據的詮釋應以與同時進行的控制組相比較為主，但可以引用過去的控制/參考數據協助分析，最好是選用由進行試驗的實驗室所蒐集的近期歷史數據，一般而言，最好是5年內的新數據，以利辨認基因偏移(genetic drift)。

(二) 統計分析

確認性試驗須進行統計檢定以分析給藥組與控制組之間是否達到顯著差異。DART 試驗的數據許多都並非呈現常態分佈，因而有必要運用無母數統計分析法。經帝王切開術(Caesarean section)取得的數據與胚胎、產後數據等之概述統計量應以每窩為單位作分析與計算。統計顯著性不見得代表陽性結果，而未達統計顯著性亦不見得代表陰性結果。若能透過所有藥理與毒理數據確認試驗結果是否具生物合理性，往往極為有用。

九、 風險評估之原則

如前文各章節所述，為了探討測試藥品在使用條件下(包含臨床試驗與獲得上市許可後之使用)是否對人類生殖有潛在的風險，進行試驗時應該採用所有取自測試藥品、相關化合物、人類基因的數據，以及關於標靶器官的生物學特性在人類生殖過程中所扮演的角色的相關知識，此外應針對可取得的非臨床 DART 數據資料內所有的侷限性(如試驗體系之相關性、所達之暴露量等)與不確定因素，以及所存在的缺漏進行討論並且分析其影響。一般而言，以適當物種且適當暴露量所得到的決定性 *in vivo* 試驗結果會比採用替代性試驗或初步試驗所得的結果具有更高的權重。風險評估的程序是一連續過程，隨著資訊逐漸浮現而縱貫整個產品的開發過程。

DART 試驗的發現結果未必全是不良反應，當某項發現呈現負面結果時，應以證據權重法考量多個因素以進行風險評估。這些因素可包括暴露臨界、生物合理性、劑量反應相關性的證據、可逆性、親代毒性產生干擾的可能性，以及是否呈現跨物種一致性等。關於罕見的畸型現象，升高劑量並未提高發生率並不足以減輕這方面的疑慮。

將試驗動物在 NOAEL 下的暴露量與人類 MRHD 下的暴露量相比較是風險評估裡極為重要的一環。進行比較時，應以最相關的衡量尺度作為比較的基準，如 AUC、 C_{max} 、 C_{min} 、依體表面積調整之劑量等。一般而言，若 NOAEL 低於 10 倍 MRHD 暴露量時，風險顧慮較大，反之則風險較小。該藥品在暴露超過 25 倍 MRHD 時才發生的影響，通常對該藥品的臨床應用而言無須太過在意。一般將最敏感物種的暴露量視為最具相關性的暴露臨界值，除非另有適當證據證明並非如此。生物合理性係藉由比較藥理作用機制與標靶器官在生殖或發育過程中所扮演的角色來評估，若一項發現可解讀為藥理的作用後果，則表示此項發現有影響人體之疑慮，若有發現劑量相關的證據，不論是發生率的增加或是嚴重程度的增加，均能加強其關聯性，但如果沒有生物上的合理性，即使在有劑量反應關係的情況下也不能排除脫靶毒性的出現。

對於藥品毒性可逆性的瞭解會改變風險評估的結果。若於停藥後可以恢復雄

性與雌性的生殖能力，對該藥品的疑慮較小；反之，若發生發育上不可逆的重大影響，如死亡或畸形，則會提高該藥品的疑慮。其他形式的發育毒性(例如發育遲緩、功能缺損等)或許可逆，亦或許不可逆，一般而言，暫時性的發現(例如齧齒類動物呈現波浪狀肋骨之類的骨骼差異)若只是單獨發生則顧慮不大；同理，胎重減輕時，發育遲緩指標的變動亦無過大的疑慮；但是如果在無法明確判定是否有畸形產生的情況下，同時又發現變動發生率整體有所上升(無論在性質上相似與否)，則對於胚胎型態生成異常可能性的疑慮就隨之提升。

確認各項發現與藥品的相關性時，須考慮親代毒性的角色。若所觀察到的胚胎-胎兒毒性，在親代亦同時出現毒性時，即應審慎考量此發現是否可推及於人類身上。對此，各窩子代所觀察到的結果與母親親代毒性高低是否呈現一致性將有助於風險評估。發育毒性不應被預設為母體親代毒性的從屬，除非這項關係能被重複證明或有相關文獻可供佐證。

此外，當某項發現在多項試驗中或不同物種間皆呈現一致，將會加深對此藥品不良反應的顧慮。若齧齒類的 EFD 試驗觀察到的胎兒致死性增高，與 PPND 試驗中發現同一窩子代間存活數降低的現象相符合，即是跨試驗一致性的良好例證，例如觀察到大鼠與兔類胚胎在著床後的損失率都升高就是跨物種一致性的例證。若是能對動物試驗中所發現的生殖或發育效應的機制有進一步的認識，將可協助解釋物種間的反應差異，並說明該作用是否與人類有相關性(例如皮質類固醇在小鼠身上引發的顎裂)。

針對哺乳行為所作的藥品風險評估將以 *in vivo* 試驗(PPND 或 ePPND)中由一窩實驗動物子代身上所觀察到的危害現象做為預測。此處所謂危害包括因為分泌的母乳中含有該藥品而對子代的生長與發育所造成的不良影響，此外若試驗中能取得子代的全身性暴露量數據，亦可與人類嬰兒經由母乳而來的推估暴露量相比較，雖然不同物種的乳汁成分不同，因而使目標藥品在動物乳汁與人類乳汁中的濃度並無直接數量上的相關性，但是動物乳汁中含有該藥品通常即表示人類乳汁中亦可能含有該藥品。最後，既有的人類數據也會影響對人類生殖力風險的整體評估。

十、 註釋

註 1： 睪丸與副睪的採樣與處理須以能保留曲細精管上皮組織結構的方法為之。先確認當下的精子生成週期，再以顯微鏡作詳細評估才是查驗精子生成能力是否受到影響的較佳做法。一般而言在試驗設計中增加額外的觀察指標(例如免疫組織化學特性、抗均質化精細胞數(homogenization resistant spermatid counts)、流式細胞分析或是分期量化分析等)並無必要，卻可以進一步探討試驗所發現的影響具有何種特性。

以雌性動物進行試驗時，應先確認當下的生殖週期，並在有原胚濾泡與初級濾泡存在時，以顯微鏡對卵巢(包括卵泡、黃體、基質、間質、血管分布等)、子宮和陰道作詳細的檢查。

註 2：一項針對 22 種已知或推定的人類致畸胎原所做的分析顯示當觀察到 MEFL 時，至少有一個物種暴露該藥品後的可觀察到不良反應之最低劑量(Lowest-observed-adverse effect level, LOAEL)小於 6 倍的 MRHD 值(Andrews et al.(6))，這表示在 EFD 毒性試驗中若使用大於 25 倍 MRHD 的暴露量做為試驗用高劑量，已足以檢測所有這些藥品的致畸性危害；這項分析亦顯示在實驗動物上所偵測到的人類致畸胎原中，至少有一個物種的 NOAEL 值小於 4 倍的 MRHD。

此外，IQDruSafe Leadership Group 曾對 EFD 毒性試驗進行了一項調查(Andrews et al. (7))，該調查總共發現了 153 個大鼠和 128 個兔子的 EFD 毒性試驗，在沒有出現干擾試驗之母體毒性(即限制給藥劑量)的情況下，動物原型藥品暴露量對於人類原型藥品暴露量比例可達 15 倍以上(以人類臨床治療用劑量的暴露量為基準)。這些數據顯示，對實驗動物給藥達到人類暴露量 25 倍以上，且未出現母體毒性的情況下(否則高劑量將會受限)，很少能偵測到 MEFL，在所有這些案例中，都是在給藥量超過人體暴露量 50 倍後才出現 MEFL，但在如此高暴露量才出現的 MEFL，顯然已經跟人體的風險評估不具相關性。因此，在未出現干擾試驗之母體毒性的情況下，使試驗動物的暴露量達到所有原型化合物在人類血漿暴露量的 25 倍以上，可得到與人體風險評估相關的合理結果，是設計 EFD 與 PPND 試驗時高劑量的務實選擇。

十一、 名詞解釋(以下的定義僅限此指導原則所用)

替代性試驗(alternative assay)：以預測畸胎或胚胎－胎兒致死性為目的之 *in vitro*、*ex vivo*、非哺乳類 *in vivo* 檢驗方法。參見 MEFL。

適用域(applicability domain)：一項物質能以試驗方法有效測得的理化性質以及該試驗方法所涵蓋的生物學作用機制等之範圍。

試驗法驗證(assay qualification)：確認某項替代性試驗能由 *in vivo* 結果預測

MEFL。

組成成份(constitutive ingredients)：作為疫苗之賦形劑、稀釋劑、佐劑的化學或生物物質，包含任何用於協助藥品施用且單獨包裝的稀釋劑。

發育毒性(developmental toxicity)：藥品在個體成年前所引發的任何不良反應，包含從受孕至誕生後所誘發或顯現的不良反應。

GD 0：發現證實交配行為證據(如齧齒類實驗動物由陰道抹片/陰道精栓發現精子，或觀察到兔類交配行為)的日期。

畸形(malformation)：一般是指無法正常發育與生存，甚至對之有嚴重危害的永久性結構變形。

初步 EFD 毒性試驗(preliminary EFD(pEFD) toxicity study)：符合以下條件之胚胎 - 胎兒發育毒性試驗：(1)器官形成時期暴露於藥品影響之下、(2)使用適當的劑量、(3)每個試驗組至少有 6 隻懷孕的實驗動物、(4)對胎兒存活、胎兒重量、外觀與軟組織變化作評估。(見 ICH M3)

替代分子藥品(surrogate molecule)：分子藥品在試驗用實驗動物體內的藥理活性類似於人用藥品在人體內藥理活性者。

疫苗(vaccine)：在此指導原則中，「疫苗」一詞係指針對傳染性疾病之預防性與治療性疫苗。因此，將疫苗 - 含所謂疫苗產品(vaccine product) - 定義為完整的配方，包含有抗原(或免疫原)與任何佐劑、賦形劑或是保存劑等添加物。疫苗之功能在於刺激免疫系統，使動物對疫苗所含之抗原產生免疫反應。疫苗之主要藥理效用為防止及/或治療感染或傳染性疾病。

變異(variation)：不影響存活力、發育、功能的結構性變化(如骨化作用受到延遲)，此類變化為可逆性且在正常族群中亦存在者。

十二、 參考文獻

- 1 International Council for Harmonisation M3: Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals together with ICH M3 Questions & Answers.
- 2 International Council for Harmonisation S6: Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals.
- 3 International Council for Harmonisation S9: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals.
- 4 International Council for Harmonisation S3A: Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Toxicity in Toxicity Studies together with ICH S3A Questions and Answers.
- 5 International Council for Harmonisation S11: Nonclinical Safety Testing in Support of Development of Pediatric Medicines.
- 6 Andrews PA, Blanset D, Lemos Costa P, Green M, Green ML, Jacobs A, et al. Analysis of exposure margins in developmental toxicity studies for detection of human teratogens. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2019a;105:62-8.
- 7 Andrews PA, McNerney ME, DeGeorge JJ. Reproductive and developmental toxicity testing: An IQ-DruSafe industry survey on current practices. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2019b;107:104413.

附錄 1 *in vivo* 試驗設計

以下為在 DART 試驗中使用各實驗動物物種之優缺點。

表1 各實驗動物物種用於發育毒性與生殖毒性試驗之主要優缺點		
常用測試物種		
物種	優點	缺點
大鼠	<ul style="list-style-type: none"> • 生物學特性廣為人知 • 廣泛用於藥效動力學與藥品探索的研究 • 生殖能力強大且妊娠期短 • 群體規模大且每胎隻數多 • 有重複劑量毒性試驗數據提供參考 • 廣泛的實驗室使用經驗且容易取得 • 詳盡的歷史數據 	<ul style="list-style-type: none"> • 胎盤形成與人類不同(如生成時機、卵黃囊上下顛倒等) • 依賴泌乳素作為懷孕初期發展與維持的主要荷爾蒙，因而對特定藥品較為敏感(例如多巴胺促進劑) • 對於會干擾分娩的藥品高度敏感(如懷孕晚期施用非類固醇消炎藥) • 對於生殖能力的干擾敏感性不如人類 • 外源蛋白效用有限 <ul style="list-style-type: none"> - 藥理活性有限或無藥理活性 - 免疫原性可能造成影響

兔	<ul style="list-style-type: none"> • 與大鼠優點類似 • 屬於非齧齒類動物模式 • 適於連續精液取樣與交配研究 • 抗體經由胎盤的傳遞現象比齧齒類更近於靈長類，對於疫苗的DART試驗有益 	<ul style="list-style-type: none"> • 對外源蛋白的限制與大鼠相近 • 生殖能力與產前/產後試驗的歷史數據有限 • 對腸胃擾動(如某些抗生素的影響)敏感 • 易於自然流產 • 難以臨床表徵監看其全身概況 • 須自行蒐集藥效動力學、毒性、TK數據，因為毒理學研究一般不包括這些項目(疫苗除外)
小鼠	<ul style="list-style-type: none"> • 與大鼠優點類似 • 有基因改造模式可用，亦可以進行基因改造 • 通常有替代分子藥品可用 • 消耗的試驗材料量較低 	<ul style="list-style-type: none"> • 限制性與大鼠相近 • 胎兒小且組織量低 • 對壓力敏感 • 有時會發生畸型個體的叢集

不常用於測試之物種		
物種	優點	缺點
馬來猴(NHP)	<ul style="list-style-type: none"> • 相較於其他物種，通常與人類在譜系與生理方面較相近 • 比起嚙齒類，此物種更可能呈現與人類相近的藥理特性 • 胎盤形成與人類相似 • 有重複劑量毒性試驗數據可供參考 • 抗體經由胎盤的傳遞現象與人類相近 	<ul style="list-style-type: none"> • 群體小因而統計檢定力低且群間差異大 • 潛在生殖能力低 <ul style="list-style-type: none"> - 每胎只生一隻 • 懷孕期背景損失高，具生殖能力個體來源有限 • 月經週期(30日)與妊娠期(165日)長 • 難以進行生殖能力(交配)試驗 • 性成熟晚(約3-6歲時)以致 F1 生殖功能難以評估 • 性成熟不能以年齡與體重認定 • 道德考量 • 控制組的歷史性數據與實驗室使用經驗/用量均較少 • 試驗開始時個體之年齡、體重、懷孕史差異極大

<p>迷你豬</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 可供一般毒性試驗使用之替代性非齧齒類 • 器官形成期短(GD 11-35) • 基因背景確定且不帶特定病原 • 出生7個月達性成熟 • 每胎隻數較NHP大 • 適於連續精液取樣與交配研究 • 生殖能力指標有充足的歷史性背景數據 	<ul style="list-style-type: none"> • 有使用經驗的實驗室有限 • 妊娠期長(114日) • 消耗的試驗材料量高 • 產前沒有或僅有極少量的抗體傳遞
------------	---	---

有限度用於測試之物種		
物種	優點	缺點
倉鼠	<ul style="list-style-type: none"> 藥理上可能與人之間具有相關性的替代性齧齒類動物模式 	<ul style="list-style-type: none"> 同類相食導致新生兒損失率高 控制組的歷史性數據與實驗室使用經驗有限 產後行為與功能性研究有限 靜脈注射難以作為給藥途徑 好鬥 對腸胃擾動敏感 須自行蒐集藥效動力學(PD)、毒性、毒物動力學(TK)數據，因為毒理學研究一般不包括這些項目 血液採樣困難
狗	<ul style="list-style-type: none"> 通常有重複劑量毒性數據可參考 易於採集精液 	<ul style="list-style-type: none"> 妊娠期長(63日) 控制組的歷史性數據與實驗室使用經驗有限 產後行為與功能性研究有限 消耗的試驗材料量高

藥品對DART指標之影響亦可使用其他未列於上表中的哺乳類物種來評估

(一) *in vivo* 試驗設計之考量

一般而言，生殖能力試驗所用的實驗動物應該在試驗開始時於年齡、體重、雌雄配對數目等方面相當，這項原則對於試驗內部與試驗之間的比較都應成立，欲符合此要求最簡單的做法即在開始給藥時使用年輕但已達性成熟的成體。個別試驗中每組應有多少隻實驗動物，須在如何適當使用實驗動物的道德考量，以及基於多年來試驗設計經驗的科學考量兩者之間求取平衡。有時一組中不需太多實驗動物即足以展現藥品在臨床相關的暴露量下會對生殖或發育帶來的可能不良影響。

以 16-20 胎的啮齒類或兔類作評估，能在試驗間達到相當程度的一致性。少於 16 胎將使不同次試驗的結果不一致，但每組多於 20-24 胎並不能顯著提升試驗結果之準確性與一致性。以上這些數字係指每次評估可用的胎數。若實驗組須進一步細分以進行多項評估，則試驗開始時所需之實驗動物數目應重新調整。

以下建議的各試驗設計可再依需求作調整，尤其參數、時機、評估方法等，而仍能達成試驗目的。決定個別實驗室與試驗目的適用何種試驗設計架構時應參酌專家意見。

1. 生殖能力與胚胎早期發育(FEED)試驗

FEED 試驗之目的在於評估藥品對配子成熟度、交配行為、生殖能力、胚胎著床前發育、和著床等影響。對於雌性動物，試驗內容包含動情週期與輸卵管傳輸所受的影響。而對於雄性動物，試驗內容包含偵測對雄性生殖器官作組織病理檢查所難以察覺的功能影響(如副睪中精液成熟過程)。

雌雄兩性實驗動物都給予目標藥品的兩性綜合 FEED 試驗是常見的做法(見表 2)。不過亦可將試驗中的異性以適當數量之未給藥雌性或雄性動物取代，進行單獨純雄性或純雌性投藥之試驗。

表2 FEED 試驗設計：齧齒類，雌雄兩性綜合試驗	
參數	
每組大小	兩性至少各 16 隻
給藥組數	4(含 1 控制組)
給藥時程 ^a	雄性：同居前 ≥2 週開始給藥，至少持續至確認有交配行為為止 雌性：同居前 ≥2 週開始給藥，至少持續至胚胎著床為止(GD6)
交配比例	1 雄對 1 雌
交配期 ^b	≥2 週
動情週期評估	每日，同居前的 2 週開始觀察，確認有交配行為後結束
臨床觀察/死亡率	每日至少觀察 1 次
體重	每週至少觀察 2 次
攝食量	交配期間外每週至少觀察 1 次
雄性屍體解剖 ^c	保留睪丸與副睪，以備進行組織病理檢查。依個體逐一進行評估。進行目視檢查並將發現受影響的器官予以保留以備進行組織病理檢查。須自控制組選取足量的相同器官予以保留，以備日後比較。
精液分析 ^d	非必要選項
雌性屍體解剖 ^e	依個體逐一進行評估。保留卵巢與子宮，以備進行組織病理檢查。進行目視檢查並將發現受影響的器官予以保留，以備進行組織病理檢驗。須自控制組選取足量的相同器官予以保留，以備日後比較。
施行帝王切開術之時機	一般於妊娠中期施行帝王切開術
子宮著床數據	妊娠黃體數、著床點數目、胚胎存活與死亡數

- a：應以所有可取得的重複劑量毒性試驗與遺傳毒性試驗數據為據說明選擇此給藥時程之正當性，尤其是對偵測精子生成所受影響的考量。若為期至少 2 週的重複劑量毒性試驗並未發現有影響，可以在交配前以 2 週為給藥週期分別對雌性與雄性實驗動物施藥。雄性應持續給藥至確認有交配行為，但確認雌性具生殖能力後終止更佳。雌性應持續給藥，至少至確認胚胎著床為止。如此做法才能評估重複劑量毒性試驗的組織病理檢查難以偵測的生殖功能影響以及對交配行為的影響。
- b：多數大鼠與小鼠於同居 5 日內(即頭一次發情期)便發生交配行為，但某些情況下雌性可能出現假性懷孕。讓這些雌性與雄性同居超過 2 週即可令其重新發情並懷孕。
- c：可考量於確定交配結果後才將雄性安樂死。若藥品能影響生殖能力，可令雄性與未給藥的雌性交配以確認是否透過雄性產生效果。若於交配後仍持續對雄性給藥並將安樂死延後至雄性暴露於該藥品之下達一完整的精子生成週期(例如 10 週)，則可更完整評估藥品對雄性生殖系統的毒性。
- d：精液分析(如精子的數量、活動力及/或形態)有時能對風險評估遇到的問題提供有力的佐證。
- e：大體而言，將雌性在懷孕第 13-15 日安樂死是分析生殖能力與功能所受影響(如分辨胚胎著床點與再吸收點)的適當做法。亦可選擇接近妊娠期終點才將雌性安樂死。

2. 胚胎 - 胎兒發育(EFD)毒性試驗

EFD 毒性試驗之目的在於評估與未懷孕雌性個體相比，藥品對懷孕個體的毒性。此外亦評估藥品對胚胎 - 胎兒的存活、宮內成長及型態發育的可能影響。

適用於齧齒類、兔類和馬來猴等物種之實驗設計如下所述：

I. 劑量範圍探索胚胎-胎兒發育毒性試驗

對已進行交配之雌性個體所進行的 DRF 試驗最常用於決定性 EFD 毒性試驗中，選擇可應用於齧齒類或兔類之適當的劑量範圍或給藥時程，但是既有的重複劑量毒性試驗耐受性與 TK 數據往往即足以滿足此需求。

II. 初步胚胎-胎兒發育(pEFD)毒性試驗

在設計上，pEFD 毒性試驗與決定性 EFD 毒性試驗相近(表 3)。典型的 pEFD 毒性試驗設計會在器官形成期持續給予適當劑量範圍的藥品，而且每一個實驗組取至少 6 隻懷孕的雌性個體作評估。評估內容包括胎兒存活率、胎重、胎兒外觀畸形與軟組織畸型等(見 ICH M3)。

III. 決定性胚胎-胎兒發育毒性試驗

於雌性實驗動物產期將屆時，施行帝王切開術，藉此分析胎兒之存活率、胎重、外觀畸形、軟組織畸型和骨骼發育等項目(表 3)。表 3 所列的施術時機係針對齧齒類、兔類和馬來猴等物種。其他物種應擇適當時機施行手術。

參數	pEFD	EFD		
	齧齒類/兔類	大鼠(小鼠)	兔類	NHPa
應否遵守GLP	非必要選項 ^c	是	是	是
懷孕雌性最低隻數	6 隻	16 隻	16 隻	16 隻 ^b
給藥組數目	4 組(含 1 控制組)	4 組(含 1 控制組)	4 組(含 1 控制組)	至少 2 組(含 1 控制組)

給藥時程	依物種作適當選擇	GD6/7 - 17 (6/7 -15)	GD6/7 - 19	約 GD20 到至少 GD50
犧牲前觀察指標				
臨床觀察/ 死亡率	每日至少 1 次	每日至少 1 次	每日至少 1 次	每日至少 1 次
體重	每週至少 2 次	每週至少 2 次 e	每週至少 2 次 e	每週至少 1 次
攝食量	每週至少觀察 1 次	每週至少觀察 1 次	每週至少觀察 1 次	非必要選項
毒物動力學特性	非必要選項 ^c	是	是	是
犧牲後觀察指標				
帝王切開術 ^f	依物種作適當選擇	GD20/21 (17/18)	GD28/29	GD100
目視檢查	是	是	是	非必要選項
妊娠子宮重量	非必要選項	非必要選項	非必要選項	NA
妊娠黃體	是	是	是	NA
著床點	是	是	是	NA
存活與死亡胚胎	是	是	是	是
早期與晚期再吸收	是	是	是	NA
胎盤整體評估	是	是	是	是
胎盤重	非必要選項	非必要選項	非必要選項	非必要選項
胎兒體重	是	是	是	是
胎兒性別	是	是	是	是
胎兒外觀評估 g	是	是	是	是

胎兒軟組織評估 ^g	是	是 ^g	是	是
胎兒骨骼評估 ^h	非必要選項 ^c	是 ^g	是	是
<p>a：若使用馬來猴以外的 NHP，應視情況調整試驗設計。</p> <p>b：在 EFD 試驗中，每組須能提供足夠數量的胎兒以評估藥品可能對型態發育造成的不良影響。</p> <p>c：若以 pEFD 試驗推遲決定性 EFD 試驗，則 pEFD 試驗須遵守 GLP 準則，且應採集懷孕實驗動物的 TK 數據並評估胎兒骨骼發育。</p> <p>d：若使用啮齒類或兔類，雌性應自著床起至硬顎閉合止持續給藥(即生殖階段中的 C 階段)。若使用 NHP，雌性應自確認懷孕起(約 GD20)到至少 GD50(主要器官形成期結束)為止持續給藥。</p> <p>e：給藥期間每日測量懷孕雌性的體重能取得有用的資訊。</p> <p>f：若使用啮齒類或兔類，應於預產日前約 1 日實施帝王切開術。目視檢查發現受影響的器官應予以保留以備進行組織病理檢查。須自控制組選取足量的相同器官予以保留以備之後作比較。若使用 NHP，應於約 GD100 時施行帝王切開術。</p> <p>g：須檢視所有胎兒之存活力與是否有畸形。胎兒應個別作檢視以便事後評估不同的觀察方法之間的關連。</p> <p>h：雖然理想狀況下應檢查所有啮齒類動物胎兒之軟組織與骨骼變化(若方法上許可)，將每胎 50% 的胎兒觀察軟組織，另外 50% 的胎兒觀察骨骼變化是可接受的作法。</p>				

3. 產前與產後發育(PPND)毒性試驗

PPND 毒性試驗之目的在於評估與未懷孕雌性個體相較的情況，給藥後毒性提高的程度、子代產前與產後成活力、生長與發育上的變化，以及子代的功能缺損，包括性成熟、成熟後之生殖能力、感官功能、活動能力、學習與記憶能力等。

可允許雌性生產並養育子代至斷奶，並且須於每胎子代中挑選至少一雄一雌養育至成年且可行交配，以分析其是否具有生殖能力(見表 4)。

表 4 PPND 毒性試驗之設計：大鼠	
參數	
每組大小	至少 16 胎
給藥組數	4(含 1 控制組)
給藥時程	自著床(GD6/7)開始給藥，至斷奶 - 即約產後 20 日(postnatal day 20, PND20)為止
F0 雌性	
臨床觀察/死亡率	每日至少 1 次
體重	每週至少 2 次
攝食量	至泌乳期中期，每週至少 1 次
分娩觀察	GD21 至完成
屍體解剖	將目視檢查發現受影響的組織以及取自控制組的相同組織予以保留，以備事後作組織病理檢查；清點子宮內著床位點數量
F1 斷奶前	
臨床觀察/死亡率	自 PND0 起每日觀察
斷奶前與斷奶後存活率	自 PND0 起每日觀察
體重與性別	PND0/1 觀察後每週至少觀察 2 次
選擇性每胎數量標準化	≥ PND4，雌雄各 4 - 5 之幼崽
身體發育 ^a	紀錄斷奶前發育與反射作用發生里程碑(如睜眼、耳廓展開、平面翻正、聽覺驚跳、空中翻正、對光反應等)

F1 斷奶後	
挑選作斷奶後評估與每組大小 ^b	PND21。盡可能每胎至少 1 雄 1 雌，以達每組/性別各 16 隻
臨床觀察/死亡率	每日
體重	每週
選擇性攝食量	每週
性成熟 ^c	雌性：陰道開啟 雄性：包皮分離
其他功能性測驗 ^d	評估感官功能、活動能力、學習與記憶能力等
生殖能力	至少 10 週大時進行；以同組內個體作配對(非同親代之 1 雄 1 雌)進行交配
<p>a：身體發育的最佳指標是體重，但光憑體重一項並不足以取代其他與發育相關的參數。</p> <p>b：每胎應至少保留 1 雄 1 雌，以進行行為與其他功能性測驗來評估生殖功能。某些情況下，每胎可保留更多隻數，以進行獨立的功能性評估。</p> <p>c：應紀錄達性成熟時的體重，以確認跟控制組的差異有特殊性或與整體的成長有關。</p> <p>d：學習與記憶能力應以複雜的學習任務來作評估。運動能力與伴隨前脈衝抑制(若有實施)的驚跳反射評估應持續足夠的時間，才能展現習慣化的程度。</p>	

I. 非人屬靈長類(NHP)之加強型產前與產後發育(ePPND)毒性試驗

表 5 之 ePPND 毒性試驗係針對 NHP 之試驗，其指標取自 EFD 與 PPND 兩種試驗。在 ePPND 毒性試驗中，給藥期橫貫整個妊娠期至分娩為止(例如自 GD20 至分娩)。關於進行試驗的時機與額外進行評估的參數可參閱 ICH S6。

表 5 ePPND 毒性試驗之設計：馬來猴^a	
參數	
每組大小 ^b	約 16 隻懷孕雌性個體
給藥組數	至少 2 組(含 1 控制組)
給藥時程	自確認懷孕(約GD20)始至分娩止
F0 雌性	
臨床觀察/死亡率	每日至少 1 次
體重	每週至少 1 次
分娩觀察	紀錄分娩完成日期
胎盤	可能情況下應予以保存
屍體解剖與組織評估	有必要時才執行
暴露量評估	視情況紀錄藥品 TK 特徵及/或全身濃度分布
F1	
臨床觀察/死亡率	自 PND0 起每日觀察
體重	每週觀察
型態/身體發育及/或功能評估	視情況依固定間隔作觀察
行為神經測試組合	產後頭 2 週內至少進行 1 週期
握力	PND28
母子互動	產後初期僅作確認有育兒行為之最低限度觀察，之後視情況作調整。
暴露量評估	視情況量測藥品在全身的濃度分布
外觀評估	固定週期
骨骼評估	約 PND28 或更晚
內臟評估	屍體解剖時進行
屍體解剖	至少 1 個月大時，依評估目的而定，應保存組織以備組織病理檢查之所需

a：若使用馬來猴以外的 NHP，應視情況調整試驗設計。

b：在 ePPND 毒性試驗中，每組大小應能提供足夠數量的幼崽，以便分析藥品對懷孕結果可能的不良影響，以及必要時方便專家分析藥品造成的畸型與對產後發育的影響(如免疫系統)。多數 ePPND 毒性試驗花費數月累積懷孕動物數量。

4. 組合式試驗設計

結合不同的試驗設計來符合藥品開發計畫的需求也是可行的選擇。具體做法是自前述各試驗設計中汲取適用的指標組合成一項新的試驗設計。以下提出數項組合式試驗設計的概念。

I. FEED 與 EFD

結合 FEED 與 EFD 試驗之目的在於檢驗從交配前即對雄性/雌性給藥並持續至交配、胚胎著床、器官形成期末尾之後藥品是否因而產生毒性。這代表須評估生殖階段的 A 至 D 階段(見 1.1 節)，並且最常使用嚙齒類實驗動物，但也可使用非嚙齒類。

本試驗也可以採用組合式的雌雄兩性 FEED/EFD 設計，若雄性的生殖能力已經在一個獨立且具適當時程的重複劑量毒性試驗中被評估完成，亦可考慮採用純雌性之 FEED/EFD 試驗設計，如此未給藥的雄性個體在此設計中將僅作交配之用。

II. 雄性生殖能力與重複劑量毒性試驗

亦可透過嚙齒類重複劑量毒性試驗來評估雄性生殖能力，在此項組合式試驗設計中，將已經固定週數給藥的雄性個體與未給藥的雌性配對，且在同居後持續對雄性給藥直到重複劑量毒性試驗結束為止，於證實交配行為後約 2 週對未給藥的雌性施行帝王切開術。為適當評估藥品之影響，試驗設計應使每組至少含有 16 隻雄性個體。雌性生殖能力與其他 FEED 指標須另以獨立試驗評估。

附錄 2 替代性試驗

透過經驗證之替代性試驗(見「名詞解釋」一節)所取得的數據可在有限的場合中輔助危害鑑定與風險評估。經驗證之替代性試驗可獨立進行，或與一至多項 *in vivo* 試驗協同進行。

其用途包括以下數點：

- 有證據指出藥品對 EFD 有不良影響(例如某作用機制會影響基本的發育生物學途徑、基因改造動物之表現型數據、同類效應等)。
- 由於藥品在實驗動物物種體內的毒性使得藥品在動物體內的全身暴露量難以達到相當於人體在使用條件下所達之暴露量。
- 當動物試驗結果曖昧不明時，用以輔助證據權衡評估。
- 作為至多收案 150 名 WOCBP 且最長為期 3 個月之臨床試驗的旁證。
- 測試之藥品係針對極度衰弱或有生命危險(severely debilitating or life-threatening, SDLT)之病人，或是老年發作(late-life onset, LLO)的病人而開發。

若以替代性試驗輔助風險評估並將其納入整合性試驗策略的決定需要有其正當性。以風險評估為目的而採用之檢驗方法須遵循 GLP 規範，並適合其使用環境(亦即在可適用領域以及符合法規情況下，檢驗結果必須具有信賴度)。若想在試驗策略中納入替代性試驗，亦須同時評估分析藥品之代謝物的影響。本附錄僅舉出基本的科學原則以協助確認檢驗方法是否合乎法規要求，但不會對特定的檢驗方法提出建議。若替代性試驗只用於探討藥品作用機制，並非以取代 *in vivo* EFD 試驗指標為目標，則該替代性試驗無須符合此番嚴格驗證。

(一) 預測MEFL 之替代性試驗的驗證

已知必須要有適當測驗方式才能產生有價值的測驗結果，因此測量指標從檢驗目標與相關預測的角度都應有科學上的正當性。檢驗的預測結果、評估的指標以及適用領域三者間的關係都應有經驗法則佐證。欲使某一替代性試驗或替代性試驗之組合能夠合乎風險評估之法規要求¹，則須對其方法論與結果提出詳盡說明，包括下列各點：

¹ 在此規範下的替代性試驗方法尚未完成正式確效，因此這些替代性試驗方法僅可用於特殊狀況。

- 預測模式的詳細說明與正當性，包括用以預測之物種(如大鼠、兔類，及/或人類)與指標。目前以檢測 MEFL 做為主要評估藥品對發育之潛在危害的 *in vitro* 替代性試驗。
- 評估採用模式之生物合理性，其內容應包括 EFD 機制的敘述(如細胞遷移、細胞分化、血管新生、神經管生成和原腸胚形成等)，以及後續以該模式所探討的不良發育影響，此外，亦應討論各項檢驗方法之侷限性。結果敘述包括提出數據予以討論，並且證明藥品暴露的時間長短與時機能夠輔助對 MEFL 之 *in vivo* 預測。
- 評估該替代性試驗在檢驗 MEFL 之準確性與效果。替代性試驗之數據應與能夠引發 MEFL 之化合物在不引起母體毒性的 *in vivo* 試驗劑量下的數據比對。若該化合物並非市售藥品，則須提供相關 *in vivo* 數據。
- 經討論來決定替代性試驗中所得到的是陽性或陰性效應。
- 定義用以預測 MEFL 之分子標記與代謝標記的閾值並說明其正當性。
- 敘述用以判定 *in vivo* 數據陽性或陰性結果所採用之演算法的相關細節所採用的預測模式須能找出替代性試驗所使用之濃度與在所預測物種(尤以懷孕個體為佳)引發不良反應之暴露量之間的關聯性。
- 列出可驗證替代性試驗之各訓練數據集合體(用以發掘潛在的預測性關係)與測試數據集合體(用以分析預測性關係之強度與效用)所涵蓋的任一化合物，並說明挑選這些化合物的標準。
- 若在驗證用數據資料集合體之化合物並非取自「參考化合物列表」(Reference Compound List，因此表將持續更新，請讀者自行前往 ICH 網站 <https://www.ich.org> 查詢 ICH S5(R3) Annex 2 之 1.3 節)，則應指出該化合物之 *in vivo* 暴露量與 MEFL 數據的來源(例如文獻、研究報告、法規回顧等)。
- 能夠呈現測驗方式效能的數據，須適當涵蓋可正當使用替代性試驗(使用環境)的生物與化學領域。
- 能夠呈現單向或組合式替代性試驗之敏感度、專一性、陰陽預測值和再現性的數據，並以其預測 *in vivo* 發育結果。在所選方法具正當性的前提下，各訓練數據集合體與測試數據集合體的效能可單獨或一起評估。
- 如果使用一項以上的替代性試驗，除對預測模式進行合性評估之外，應分別對每項檢驗方法提出說明。對於如何將個別替代性試驗的結果整合入最終的預測結果須有明確說明。
- 替代性試驗發展與應用相關的歷史數據(例如存活率與畸形之數目與種

類)，中需含陽性對照數據。

藥品之試驗委託人應說明先前已向哪些衛生主管機關提交替代性試驗的驗證資料。須注意即便某主管機關核可某一試驗方法並不代表其他主管機關亦將核可該試驗方法。此外亦建議評估大鼠及/或兔類 *in vivo* 試驗未能檢出的人類致畸胎原，因為某些替代性試驗可用以預測 *in vivo* 試驗難以測得之 MEFL。

(二) 採用替代性試驗之 EFD 試驗策略範例

此章節提供整合性試驗策略的範例，說明如何納入替代性試驗以檢測藥品對 EFD 之不良影響。

1. 替代性試驗納入整合性試驗策略以推遲 *in vivo* 試驗之可行做法

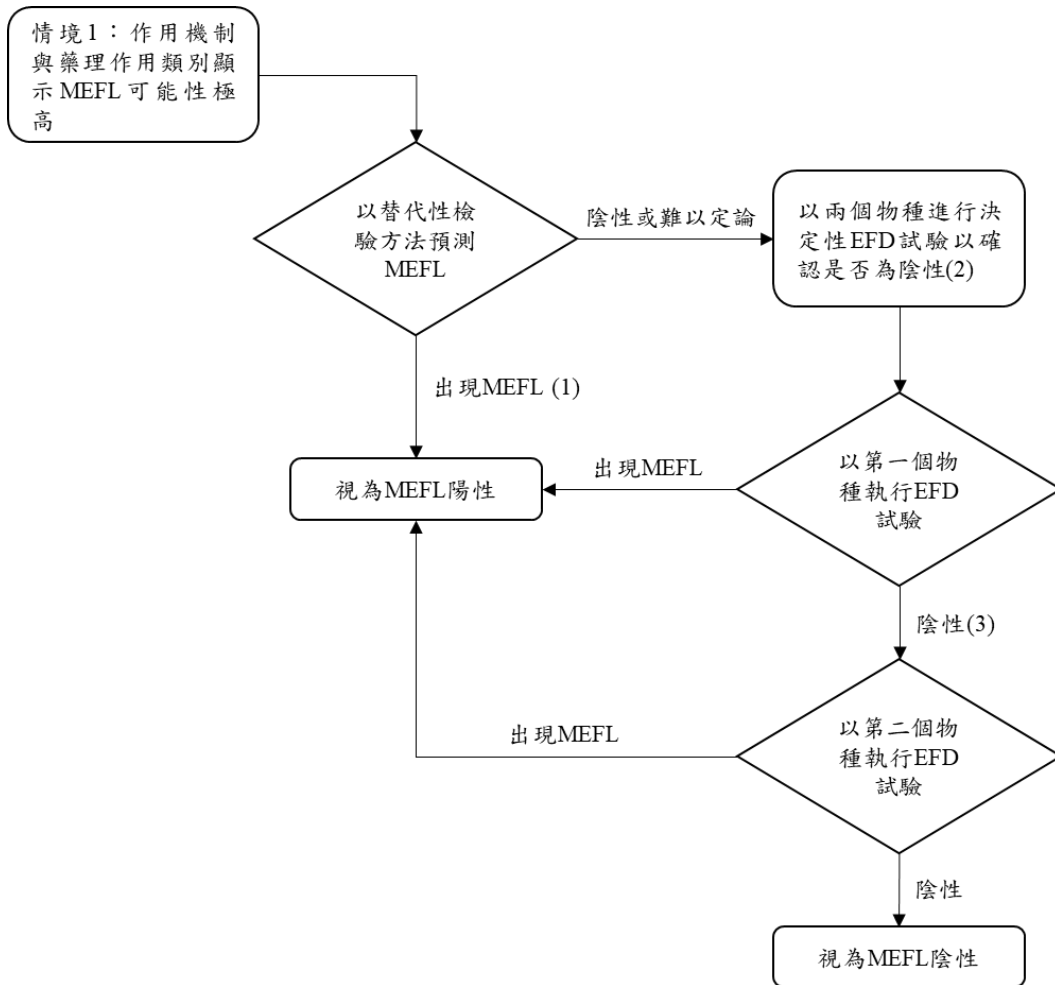
見此部規範正文之 4.2.3 節

2. 預期對胚胎-胎兒具毒性之藥品

若藥品因其作用機制、藥理作用類別或是標靶生物學特性等考量而預期該藥品對胚胎-胎兒發育具不良影響，應以通過驗證的替代性試驗進行確認(見本附錄之圖 1)。

若通過驗證的替代性試驗明確預測藥品在具臨床相關性的外推暴露量下為 MEFL 陽性，即足以證明藥品對 EFD 造成風險，通常無須進一步測試。但是若替代性試驗未能預測 MEFL，則應以兩個物種的實驗動物作決定性 *in vivo* EFD 試驗以進一步確認。圖 1 所示的試驗流程能減少實驗動物的用量，因為若第一項 *in vivo* 試驗即已呈現陽性，則無須進行第二項 *in vivo* 試驗。若替代性試驗已經預測藥品將對 EFD 產生不良影響，再以 *in vivo* EFD 試驗去試圖否定替代性試驗測得的陽性反應，實屬無益之舉。

圖1 以替代性試驗測試預期對胚胎-胎兒具毒性之藥品



- (1) 若在臨床相關性的外推暴露量下觀察到明顯 MEFL 訊號，則無須進行進一步評估。
- (2) 亦可以 pEFD 試驗代替，但須以具相關性的物種與決定性試驗確認陰性結果。
- (3) 依圖中所示逐步進行 *in vivo* EFD 試驗能減少實驗動物的用量，因為若第一項 *in vivo* 試驗即已呈現陽性，則無須進行第二項 *in vivo* 試驗。

3. 針對令病人極度衰弱或有生命危險(SDLT)之特定疾病的藥品

當考量可治療 SDLT 疾病(與嚴重性較低之慢性病相較)病人之藥品的風險與效益時，由於病人懷孕的可能性極低，所以將通過驗證的替代性試驗納入 EFD 風險評估的一環是適當的做法(見附錄 2 圖 2)。

當某一替代性試驗明確預測藥品在具臨床相關性的外推暴露量下對第一個物種(例如大鼠)為 MEFL 陽性時，則在個案基礎上可視為已充分顯示該藥品對 EFD 具有風險。但是，若其試驗結果為難以定論或可能呈偽陽性反應，則須以一到兩個物種的實驗動物作決定性 *in vivo* EFD 試驗，以輔助人體風險評估。若在適當之臨界暴露值下，在兩個物種的決定性 *in vivo* 試驗中皆無法觀察到 EFD 訊號，則替代性試驗的結果可視為對人體的風險顧慮極小。但是若該替代性試驗已經過驗證可預測人類 MEFL(即不僅限於預測動物的 MEFL)，則需要 提供額外數據(如機制或遺傳數據)以佐證該替代性試驗結果確實為偽陽性反應。如果兩項 *in vivo* 試驗中有一項或兩項都指出藥品具有 EFD 毒性，則該藥品即視為對 EFD 具有風險。依附錄 2 圖 2 所示逐步進行 *in vivo* EFD 試驗能減少實驗動物的用量，因為若第一項 *in vivo* 試驗即已呈現陽性，則無須進行第二項 *in vivo* 試驗。

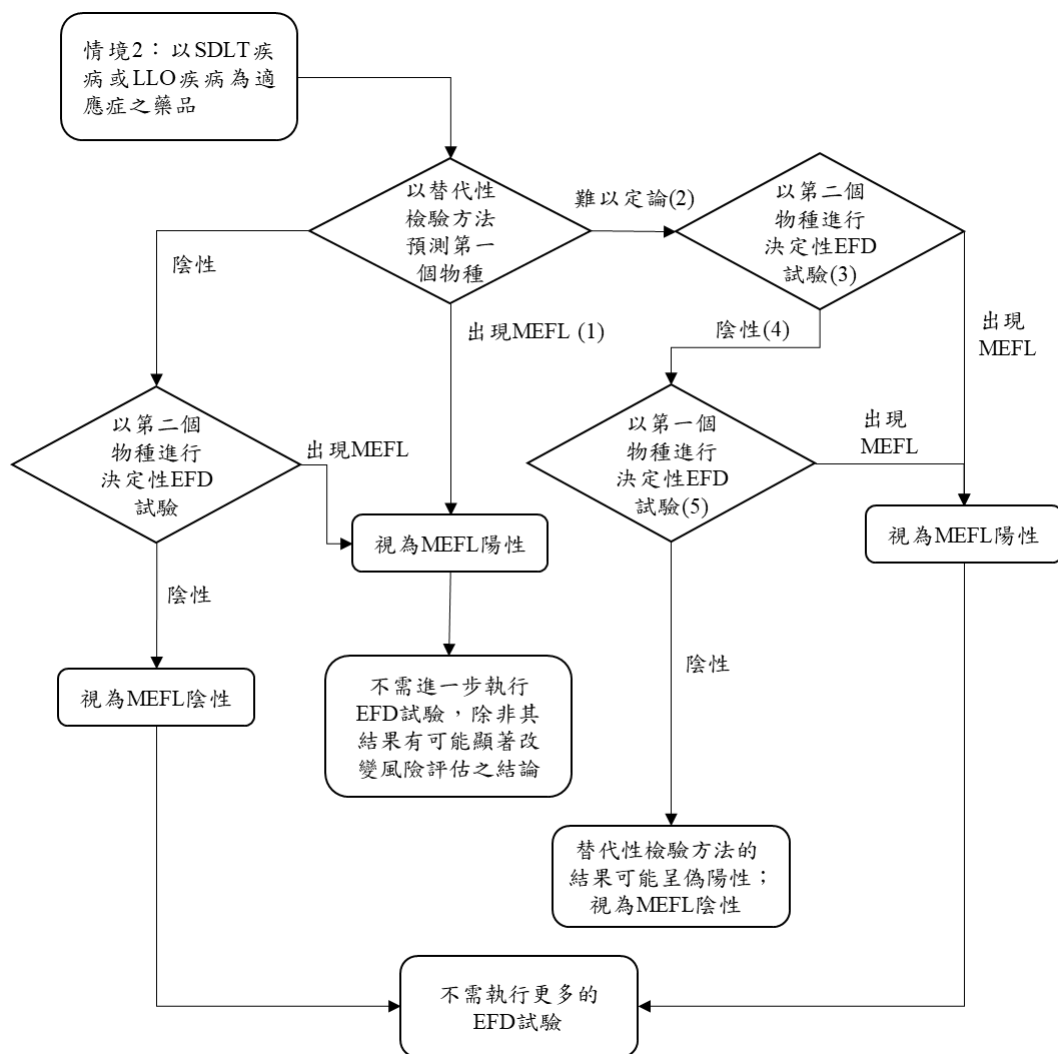
若對第一個物種的替代性試驗預測結果為陰性(即無 MEFL)，應對第二個物種作決定性 *in vivo* EFD 試驗以進一步確認，若試驗結果呈陽性，則該藥品視為對 EFD 具風險；結果呈陰性，則該藥品視為對 EFD 不具風險，且大體上不須再作進一步測試，除非判斷進一步測試的結果有可能顯著改變風險評估之結論。

4. 針對老年才發作(LLO)的疾病之藥品

某些疾病通常僅在老年人身上診斷得到，但仍有極低的機會在具生育能力的婦女身上診斷出此類疾病，例如好發於 60 歲以上老年人的大疱性類天疱瘡(bullous pemphigoid)。考量到 LLO 疾病之女性病人普遍生育能力極低，此病人族群因為使用此類藥品導致生殖缺陷發生率上升的可能性亦極低，因此是否有必要進行 EFD 評估應逐案審定。此外，此一情況並非假設接受治療的病人族群均已無生育能力(例如停經後骨質疏鬆症)，但是對已無生育能力的病人通常已無進行 EFD 評估的必要。

在此情境下的試驗策略與 SDLT 疾病的策略相似，唯一不同之處在於對第二個物種進行的首次 *in vivo* 評估可以比照 pEFD 試驗來操作。

圖 2 以替代性試驗測試SDLT 疾病或 LLO 疾病



- (1) 在具臨床相關性的外推暴露量下觀察到明顯為MEFL陽性的訊號，則在個案基礎上可視為已充分顯示藥品對EFD具有毒性，無須進一步作評估。
- (2) 雖然可使用pEFD試驗，須在兩個物種的決定性 *in vivo* EFD試驗都得到陰性結果才能確定替代性試驗的結果為偽陽性。
- (3) 對於LLO疾病，考量到病人族群懷孕可能性極低，通常對第二個物種作pEFD試驗即已足夠。
- (4) 如圖所示逐步進行 *in vivo* EFD試驗能減少實驗動物的用量，因為若第一項 *in vivo*試驗已呈現陽性，則無須進行第二項 *in vivo*試驗。
- (5) 與預計由替代性試驗作預測的物種相同。

縮寫列表

1. DART	developmental and reproductive toxicity,	生殖與發育毒性
2. DRF	dose range finding,	劑量範圍
3. EFD	embryo-fetal development,	胚胎-胎兒發育
4. FEED	fertility and early embryonic development,	生殖能力與胚胎早期發育
5. GLP	good laboratory practice,	優良實驗室操作
6. MFD	maximum feasible dose,	最高可投予劑量
7. MRHD	maximum recommended human dose,	最大建議人類用量
8. NOAEL	no observed adverse effect level,	無明顯不良反應劑量
9. PEFD	preliminary embryo-fetal development,	初步胚胎 - 胎兒發育
10. PPND	pre-and postnatal development,	產前與產後發育
11. ePPND	enhanced PPND,	加強型 PPND
12. TK	toxicokinetics,	毒物動力學
13. WOCBP	women of childbearing potential,	具生育力之女性