

药物单次给药毒性研究技术指导原则

二〇一四年五月

药物单次给药毒性研究技术指导原则

一、概述

急性毒性（Acute toxicity）是指药物在单次或 24 小时内多次给予后一定时间内所产生的毒性反应^[1,2]。狭义的单次给药毒性研究（Single dose toxicity study）是考察单次给予受试物后所产生的急性毒性反应^[2]。本指导原则所指为广义的单次给药毒性研究，可采用单次或 24 小时内多次给药的方式获得药物急性毒性信息。

拟用于人体的药物通常需要进行单次给药毒性试验（见注释 1）。单次给药毒性试验对初步阐明药物的毒性作用和了解其毒性靶器官具有重要意义。单次给药毒性试验所获得的信息对重复给药毒性试验的剂量设计和某些药物临床试验起始剂量的选择具有重要参考价值，并能提供一些与人类药物过量所致急性中毒相关的信息^[1]。

本指导原则适用于中药、天然药物和化学药物。

二、基本原则

（一）试验管理

用于支持药品注册的单次给药毒性试验必须执行《药物非临床研究质量管理规范》（GLP）。

（二）具体问题具体分析

单次给药毒性试验的设计，应该在对受试物认知的基础上，遵循“具体问题具体分析”的原则。

对于化学药，应根据受试物的结构特点、理化性质、同类化合物情况、适应症和用药人群特点、试验目的等选择合适的试验方法，设计适宜的试验方案，并结合其他药理毒理研究信息对试验结果进行全面的评价。

对于中药和天然药物，还应考虑到其与化学药的不同特点，试验时应根据各自不同的情况进行针对性设计。

（三）随机、对照、重复

单次给药毒性试验应符合动物试验的一般基本原则，即随机、对照和重复。

三、基本内容

（一）受试物

中药、天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。应注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。当给药时间较长时，应考察配制后体积是否存在随放置时间延长而膨胀造成终浓度不准的因素。如果由于给药容量或给药方法限制，可采用原料药进行试验。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格及生产单位。

化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。受试物应注明名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格和生产单位等，并符合试验要求。

在药物研发的过程中，若受试物的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。

化学药物试验过程中应进行受试物样品分析，并提供样品分析报告。成分基本清楚的中药、天然药物也应进行受试物样品分析。

（二）实验动物^[1、3、4]

1. 种属：不同种属的动物各有其特点，对同一受试物的反应可能会有所不同。从充分暴露受试物毒性的角度考虑，采用不同种属的动物进行试验可获得较为充分的安全性信息。因此，对于化学药，单次给药毒性试验应采用至少两种哺乳动物进行试验，一般应选用一种啮齿类动物和一种非啮齿类动物。若未采用非啮齿类动物进行试验，应阐明其合理性。对于中药、天然药物，根据具体情况，可选择啮齿类和/或非啮齿类动物进行试验[参见附录（二）]。

实验动物应符合国家对相应等级动物的质量规定要求，并具有实验动物质量合格证明。

2. 性别：通常采用两种性别的动物进行试验，雌雄各半。若采用单性别动物进行试验，应阐明其合理性。

3. 年龄：通常采用健康成年动物进行试验。如果受试物拟用于或可能用于儿童，必要时应采用幼年动物进行试验。

4. 动物数：应根据动物种属和研究目的确定所需的动物数。动物数应符合试验方法及结果分析评价的需要。

5. 体重：试验中的每批动物初始给药时的体重差异不宜过大，啮齿类动物初始给药时体重不应超过或低于平均体重的 20%。

（三）给药途径

给药途径不同，受试物的吸收速度、吸收率和暴露量会有所不同。通常情况下给药途径应至少包括临床拟用途径。如不采用临床拟用途径，应说明理由。

（四）试验方法与给药剂量^[1、3、4]

单次给药毒性试验的重点在于观察动物出现的毒性反应。单次给药毒性试验的试验方法较多，常用的试验方法有近似致死量法、最大给药量法、最大耐受量法、固定剂量法、上下法（序贯法）、累积剂量法（金字塔法）、半数致死量法等。应根据受试物的特点选择合适的方法，根据不同的试验方法选择合适的剂量（注释 2）。

原则上，给药剂量应包括从未见毒性反应的剂量到出现严重毒性反应的剂量，或达到最大给药量。

不同动物和给药途径下的最大给药容量可参考相关文献及根据实际情况来确定。

根据所选择的试验方法，必要时应设置空白和/或溶媒（辅料）对照组。

考虑到胃内容物会影响受试物的给药容量，而啮齿类动物禁食时间的长短会影响到受试物的肠道内吸收和药物代谢酶活性，从而影响毒性的暴露。因此，动物经口给药前一般应进行一段时间的禁食，不禁水。

（五）观察时间与指标^[1、3、4、5]

给药后，一般连续观察至少 14 天，观察的间隔和频率应适当，以便能观察到毒性反应的出现时间及恢复时间、动物死亡时间等。如果毒性反应出现较慢或恢复较慢，应适当延长观察时间。

观察指标包括临床症状（如动物外观、行为、饮食、对刺激的反应、分泌物、排泄物等）、死亡情况（死亡时间、濒死前反应等）、体重变化（给药前、观察期结束时各称重一次，观察期间可多次称重，动物死亡或濒死时应称重）等。记录所有的死亡情况，出现的症状以及症状的起始时间、严重程度、持续时间，体重变化等。

所有的试验动物应进行大体解剖。试验过程中因濒死而安乐死的动物、死亡动物应及时进行大体解剖，其他动物在观察期结束后安乐死并进行大体解剖。当组织器官出现体积、颜色、质地等改变时，应进行组织病理学检查。

在一些情况下，为获得更为全面的急性毒性信息，可设计多个剂量组，观察更多的指标，如血液学指标、血液生化学指标、组织病理学检查等，以更好地确定毒性靶器官或剂量反应关系^[2、5]。

四、结果分析与评价

(一) 根据所观察到的各种反应出现的时间、持续时间及严重程度等，分析各种反应在不同剂量时的发生率、严重程度。对观察结果进行归纳分析，判断每种反应的剂量—反应及时间—反应关系。

(二) 判断出现的各种反应可能涉及的组织、器官或系统[参考附录(一)]等。

(三) 根据大体解剖中肉眼可见的病变和组织病理学检查的结果，初步判断可能的毒性靶器官。应出具完整的组织病理学检查报告，检查报告应详细描述，尤其是有异常变化的组织。对于有异常变化者，应附有相应的组织病理学照片。

(四) 说明所使用的计算方法和统计学方法，必要时提供所选用方法合理性的依据。

(五) 根据各种反应在不同剂量下出现的时间、发生率、剂量-反应关系、不同种属动物及实验室的历史背景数据、病理学检查结果以及同类药物的特点，判断所出现的反应与药物的相关性。判断受试物引起的毒性反应性质、严重程度、可恢复性以及安全范围；根据毒性可能涉及的部位，综合大体解剖和组织病理学检查的结果，初步判断毒性靶器官。

单次给药毒性试验的结果可作为后续毒理试验剂量选择的参考，也可提示一些后续毒性试验需要重点观察的指标。

五、名词解释

最大给药量 (Maximal feasible dose, MFD): 指动物单次或 24 小时内多次 (2~3 次) 给药所采用的最大给药剂量。

最大耐受量 (Maximal tolerance dose, MTD): 是指动物能够耐受的而不引起动物死亡的最高剂量。

半数致死量 (Median lethal dose, LD₅₀): 预期引起 50% 动物死亡的剂量, 该值是经统计学处理所推算出的结果。

六、参考文献

1. CDER, FDA. Guidance for industry: single dose acute toxicity testing for pharmaceuticals (Final).1996.
2. CHMP, EMA. Questions and answers on the withdrawal of the “Note for guidance on single dose toxicity”.2010.
3. Cordier A. Single dose toxicity: Industry perspectives. In: P.F. D’Arcy and D.W.G. Harron edited, Proceedings of the First International Conference on Harmonization. Brussels: 1991,189-191.
4. Outcome - Single dose toxicity. In: P.F. D’Arcy and D.W.G. Harron edited, Proceedings of the First International Conference on Harmonization. Brussels: 1991, 184.
5. ICH M3(R2) .Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals.2009.

6. BlazkaME, Hayes A W. Acute toxicity and eye irritancy. In: Hayes A W edited, Principles and methods of toxicology. Fifth edition, 2007:1132-1150.

七、注释

注释 1: 急性毒性的充分信息也可从其他来源获得^[2, 5], 需要说明的是, 这些信息应是从执行《药物非临床研究质量管理规范》(GLP) 的试验中获得。

注释 2: 试验方法不同, 所采用的给药剂量不同。可参考相关的文献进行试验设计。但应注意, 由于中药、天然药物的预期临床用药剂量通常较大, 因此单次给药毒性试验方法中所规定的剂量限度(如上下法中的 2000mg/kg 或 5000mg/kg 的剂量限度) 仅适用于化学药, 中药、天然药物的剂量设计应综合考虑多方面因素进行确定。

由于大多数中药、天然药物的急性毒性可能相对较低, 中药、天然药物常常采用最大给药量(或最大耐受量法) 进行急性毒性研究。

八、附录

(一) 一般观察与指征^[6]

以下列出了一些常见的观察指征及其可能涉及的组织、器官和系统。单次给药毒性试验中, 可能需要对该表格中列出的全部或部分指征进行观察。该表格仅作为结果分析评价的参考, 其他科学、合理的分析均是可以接受的。

观察		指征	可能涉及的组织、器官或系统
I. 鼻孔呼吸阻塞, 呼吸频率和深度改变, 体表颜色改变	A	呼吸困难: 呼吸困难或费力, 喘息, 通常呼吸频率减慢	
		1. 腹式呼吸: 膈膜呼吸, 吸气时膈膜向腹部偏移	CNS 呼吸中枢, 肋间肌麻痹, 胆碱能神经麻痹
		2. 喘息: 吸气很困难, 伴随有喘息声	CNS 呼吸中枢, 肺水肿, 呼吸道分泌物蓄积, 胆碱能功能增强
	B	呼吸暂停: 用力呼吸后出现短暂的呼吸停止	CNS 呼吸中枢, 肺心功能不全
	C	紫绀: 尾部、口和足垫呈现青紫色	肺心功能不全, 肺水肿
	D	呼吸急促: 呼吸快而浅	呼吸中枢刺激, 肺心功能不全
E	鼻分泌物: 红色或无色	肺水肿, 出血	
II. 运动功能: 运动频率和特征的改变	A	自发活动、探究、梳理、运动增加或减少	躯体运动, CNS
	B	嗜睡: 动物嗜睡, 但可被针刺唤醒而恢复正常活动	CNS 睡眠中枢
	C	正位反射(翻正反射)消失: 动物体处于异常体位时所产生的恢复正常体位的反射消失	CNS, 感觉, 神经肌肉
	D	麻痹: 正位反射和疼痛反应消失	CNS, 感觉
	E	僵住: 保持原姿势不变	CNS, 感觉, 神经肌肉, 自主神经
	F	共济失调: 动物行走时无法控制和协调运动, 但无痉挛、局部麻痹、轻瘫或僵直	CNS, 感觉, 自主神经
	G	异常运动: 痉挛, 足尖步态, 踏步, 忙碌, 低伏	CNS, 感觉, 神经肌肉
	H	俯卧: 不移动, 腹部贴地	CNS, 感觉, 神经肌肉
	I	震颤: 包括四肢和全身的颤抖和震颤	神经肌肉, CNS
	J	肌束震颤: 包括背部、肩部、后肢和足趾肌肉的运动	神经肌肉, CNS, 自主神经
III. 惊厥(癫痫发作): 随意肌明显的自主收缩或痉挛性收缩	A	阵挛性惊厥: 肌肉收缩和松弛交替性痉挛	CNS, 呼吸衰竭, 神经肌肉, 自主神经
	B	强直性惊厥: 肌肉持续性收缩, 后肢僵硬性伸展	CNS, 呼吸衰竭, 神经肌肉, 自主神经
	C	强直性-阵挛性惊厥: 两种惊厥类型交替出现	CNS, 呼吸衰竭, 神经肌肉, 自主神经
	D	窒息性惊厥: 通常是阵挛性惊厥并伴有喘息和紫绀	CNS, 呼吸衰竭, 神经肌肉, 自主神经
	E	角弓反张: 背部弓起、头向背部抬起的强直性痉挛	CNS, 呼吸衰竭, 神经肌肉, 自主神经

观察		指征	可能涉及的组织、器官或系统
IV. 反射	A	角膜性眼睑闭合反射: 接触角膜导致眼睑闭合	感觉, 神经肌肉
	B	基本条件反射: 轻轻敲击耳内表面, 引起外耳抽搐	感觉, 神经肌肉
	C	正位反射: 翻正反射的能力	CNS, 感觉, 神经肌肉
	D	牵张反射: 后肢被牵拉至从某一表面边缘掉下时缩回的能力	感觉, 神经肌肉
	E	对光反射: 瞳孔反射; 见光瞳孔收缩	感觉, 神经肌肉, 自主神经
	F	惊跳反射: 对外部刺激(如触摸、噪声)的反应	感觉, 神经肌肉
V. 眼检指征	A	流泪: 眼泪过多, 泪液清澈或有色	自主神经
	B	缩瞳: 无论有无光线, 瞳孔缩小	自主神经
	C	散瞳: 无论有无光线, 瞳孔扩大	自主神经
	D	眼球突出: 眼眶内眼球异常突出	自主神经
	E	上睑下垂: 上睑下垂, 针刺后不能恢复正常	自主神经
	F	血泪症: 眼泪呈红色	自主神经, 出血, 感染
	G	瞬膜松弛	自主神经
	H	角膜浑浊, 虹膜炎, 结膜炎	眼睛刺激
VI. 心血管指征	A	心动过缓: 心率减慢	自主神经, 肺心功能不全
	B	心动过速: 心率加快	自主神经, 肺心功能不全
	C	血管舒张: 皮肤、尾、舌、耳、足垫、结膜、阴囊发红, 体热	自主神经、CNS、心输出量增加, 环境温度高
	D	血管收缩: 皮肤苍白, 体凉	自主神经、CNS、心输出量降低, 环境温度低
	E	心律不齐: 心律异常	CNS、自主神经、肺心功能不全, 心肌梗塞
VII. 流涎	A	唾液分泌过多: 口周毛发潮湿	自主神经
VIII. 竖毛	A	毛囊竖毛组织收缩导致毛发蓬乱	自主神经
IX. 痛觉缺失	A	对痛觉刺激(如热板)反应性降低	感觉, CNS
X. 肌张力	A	张力低下: 肌张力全身性降低	自主神经
	B	张力过高: 肌张力全身性增高	自主神经
XI. 胃肠指征			
排便(粪)	A	干硬固体, 干燥, 量少	自主神经, 便秘, 胃肠动力
	B	体液丢失, 水样便	自主神经, 腹泻, 胃肠动力
呕吐	A	呕吐或干呕	感觉, CNS, 自主神经(大鼠无呕吐)
多尿	A	红色尿	肾脏损伤
	B	尿失禁	自主感觉神经
XII. 皮肤	A	水肿: 液体充盈组织所致肿胀	刺激性, 肾功能衰竭, 组织损伤, 长时间静止不动
	B	红斑: 皮肤发红	刺激性, 炎症, 过敏

（二）不同情况的中药、天然药物单次给药毒性试验的要求

由于中药、天然药物的特殊性，在具体进行试验时可参照以下要求进行；如不按以下要求进行，应充分说明理由。

1. 未在国内上市销售的从中药、动物、矿物等物质中提取的有效成分及其制剂，新发现的药材及其制剂，新的中药材代用品、药材新的药用部位及其制剂，未在国内上市销售的从中药、动物、矿物等物质中提取的有效部位制成的制剂，未在国内上市销售的中药、天然药物注射剂。

以上情况，由于其物质基础较传统中药发生了明显改变，或应用经验较少，一般采用啮齿类和非啮齿类两种动物，全面考察受试物的急性毒性反应情况。如不按以上要求进行，应说明理由。

2. 未在国内上市销售的非注射给药的中药、天然药物复方制剂。

如该复方制剂处方组成符合中医药理论，有一定的临床应用经验，一般情况下，可采用一种动物、按临床拟用途径进行急性毒性反应的观察。

如该复方制剂为天然药物复方制剂，建议采用啮齿类和非啮齿类两种动物，按临床拟用途径进行急性毒性反应的观察；如不按以上要求进行，应阐明其合理性。

如以上制剂处方中含有天然药物、有效成分或化学药品，则应当对上述药用物质进行急性毒性的相互作用研究。

3. 改变国内已上市销售中药、天然药物给药途径（不包括由非注射剂改为注射剂）的制剂。

可仅采用一种动物，比较改变前后两种不同给药途径的急性毒性反应。

4. 改变国内已上市销售药品剂型或改变生产工艺但不改变给药途径的中药、天然药物复方制剂。

如生产工艺的改变会引起物质基础的明显改变，或对药物的吸收、利用可能产生明显影响，建议采用一种动物，按临床拟用途径比较改变前后的急性毒性反应。

5. 增加新的适应症或者功能主治的品种。

如需延长用药周期或增加剂量者，应结合原有毒理学资料及处方组成等情况确定是否还需要进行单次给药毒性试验以及相应的试验内容。

