

指导原则编号:

【	Z	】	G	P	T	3	-	1
---	---	---	---	---	---	---	---	---

# 中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则

二〇〇五年三月

# 目 录

一、概述.....	1
二、基本原则.....	2
(一) 实验管理.....	2
(二) 具体问题具体分析.....	2
(三) 整体性.....	2
(四) 试验设计.....	2
三、基本内容.....	3
(一) 受试物.....	3
(二) 试验动物.....	3
(三) 给药途径.....	3
(四) 给药频率.....	4
(五) 给药期限.....	4
(六) 给药剂量.....	5
(七) 观察指标.....	6
(八) 观察指标的时间和次数.....	8
(九) 结果及分析.....	8
(十) 综合评价.....	9
(十一) 其他考虑.....	10
四、不同情况的中药、天然药物长期毒性试验的要求.....	10
五、参考文献.....	12
六、附录.....	13
(一) 长期毒性试验的给药期限.....	13
(二) 长期毒性试验中一般需检测的指标.....	13
(三) 毒性药材.....	16
七、著者.....	16

# 中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则

## 一、概述

长期毒性试验是重复给药的毒性试验的总称，描述动物重复接受受试物后的毒性特征，它是非临床安全性评价的重要内容。

中华人民共和国卫生部于 1994 年颁发的《中药新药研究指南》和国家药品监督管理局 1999 年颁发的《中药新药药理毒理研究的技术要求》，对于统一、规范中药长期毒性试验，推动我国中药的研究和开发起到了积极的作用。但随着新药研究手段的不断改进，对中药、天然药物认识的进一步深入，这些要求越来越表现出它的局限性。

长期毒性试验的主要目的应包括以下五个方面：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-反应和时间-反应关系、可逆性等；②推测受试物重复给药的临床毒性靶器官或靶组织；③预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为临床试验中的解毒或解救措施提供参考信息。

中药在我国已有几千年的应用历史，有丰富的临床应用经验，相对化学药而言多数中药具有毒性较低的特点。但是，中药的低毒和无毒是相对的。当前，各种新技术、新工艺不断应用于中药新药的开发，而且从中药、天然药物中提取的有效成分、有效部位及其制剂日益增多，已不完全等同于传统意义上的中药，因此对其非临床安全性评价应给予足够的重视。长期毒性试验周期长，耗资高，工作量大，若因试验设计不合理，或所进行的试验未充分揭示中药的毒性特征，则会造成人力、物力、财力的浪费，

也会影响新药的研究速度。充分认识长期毒性试验的重要性，合理、科学地进行长期毒性试验设计，对试验结果进行科学的分析，是新药非临床安全性评价的基本要求。

本指导原则是根据中药、天然药物的特点，结合国际上药物安全性评价的要求和我国药物安全性评价研究现状而制订的。

本指导原则适用于中药、天然药物的长期毒性试验研究。

## 二、基本原则

### （一）实验管理

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

### （二）具体问题具体分析

中药、天然药物的情况复杂，本文所提及的内容不可能涵盖中药、天然药物长期毒性试验的全部实际情况，在进行中药、天然药物长期毒性研究时，应遵循“具体问题具体分析”的原则。

### （三）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研究结果互为印证、说明和补充。

### （四）试验设计

试验设计应符合随机、对照、重复的原则。

### 三、基本内容

#### (一) 受试物

长期毒性试验的受试物应能充分代表临床试验受试物和上市药品，因此受试物应采用制备工艺稳定、符合临床试用质量标准规定的样品，一般用中试样品，并注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等。如不采用中试样品，应有充分的理由。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/或辅料应标明批号、规格及生产厂家。

#### (二) 试验动物

长期毒性试验一般需采用两种动物进行，一种为啮齿类，常用大鼠；另一种为非啮齿类，常用 Beagle 犬或猴。所用动物应符合国家有关药物非临床安全性研究的要求。

长期毒性试验一般选择健康、体重均一的动物，雌性应未孕。必要时，也可选用疾病模型动物进行试验。

原则上，动物应雌雄各半。当临床拟用于单性别时，可采用相应性别的动物。

应根据研究期限的长短和受试物的使用人群范围确定动物的年龄。一般情况下，大鼠为 6~9 周龄；Beagle 犬为 6~12 月龄。

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。一般大鼠可为雌、雄各 10~30 只，犬或者猴可为雌、雄各 3~6 只。

#### (三) 给药途径

原则上应与临床拟用药途径相同。如选择其他的给药途径，应说明理由。

#### (四) 给药频率

原则上应每天给药，且每天给药时间相同。试验周期长（3个月或以上）者，也可采取每周给药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。

#### (五) 给药期限

长期毒性试验给药期限的长短，通常与拟定的临床疗程长短、临床适应症、用药人群相关，应充分考虑预期临床的实际疗程。

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。

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

临床疗程超过2周的药物，可以在临床前一次性进行支持药物进入III期临床试验的长期毒性试验。如长期毒性试验拟定给药期限在三个月以上，可先对三个月中期试验报告（应有一般状况观察、血液学指标、血液生化学指标、体温、眼科、尿液、心电图、系统尸解、脏器系数、组织病理学等检查）进行评价，判断是否可进行临床研究。但在进行III期临床试验前，必须完成全程长期毒性试验研究资料。

临床疗程超过2周的药物，也可以根据具体情况，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。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、检测指标等方面的参考；另一方面，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，有利于降低

药物开发的风险。

一般药物的长期毒性试验给药期限，可参考附录（一）。

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 期临床试验时，不同给药期限的长期毒性试验的内容不应简化。无论采用何种模式，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。

当受试物预期会长期使用，或用于反复发作性疾病等而需经常反复给药时，应进行最长试验期限的长期毒性试验。当功能主治有若干项的，应按照临床最长疗程的功能主治来确定长期毒性试验的给药期限。如临床给药需采用多个疗程，疗程之间间隔时间不足以使受试物可能对机体组织器官造成的损害恢复，则需按多个疗程的时间之和作为参照的临床疗程；如疗程间隔时间基本可判断足以使受试物可能对机体组织器官造成的损害恢复，则可按单个疗程的时间作为参照的临床疗程。

## （六）给药剂量

一般情况下，至少应设 3 个剂量组和溶媒或赋形剂对照组，必要时还需设立空白对照组和/或阳性对照组。低剂量组原则上应高于动物药效学试验的等效剂量或预期的临床治疗剂量的等效剂量。高剂量组原则上应使动物产生明显的毒性反应，甚至可引起少量动物死亡（对于毒性较小的中药，可尽量采用最大给药量）。在高、低剂量之间至少应再设一个中剂量组。

以上仅是剂量设计的一般原则，应根据实际情况进行合理的剂量设计，如出现未预期的毒性反应或不出现毒性反应时，可在设计更长时间的长期毒性试验时适当调整剂量。

若受试物在饮食或饮水中给予时，应能充分保证受试物的均一性、稳定性和定量摄入，提供相关的检测报告，并应根据动物生长和体重的变化情况而调整在饮食或水中的剂量。局部给药时，应尽可能保证给药剂量的准确性及与局部充分接触的时间。

### **(七) 观察指标**

原则上，除常规观察指标外，还应根据受试物的特点、在其他试验中已观察到的某些改变，或其他的相关信息（如处方中组成成分有关毒性的文献），增加相应的观测指标。以下仅列出常规需观察的指标。

#### **1、一般状况观察**

在试验期间，应观察动物外观体征、行为活动、腺体分泌、呼吸、粪便、摄食量、体重、给药局部反应。

#### **2、血液学指标**

一般血液学检测指标参见附录（二）1，至少应观察红细胞计数、血红蛋白、白细胞计数及其分类、血小板、网织红细胞计数、凝血酶原时间等。当受试物可能对造血系统有影响时，应进一步进行骨髓的检查。

#### **3、血液生化学指标**

一般血液生化学检测指标参见附录（二）2。

#### **4、体温、眼科检查、尿液检查、心电图检查**

非啮齿类动物还应进行体温、眼科检查、尿液检查、心电图检查等。尿液检查指标参见附录（二）3。

#### **5、系统尸解和组织病理学检查**

##### **5.1 系统尸解**

应对所有动物进行尸解，尸解应全面细致，为组织病理学检查提供参考。具体脏器、组织参见附录（二）4。

## 5.2 脏器系数

应对脏器进行称重，并计算脏器系数。具体脏器、组织参见附录（二）4。

## 5.3 组织病理学检查

当所用动物为非啮齿类动物时，因动物数较少，应对所有剂量组、所有动物的器官和组织进行组织病理学检查。当所用动物为啮齿类动物时，应对高剂量组和对照组的器官和组织进行组织病理学检查，如果高剂量组出现组织病理学变化时，更低剂量组也应进行组织病理学检查以确定剂量-反应关系。若在尸检时发现器官和组织有肉眼可见的病理变化时，应对此脏器或组织进行详细的组织病理学检查。应注意对脏器和组织的标本取材保存。高剂量组发现有异常病变时，应对保存的更低剂量组的相应脏器、组织标本进行检查。必要时还应增加其他器官组织的检查。如发现异常变化，应附有相应的组织病理学照片。组织病理学检查报告应经检查者签名和病理检查单位盖章。

有效成分或有效部位制成的制剂所需检查的脏器和组织参考附录（二）4。

中药、天然药物复方制剂，成分复杂，靶点多，效应广泛，理论上应尽可能多地进行组织病理学的检查，以寻找可能的毒性作用靶器官、靶组织。但是，由于中药复方制剂有中医药理论的指导，对其毒性反应有一定的临床认识，天然药物复方制剂的组分也可能有一定的临床认识，如有合理的理由说明所申报的中药、天然药物复方制剂有一定的安全性，所检查的脏器和组织可减少为：心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、小肠、大肠、垂

体、脊髓、骨髓、淋巴结、膀胱、睾丸、附睾、子宫、卵巢、胸腺、肾上腺及给药局部组织等。此外，根据所含中药的性、味、功效、主治等不同情况，可能需增加相应的组织病理学检查；根据受试物特性和初步试验结果，也可能需要进行更进一步的组织病理学检查。

#### （八）观察指标的时间和次数

应根据试验期限的长短和受试物的特点而确定试验期间观察指标的时间和次数，原则上应尽早、及时发现出现的毒性反应。

试验前，啮齿类动物至少应进行适应性观察 5 天，非啮齿类至少应驯养观察 1~2 周，应对试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、有关血液学和血液生化学指标的检测。此外，试验动物相关指标的历史数据在长期毒性试验中也具有重要的参考意义。

试验期间，一般状况和征状观察，应每天观察一次，饲料消耗和体重应每周记录一次。大鼠体重应雌雄分开进行计算。试验结束时应进行一次全面的检测。当给药期限较长时，应根据受试物的特点选择合适的时间进行中期阶段性的检测。

长期毒性试验应在给药结束时留存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。恢复期观察期间除不给受试物外，其他观察内容与给药期间相同。

在试验期间，对濒死或死亡动物应及时检查并分析原因。

#### （九）结果及分析

试验报告应全面客观反映整个试验过程收集的原始资料和信息，应详细描述毒性的主要表现、大体解剖检查和/或病理组织学检查结果等，并说明数据处理的统计学方法，如用计算机处理数据，应说明所用软件。结果应以清楚、准确的方式来表示。

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。只有通过科学分析和评价才能够清楚描述动物的毒性反应，并推测其与人体的相关性，因此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。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。

应重视对动物中毒或死亡原因的分析，注意观察毒性反应出现的时间和恢复的时间及动物的死亡时间。应对所获取的数据进行全面和科学的分析，对在正常范围以外的各实测值应在试验结果中详细列出，对异常数据予以合理的分析。在分析长期毒性试验结果时，应正确理解均值数据和单个数据的意义，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的结果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与该实验室的历史数据相比较。

根据长期毒性试验结果，分析讨论需在临床、质量可控性研究中注意的问题。长期毒性试验结果还应结合其他相关安全性试验及药/毒代动力学的结果进行分析。

## （十）综合评价

1. 应结合其他安全性试验的毒性反应情况，判断毒性反应是否存在种属差异，是否需进行进一步的研究。

2. 应结合非临床药效学试验结果和拟临床适应症，判断有效性与毒性反应的关系，判断药物对正常动物和模型动物的生理生化指标的改变是否相同或相似，并注意提示临床研究应注意的问题。

对受试物引起的严重毒性反应，应尽可能查找产生毒性的原因，根据相关文献资料或试验资料，推测可能的毒性成分，提出是否需对方工艺及处方中的某些药材或某些成分进行特别控制等。

3. 结合临床主治（适应症），权衡利弊，考虑其开发前景。

#### **（十一）其他考虑**

某些其他安全性试验项目，如一般药理学研究中的心血管系统等指标的观察、注射给药局部刺激性的观察、免疫毒理研究、有依赖倾向受试物的依赖性观察、毒代动力学研究等均可结合长期毒性试验同时进行。在所进行的试验中，尽量获取更多的和所需要的信息。鼓励创新药进行毒代动力学研究。

因有些中药已有一定的临床应用经验，对受试物的长期毒性试验可结合以往的临床应用、文献情况及其他试验结果进行综合评价。

#### **四、不同情况的中药、天然药物长期毒性试验的要求**

考虑到中药、天然药物各类药物处方来源、立题依据等的不同，在具体进行试验时可参照以下要求进行。但这些要求仅是一般要求，研制者应遵循新药开发的客观规律，具体试验时应根据受试物自身特点、具体情况来进行设计，考虑需进行哪些研究。

1. 未在国内上市销售的从中药、天然药物中提取的有效成分及其制剂，未在国内上市销售的来源于植物、动物、矿物等药用物质制成的制剂，未在国内上市销售的中药材新的药用部位制成的制剂，未在国内上市销售的从中药、天然药物中提取的有效部位制成的制剂，未在国内上市销售的由中药、天然药物制成的注射剂

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，为全面考察受试物的长期毒性反应情况，应采用两种动物进行长期毒性试验（建议为啮齿类和非啮齿类），并仔细分析产生毒性反应的原因。

2. 未在国内上市销售的由中药、天然药物组成的非注射给药的复方制剂

若处方中各味药材均符合法定标准，无毒性药材，无十八反、十九畏等配伍禁忌，又未经化学处理（水、乙醇粗提除外），急性毒性试验（采用最大给药容量、最大给药浓度）未见明显毒性反应，临床实际用药期为 1 周以内者，可免做长期毒性试验。

临床用药超过一周，未在国内上市销售的由中药、天然药物组成的非注射给药的复方制剂，可先进行一种动物（啮齿类）的长期毒性试验，当发现明显毒性时，为进一步研究毒性情况，再采用第二种动物（非啮齿类）进行研究。若该类处方中含有毒性药材（见附录 IV）、无法定标准药材或有十八反、十九畏等配伍禁忌时，则应进行两种动物（啮齿类和非啮齿类）的长期毒性试验。

3. 改变国内已上市销售药品给药途径（不包括由非注射剂改为注射剂）的制剂、不改变给药途径的非注射给药改剂型制剂和改工艺制剂

若处方中各味药材均符合法定标准，无毒性药材，无十八反、十九畏等配伍禁忌，又未经化学处理（水、乙醇粗提除外），急毒试验（采用最大给药容量、最大给药浓度）未见明显毒性反应，临床实际用药期为 1 周以内者，可免做长期毒性试验。

临床用药超过一周，建议增设一个原给药途径、原剂型或原工艺的高剂量对照组，先进行一种动物（啮齿类）的长期毒性试验。如发现与原给药途径、原剂型或原工艺制剂不同的明显毒性反应或更严重的毒性反应，应进行另一种动物（非啮齿类）的长期毒性试验研究。

#### 4. 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，应结合原品种的申报资料及处方组成的情况，确定是否需进行长期毒性试验研究及长期毒性试验研究的内容。

### 五、参考文献

1 .Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (Rodent and Nonrodent Toxicity Testing). ICH-S4A. 1999

2. Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals. ICH-M3. 1997

3 . Note for guidance on repeated dose Toxicity. 2000. CMPM /SWP/1042/99, EMEA

4. 秦伯益，主编. 新药评价概论（第二版）. 北京：人民卫生出版社，1998：163-176

5. 袁伯俊，王治乔，主编. 新药临床前安全性评价与实践. 北京：军事医学科学出版社，1997：43-62

6. Nelson H.Wilson, Jerry F.Hardisty, et al. Short-Term, Subchronic, and Chronic Toxicology Studies. A. Wallace Hayes. Principles and Methods of Toxicology, Fourth Edition, edited by A. Wallace Hayes, Taylor & Francis, Philadelphia, 2001. 917-957

## 六、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		可以支持的临床研究阶段
	啮齿类动物	非啮齿类动物	
单次给药	2周	2周	I期、II期、III期
≤2周	1个月	1个月	I期、II期、III期
>2周*	1个月	1个月	I期
≤1个月	1个月	1个月	II期
	3个月	3个月	III期
≤3个月	3个月	3个月	II期
	6个月	6个月	III期
≤6个月	6个月	6个月	II期
	6个月	9个月	III期
>6个月	6个月	9个月	II期
	6个月	9个月	III期

注：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不同的恢复期。

\*此处是指临床疗程超过2周的药物，可用一个月的长期毒性试验来支持药物进行I期临床试验。

### (二) 长期毒性试验中一般需检测的指标

#### 1、血液学指标

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、血液生化学指标

---

### 血液生化学指标

- 
- 天门冬氨酸转氨酶
  - 碱性磷酸酶
  - 尿素氮
  - 总蛋白
  - 血糖
  - 总胆固醇
  - 钠离子浓度
  - 氯离子浓度
  - 丙氨酸转氨酶
  - $\gamma$ -谷氨酰转移酶（非啮齿类动物）
  - 肌酐
  - 白蛋白
  - 总胆红素
  - 甘油三酯
  - 钾离子浓度
  - 肌酸磷酸激酶

---

## 3、尿液分析指标

---

### 非啮齿类动物尿液分析指标

- 
- 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、组织病理学检查指标

##### 长期毒性试验中需称重并计算脏器系数的器官

- 
- |       |      |
|-------|------|
| ● 脑   | ● 心脏 |
| ● 肝脏  | ● 脾脏 |
| ● 肺脏  | ● 肾脏 |
| ● 肾上腺 | ● 胸腺 |
| ● 睾丸  | ● 附睾 |
| ● 子宫  | ● 卵巢 |
- 

##### 长期毒性试验中需进行组织病理学检查的脏器、组织

- 
- |                         |              |
|-------------------------|--------------|
| ● 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病理组织学检查的组织或器官。

### （三）毒性药材

本指导原则中所称毒性药材，系指入国务院《医疗用毒性药品管理办法》的中药品种。即：砒石、砒霜、水银、生马钱子、生川乌、生草乌、生白附子、生附子、生半夏、生南星、生巴豆、斑蝥、青娘虫、红娘虫、生甘遂、生狼毒、生藤黄、生千金子、生天仙子、闹羊花、雪上一枝蒿、红升丹、白降丹、蟾酥、洋金花、红粉、轻粉、雄黄。另外，凡在近年来发现的有毒性作用药材（原料）或在复方中含有明显有毒组份的均按毒性药材处理。

### 七、著者

《中药、天然药物长期毒性试验技术指导原则》课题研究组