

# 健康食品安全評估方法

## 壹、前言

### 一、依據

為評估健康食品之安全性，依「健康食品管理法」第三條第二項規定訂定本方法。本方法規定健康食品安全評估資料與毒性試驗項目及方法。

### 二、健康食品安全評估分類及評估項目

(一) **第一類**，指下列二種情形之一者，得免執行安全評估試驗：

1. 產品之原料為傳統食用且以通常加工食品形式供食者。
2. 產品或其原料具有完整之毒理學安全評估學術文獻報告及長期供食用之紀錄，且其原料組成成分及製造過程與所提具之學術文獻報告相符。

(二) **第二類**，指產品之原料為傳統食用，但產品或原料非以通常加工製備者，其應檢具下列項目之安全評估試驗資料：

1. 基因毒性試驗
2. 28 天餵食毒性試驗

(三) **第三類**，指產品之原料非屬傳統食用者，其應檢具下列項目之安全評估試驗資料：

1. 基因毒性試驗
2. 90 天餵食毒性試驗
3. 致畸胎試驗

(四) **第四類**，指產品之原料非屬傳統食用且含有致癌物之類似物者，其應檢具下列項目之安全評估試驗資料：

1. 基因毒性試驗
2. 90 天餵食毒性試驗
3. 致畸胎試驗
4. 致癌性試驗
5. 繁殖試驗

健康食品安全評估試驗應依「分層試驗法」(Tiered Approach)概念，由基因毒性等體外試驗依序執行相關試驗，並應檢視試驗結果評估後續試驗執行之必要性，以符合動物實驗減量原則。申請人應盡量避免動物試驗，非經主管機關要求，不得執行產品分類規定以外之動物試驗。

主管機關受理健康食品查驗登記申請案，其安全評估分類及評估項目，除依上述規定辦理外，必要時得依產品配方組成、風險特性或食品相關管理規定，變更其分類判定或要求申請人執行其他安全評估項目或內容，並得要求申請人提供相關之文件或資料。

## **貳、健康食品安全評估試驗之規範**

### **一、試驗操作規範**

健康食品安全評估試驗應符合衛生福利部食品藥物管理署訂定公告之「非臨床試驗優良操作規範」，或其他經主管機關認可國際組織或國家公告之優良實驗室操作(Good Laboratory Practice, GLP)，並妥善保存所有觀察結果、原始數據及文書紀錄，確保各項試驗數據之品質，及試驗之完整性與可信度。

健康食品安全評估試驗需以適當之實驗動物來進行，試驗前應先經執行單位之實驗動物照護及使用委員會或小組審查通過；試驗計畫主持人所屬單位與試驗執行單位不同者，應取得試驗執行單位之實驗動物照護及使用委員會或小組之同意書後，始得為之。健康食品安全評估試驗執行之動物實驗，應符合行政院農業委員會公告之「實驗動物照護及使用指引」。

**試驗主持人及試驗執行單位應具備下列資格或條件：**

- (一) 試驗主持人應具備食品安全或毒理學相關之專業背景與經驗。
- (二) 試驗執行單位應為具有充分設備及執行能力之國內外大學相關系所、教學醫院以上之醫療機構或其他受託研究機構。

### **二、動物實驗受試產品給予途徑**

**(一) 受試產品以口胃管餵食(Oral gavage)模式：**

根據每隻動物定期測量(至少每週一次)之體重換算出餵食之受試產品劑

量，以口胃管餵食。執行動物實驗時，使用之器材及設備材質應為造成動物疼痛或傷害最低者，且操作人員應經適當訓練。

## **(二) 直接混加受試產品於動物飼料或飲水中模式：**

受試產品以混入飼料或飲水的方式給予者，並以每隻或每組為單位，定期測量飲食或飲水的消耗量，扣除所測之食物掉落量，換算成實際之受試產品消耗量，再根據每隻動物定期測量(至少每週一次)之體重校正為受試產品實際攝食劑量(mg/kg)。試驗者於試驗開始前及試驗中，應測量受試產品於飼料或飲水中安定性及純度之質與量。

## **三、動物飼養試驗之基本規範**

實驗動物應在營養充足之條件下進行試驗，原則上，每日餵食受試產品的總體積不應影響動物之正常進食，避免受試產品之每日總飲食量佔比大於 5% w/w，導致實驗動物之營養不良。

安全評估試驗有對照組者，其飼料之熱量、蛋白質、脂肪、礦物質及維生素應與試驗組近似等量。

## **四、健康食品安全評估試驗之項目與方法**

除本評估方法所列之安全評估試驗項目及方法外，亦得依經濟合作暨發展組織(Organization of Economic Cooperation and Development, OECD)化學品測試指引之方法(Guidelines for the Testing of Chemicals)辦理，並優先採用國際已認可之非活體試驗方法，如無非活體試驗方法可替代，應優先採用國際認可之減量、減低痛苦或縮短時程之活體試驗方法。

產品應直接依所屬分類依序執行所需之毒性試驗，若微生物基因突變分析、體外哺乳類細胞基因毒性分析結果已確認受試產品基因毒性陽性，則該產品不建議為健康食品，無須再進行動物實驗。

### **(一) 基因毒性試驗(Genotoxicity test)**

基因毒性試驗可分為體內(*in vivo*)與體外(*in vitro*)測試，以體外(*in vitro*)測試優先，應至少完成微生物基因突變分析、體外哺乳類細胞基因毒性分析，如前述試驗結果為陰性，再進行動物體內基因毒性分析。另依受試產品的性質，

得增加其他之基因毒性測試。

## 1. 微生物基因突變分析

一般使用細菌基因突變測試法(gene mutation in bacteria)。

### 1.1. 菌株：需使用下列 5 種菌株：

1.1.1. *S. typhimurium* TA98

1.1.2. *S. typhimurium* TA100

1.1.3. *S. typhimurium* TA1535

1.1.4. *S. typhimurium* TA1537、TA97 或 TA97a

1.1.5. *S. typhimurium* TA102、*E. coli* WP2 *uvr A* 或 *E. coli* WP2 *uvr A* (pKM101)

註：1.1.4.與 1.1.5.各列有三種菌株，試驗者應分別擇一使用。

### 1.2. 試驗濃度範圍

應至少測試五個以上之濃度，濃度之間隔可為 2 倍或半對數(half log intervals， $\sim\sqrt{10}$ 倍)。

其最高濃度之決定應依下列規定辦理：

1.2.1. 受試產品無抗菌活性，且屬高溶解度者：5 mg/plate。

1.2.2. 受試產品具抗菌活性者(5 mg/plate 以下即有抗菌活性)：產生抗菌活性之最低濃度。

1.2.3. 受試產品無抗菌活性，且屬低溶解度者(5 mg/plate 以下無法完全溶解)：產生最少沉澱物之濃度。

抗菌活性之產生得依初步試驗中逆突變菌落(revertants)數量之減少來判定。

### 1.3. 對照組

對照組應包含陰性對照組與陽性對照組。

試驗組使用溶媒或載體者，其陰性對照組應為該溶媒或載體；陽性對照組一般則給予該菌種適當之致突變劑(mutagens)。

### 1.4. 代謝活化(Metabolic activation)

1.4.1. 進行含有與不含有 S9 混合物的測試。由於沙門氏菌系列之突變種缺乏類似哺乳類體內的代謝酵素系統，所以在細菌基因突變測試需另加入哺乳類動物(大鼠，rats)之肝臟均質液(liver homogenate)來測試原本不會使細胞產生突變之化學物質，是否會在哺乳類動物體內因受酵素代謝作用而轉變成具有致突變性物質。

1.4.2. S9 製備方法為哺乳類動物(大鼠)經化學物誘發代謝酵素處理(例如，剛離乳大鼠腹腔內連續注射 5 天)後，取其肝臟並均質化，經 9000 × g 轉速離心而得上層液的肝臟酵素，製備而成 S9 fraction，亦可購自商品化產品。

## 1.5. 測試方法

### 1.5.1. 前置培養法(Pre-incubation method)

在與瓊脂覆蓋(overlay agar)混合並倒入最少營養培養基(minimal agar plate)上之前，先將試驗樣品、細菌培養液、S9 混合物或無菌緩衝液預培養於 30-37°C，20 分鐘或更長時間。通常將 0.05 或 0.1 mL 測試液、0.1 mL 細菌培養液、0.5 mL S9 混合物或無菌緩衝液及 2.0 mL overlay agar 混合。將前述培養基於 37°C 下培養 48-72 小時後計算菌數。

### 1.5.2. 平板混合試驗法(Plate incorporation method)

通常將 0.05 或 0.1 mL 測試液、0.1 mL 細菌培養液、0.5 mL S9 混合物或無菌緩衝液及 2.0 mL overlay agar 混合，並倒入 minimal agar plate 上。將前述培養基於 37°C 下培養 48-72 小時後計算菌數。

1.6. 試驗結果之表示：每盤培養皿中突變菌落的數量須為各測試點之平均值，再以表格方式詳細記錄。

## 2. 體外哺乳類細胞基因毒性分析

一般使用體外哺乳類細胞的染色體異常分析法(*In vitro*

Chromosomal aberration test with mammalian cells in culture)或體外  
鱘鼠淋巴瘤 tk 分析法(*In vitro* mouse lymphoma tk assay)。

## 2.1. 體外哺乳類細胞的染色體異常分析法：

- 2.1.1. 細胞：使用哺乳類細胞株或初代哺乳類細胞。
- 2.1.2. 試驗濃度範圍：進行三個以上試驗濃度組，濃度間隔可為 2 倍或半對數 (half log,  $\sqrt{10}$  倍)。依據初步試驗結果決定最高試驗濃度：以受試產品會造成 50% 以上細胞生長抑制之濃度為最高濃度；若無觀察到細胞毒性，則以 5 mg/mL 作為最高濃度。若受試產品為低溶解度物質，則以產生最少沉澱物的濃度作為測試的最高濃度，但最高濃度皆不超過 5 mg/mL。
- 2.1.3. 對照組：包含陰性對照組與陽性對照組。相關說明請參照貳、四、(一)、1、1.3。
- 2.1.4. 代謝活化：進行含有及不含有代謝活化系統的測試，如 S9 混合物。相關說明請參照貳、四、(一)、1、1.4。
- 2.1.5. 實驗步驟：
  - 2.1.5.1. 於細胞經受試產品處理後之適當時機，製備染色體玻片 (通常約為 1.5 個正常細胞週期，但特定受試產品可能須要超過 1.5 個細胞週期較易偵測)。
  - 2.1.5.2. 每個劑量組製備 2 片玻片，每片至少觀察 100 個分裂中期細胞，檢查染色體結構變異與多套染色體(polyploids)的數目。描述細胞形態異常時，須註明染色體或染色分體的結構變異種類。
  - 2.1.5.3. 試驗結果之表示：以表格方式描述染色體變異的種類與數量，並計算含染色體結構變異細胞之頻率。

## 2.2. 體外鱘鼠淋巴瘤 tk 分析法

- 2.2.1. 細胞：使用 L5178Y *tk*<sup>+/-</sup> 鱘鼠淋巴瘤細胞株。
- 2.2.2. 試驗濃度範圍：進行三個以上試驗濃度組，濃度間隔可為 2

倍或半對數 (half log,  $\sim\sqrt{10}$ 倍)。依據初步試驗結果決定最高試驗濃度：以受試產品會造成 80% 以上之細胞死亡的濃度為最高濃度。若無觀察到細胞毒性，則以 5 mg/mL 作為最高濃度。若受試產品為低溶解度物質，則以產生最少沉澱物的濃度作為測試的最高濃度，但最高濃度皆不超過 5 mg/mL。

2.2.3. 對照組：包含陰性對照組與陽性對照組。相關說明請參照貳、四、(一)、1、1.3。

2.2.4. 代謝活化：進行含有與不含有 S9 混合物的測試。相關說明請參照貳、四、(一)、1、1.4。

2.2.5. 實驗步驟：

2.2.5.1. 細胞在受試產品處理後之適當時機，清洗去除受試產品後，細胞繼續培養以測定其存活率，同時觀察細胞表現是否因受試產品而誘發致突變表現型 (mutant phenotype)。

2.2.5.2. 細胞分別培養於含或不含嘧啶類似物培養液中，經過足以表現引發致突變表現型的適當培養時間，測定其致突變數量 (numbers of mutants) 及細胞複製之效率 (cloning efficiency)。嘧啶類似物如 bromodeoxyuridine (BrdU)、fluorodeoxyuridine (FdU) 或 trifluorothymidine (TFT) 等。

2.2.6. 試驗結果之表示：以表格方式描述每劑量組之細胞突變及存活之數目，同時計算細胞之存活率、複製效率及細胞致突變之頻率。

### 3. 動物體內基因毒性分析

一般使用齧齒類動物造血細胞的染色體傷害分析法 (*In vivo* test for chromosomal damage using rodent hematopoietic cells)。

3.1. 動物：大鼠、鼯鼠皆可用，但若分析周邊紅血球細胞時，建議使

用鼯鼠。一般而言，使用單一性別即可。一般使用雄性鼯鼠。若雄性與雌性動物在代謝或毒性上有明顯的差異時，則須同時使用雄、雌性動物進行試驗。受試產品之目標消費族群為特定性別者，則應使用該性別動物進行試驗。

**3.2. 動物數量：**每組至少 5 隻動物。

**3.3. 給予受試產品之途徑：**一般採用口胃管餵食，必要時得採直接混加於飼料或飲水中。採用口胃管餵食時之體積建議每次應在 10 mL/kg 動物體重以下。若餵食體積過高，可採多次給予方式。

**3.4. 劑量範圍：**

3.4.1. 測試三個以上劑量組。

3.4.2. 若試驗需要，可藉由給予單一或重覆受試產品之初步短期試驗的劑量來決定最高容許劑量。最高容許劑量是指該劑量足以引發明顯之不良影響，例如，抑制體重的增加等，一般以最高容許劑量作為最高劑量。

3.4.3. 給予受試產品之總劑量不得顯著影響試驗動物之基本營養需求。以受試產品計，其重量不得超過該隻動物前 3 天平均每天總飲食攝取量之 5% (w/w)。

**3.5. 對照組：**一般以受試產品使用之溶劑作為陰性對照組，而以會引發致突變物質為陽性對照組。

**3.6. 受試產品給予頻率：**每日單一或重覆給予。

**3.7. 測試方法：**得使用下列 3 種方法之一：(1) 齧齒類骨髓細胞染色體異常測試法 (Chromosomal aberrations in bone marrow cells of rodents)、(2) 齧齒類骨髓細胞之微核測試法 (Micronuclei in bone marrow cells of rodents) 或 (3) 齧齒類周邊血液之微核測試法 (Micronuclei in peripheral blood of rodents)。

3.7.1. 齧齒類骨髓細胞之染色體異常測試法

3.7.1.1. 經受試產品處理的動物在適當時間犧牲，製備染色體玻



片。

3.7.1.2. 每個劑量組製備 2 片，每片至少觀察 100 個分裂中期細胞，檢查染色體結構變異與多套染色體的數目。描述細胞形態異常時，須註明染色體或染色分體的結構變異種類。

3.7.2. 齧齒類骨髓細胞或周邊血液之微核(micronuclei)測試法

3.7.2.1. 經受試產品處理的動物在適當時間犧牲，並製備骨髓或血液抹片。一般動物經給予受試產品處理後 18~30 小時即犧牲並收集檢品，或在 24~72 小時內進行多次採樣製作樣本。若試驗需要，可經由初步短期預備試驗(pre-test)結果，選擇反應最明顯的時間採樣。

3.7.2.2. 每隻動物至少觀察 1,000 個網狀紅血球(reticulocytes)或多染性紅血球(polychromatic erythrocytes)，記錄微核發生的數目，同時計算網狀紅血球或多染性紅血球佔全部紅血球的比例。可採用 Giemsa 或 Acridine orange 螢光染劑之染色方法，或以「流式細胞儀」偵測方法觀察網狀紅血球的產生取代多染性紅血球。

**3.8. 試驗結果之表示：**

3.8.1. 齧齒類骨髓細胞之染色體異常測試法：以表格方式描述染色體變異的細胞總數或每個細胞變異的頻率。

3.8.2. 齧齒類骨髓細胞或周邊血液之微核測試法：以表格記錄網狀紅血球或多染性紅血球中微核發生的數目，以及網狀紅血球或多染性紅血球佔全部紅血球的比例。

**(二) 28 天餵食毒性試驗(28-day feeding toxicity test)**

28 天餵食毒性試驗之目的是測試受試產品經重覆餵食 28 天後對哺乳類動物可能產生之不良影響，瞭解毒性變化之產生，同時確認所測定的劑量是否屬於無不良影響劑量(No-Observed-Adverse-Effect Level, NOAEL)範圍。

## 1. 動物品種與性別

最常使用的動物為大鼠。雌、雄兩性動物的數量須相同。

## 2. 動物數量與年齡

每個劑量組使用雄、雌至少各 10 隻動物；若須進行試驗中期剖檢或復原測試，動物數量須視剖檢或復原測試之次數適量增加。試驗終結時，並應有足夠數量之存活動物進行適當之毒性評估。開始給予受試產品之動物週齡為 5~6 週為宜。

## 3. 給予受試產品之途徑

一般採用口胃管餵食，必要時得混入飼料或飲水中。採用口胃管餵食時之體積每次應在 10 mL/kg 動物體重以下。若餵食體積過高，可採多次給予方式。

## 4. 給予受試產品之期間

每天固定時間給予受試產品，連續 28 天。

## 5. 劑量範圍

- 5.1. 為使毒性試驗能夠顯示受試產品的不良影響，瞭解劑量與毒性間的關係，並預估 NOAEL。試驗中至少要有三個劑量組：(1)高劑量為該劑量足以使試驗動物產生毒性症狀，但不造成死亡；(2)低劑量為不會引起毒性作用的劑量；(3)中間劑量為足以引起最低毒性作用(如血中酵素值改變或體重成長速度下降)的劑量。此外，還要包括載體對照組或空白對照組，若試驗需要，可加入參考對照組。劑量選擇之依據應加以說明。
- 5.2. 為考量動物福祉，高劑量得為功效劑量 100 倍以上；中間劑量，得為 50 倍以上。其因產品形式等因素無法達到此要求劑量時，應檢附說明。
- 5.3. 給予受試產品之總劑量不得顯著影響試驗動物之基本營養需求。以受試產品計，其重量不得超過該隻動物前 3 天平均每天總飲食攝取量之 5% (w/w)。

## 6. 觀察與檢測

### 6.1. 臨床觀察

每天觀察試驗動物至少 2 次(兩次時間間隔不得少於 6 小時)，以確定是否有痛苦、垂死或死亡情形；另每天觀察試驗動物的臨床症狀 1 次以上，並記錄臨床症狀或不良影響，包括影響之開始時間及過程。

### 6.2. 食物攝取量與試驗動物體重之測量

6.2.1. 試驗開始前及試驗期間每週至少測量體重 1 次。

6.2.2. 試驗期間，原則上每週至少同時測量 1 次每隻或每籠動物之食物投予量、剩餘量及掉落量，計算食物攝取量。

6.2.3. 受試產品以混入飼料或飲水之方式給予者，並應依貳、二、(二)之規定辦理。

### 6.3. 臨床病理檢驗

6.3.1. 血液檢驗(Hematology)：試驗動物應於試驗結束時採樣以進行血液檢驗，項目應包括：hematocrit、hemoglobin、erythrocyte (RBC) count、total and differential leukocyte (WBC) counts、platelet count 及凝血因子(例如：clotting time、prothrombin time 或 activated partial thromboplastin time)等之測量。

6.3.2. 血清生化檢驗(Clinical Chemistry)：試驗動物應於試驗結束時採樣，進行血清生化檢驗。其內容應包括電解質的平衡、醣類代謝及肝腎功能之檢測等，並至少包含 alkaline phosphatase (ALP)、alanine aminotransferase (ALT)、aspartate aminotransferase (AST)、 $\gamma$ -glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT)、albumin、amylase、bile acids、creatinine、creatine phosphokinase (CPK)、glucose、lactate dehydrogenase (LDH)、total bilirubin、total cholesterol、total protein、triglyceride、urea nitrogen、calcium、chloride、phosphorus、potassium、sodium 等 21 個

項目。

6.3.3. 尿液檢驗(Urinalysis)：在給予受試產品後進行尿液檢驗。尿液檢驗應至少完成下列項目：尿沈渣顯微鏡檢、尿液量、酸鹼值、比重、顏色，及尿液中之 RBC、WBC、protein、glucose、ketones、bilirubin 及 occult blood 等 7 項的含量。

6.3.4. 眼睛檢查(Ophthalmological examination)：眼睛檢驗包括肉眼檢驗與鏡檢眼睛的外部及內部構造。最高劑量組及對照組的動物在試驗開始給予受試產品前及試驗結束時進行眼睛檢查各一次。若發現眼睛異常，則其他劑量組之全部動物均須進行眼睛檢查。

6.3.5. 組織病理檢驗(Histopathological examination)：

6.3.5.1. 所附之組織病理檢驗報告應由具有動物病理經驗之獸醫師或醫師判讀並簽名，且應有清晰之彩色組織切片圖為證。

6.3.5.2. 試驗期間死亡的動物，應儘快進行剖檢，肉眼檢查器官與組織之變化。其可能者，主要臟器分別稱重並進行組織病理檢查，以尋求死亡的原因及毒性變化的性質(如嚴重程度)。

6.3.5.3. 瀕死之動物應行安樂死，並於犧牲前，記錄臨床觀察之結果。其可能者，並收集血液樣品，進行血液及血清生化檢驗。死亡後，並依 6.3.5.2.之規定辦理。

6.3.5.4. 試驗結束後，試驗動物應予安樂死之方式犧牲，收集其血液樣品，進行血液與血清生化檢驗；並予剖檢，以肉眼觀察及記錄動物的器官與組織之變化，測量主要臟器重量。最高劑量組及對照組應進行組織病理檢驗，最高劑量組中特定器官或組織發現病變現象者，全部動物之該特定器官或組織，均應進行組織病理檢驗；

其他劑量組，有發現任何器官或組織病變者，亦同。

6.3.5.5. 下列器官應進行秤重，但得依試驗性質及肉眼檢查發現，增加標的器官：

(1)adrenals (2)brain (3)heart (4)kidneys (5)liver (6)spleen  
(7)thymus (8)gonads

6.3.5.6. 下列器官應進行組織病理檢驗，但得依試驗性質及肉眼檢查發現，增加標的器官或組織：

(1)adrenals (2)brain (3)heart (4)kidneys (5)liver (6)spleen  
(7)thymus (8)gonads

### (三) 90 天餵食毒性試驗(90-day feeding toxicity test)

90 天餵食毒性試驗之目的是測試重覆餵食受試產品 90 天後對哺乳類動物可能產生之不良影響，且提供更長期試驗劑量設定之依據。

在試驗前得先進行短期重覆劑量毒性試驗，以決定長期毒性試驗之劑量範圍。

#### 1. 動物品種及性別

應使用的動物為齧齒類之大鼠。由於雄雌的毒性反應有可能不同，因此測試必須包括同一品種之兩性動物，且其數量須相同。

#### 2. 動物數量與年齡

每個劑量組使用雄、雌至少各 10 隻動物；若須進行試驗中期剖檢或復原測試，動物數量須視剖檢或復原測試之次數適量增加。試驗終結需有足夠數量存活之動物以進行適當之毒性評估。開始給予受試產品之動物週齡為 5~6 週為宜。

#### 3. 給予受試產品之途徑

一般採用口胃管餵食，必要時得混入飼料或飲水中。以口胃管餵食時之體積每次應在 10 mL/kg 動物體重以下。若餵食體積過高，可採多次給予方式。

#### 4. 給予受試產品之期間

每天固定時間給予受試產品，連續 90 天。

## 5. 劑量範圍

同 28 天餵食毒性試驗之劑量範圍【貳、四、(二)、5】。

## 6. 觀察與檢測

### 6.1. 臨床觀察

每天觀察試驗動物至少 2 次，以確定是否有痛苦、垂死或死亡情形；另每天觀察試驗動物的臨床症狀 1 次以上，並記錄臨床症狀或不良影響，包括影響之開始時間及過程。若發現腫瘤生長，則記錄每個肉眼可觀察到或觸摸到的腫瘤發現時間、部位、大小、外觀及成長過程。並同時觀察動物行為的改變、自主官能控制失調及其他神經系統不良影響。

### 6.2. 食物攝取量與試驗動物體重之測量

6.2.1. 試驗開始前及試驗期間每週至少測量體重 1 次。

6.2.2. 試驗期間，原則上每週至少同時測量 1 次每隻或每籠動物之食物投予量、剩餘量及掉落量，計算食物攝取量。

6.2.3. 受試產品以混入飼料或飲水之方式給予者，並應依貳、二、(二)之規定辦理。

### 6.3. 臨床病理檢驗

6.3.1. 同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、6.3.1.。

6.3.2. 同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、6.3.2.。

6.3.3. 同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、6.3.3.。

6.3.4. 同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、6.3.4.。

6.3.5. 組織病理檢驗：

6.3.5.1 同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、6.3.5.1.。

6.3.5.2 同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、6.3.5.2.。

6.3.5.3 同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、6.3.5.3.。

6.3.5.4 同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、6.3.5.4.。

6.3.5.5. 同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、6.3.5.5.。

6.3.5.6. 下列器官或組織應進行組織病理檢驗，但得依試驗性質及肉眼檢查發現，增加標的器官或組織：

(1)adrenals (2)aorta (3)bone(sternum/femur) (4)bone marrow (sternum/femur) (5)brain (at least 3 different levels) (6)small intestine (duodenum、ileum、jejunum) (7)large intestine (caecum、colon、rectum) (8)esophagus (9)eye(s) (10)female mammary gland (11)Harderian gland (12)heart (13)kidneys (14) liver (15)trachea (16)lung(s) (17)lymph nodes (representative) (18)ovaries/testes (19)pancreas (20)peripheral nerve (21)pituitary (22)prostate (23)salivary gland (24)skin (25)spinal cord(at least 2 different locations) (26)spleen (27)stomach (28)thigh musculature (29)thymus(or thymic region) (30)thyroid/parathyroids (31)tongue (32)urinary bladder (33)uterus (34)accessory genital organs and tissues showing gross lesions

#### (四) 致畸胎試驗(Teratogenicity Study)

致畸胎試驗係測試受試產品對胚胎發育之影響、探討其造成畸胎之可能性。

##### 1. 試驗動物

通常使用懷孕成功的雌性大鼠、鼯鼠或兔子。

##### 2. 動物數量

使用大鼠、鼯鼠進行試驗者，每劑量組至少需有懷孕成功 20 隻動物；兔子，至少 12 隻。

##### 3. 給予受試產品之途徑

一般採用口胃管餵食，必要時得混入飼料或飲水中。以口胃管餵食時之體積每次應在 10 mL/kg 動物體重以下。若餵食體積過高，可採

多次給予方式。

#### 4. 劑量範圍

同 28 天餵食毒性試驗之劑量範圍【貳、四、(二)、5】。

#### 5. 給予受試產品之期間

在器官形成期間每天餵食受試產品。如試驗動物採用大鼠或鼯鼠，即為其孕期之第 6~17 天；兔子，第 6~19 天。

【孕期定義：一般而言，雌雄大鼠同籠後，應每天觀察陰道栓塞或進行陰道抹片以確認是否交配成功，確認交配成功之日訂為孕期第 0 天 (Gestation Day 0, GD 0)】

#### 6. 觀察與檢測

##### 6.1. 臨床觀察

每天觀察試驗動物至少 2 次，以確定是否有痛苦、垂死或死亡情形；另每天觀察試驗動物的臨床症狀 1 次以上，並記錄試驗動物死亡、臨床症狀或不良影響之情形，包括影響之開始時間及過程。

##### 6.2. 食物攝取量與試驗動物體重之測量

6.2.1. 試驗開始前每週至少測量體重 1 次；試驗期間，原則上每週至少 2 次。

6.2.2. 試驗期間，原則上每週至少同時測量 1 次每隻或每籠動物之食物投予量、剩餘量及掉落量，計算食物攝取量。

6.2.3. 受試產品以混入飼料或飲水之方式給予者，並應依貳、二、(二)之規定辦理。

6.3. 雌鼠於孕期之第 20 天，雌兔則於孕期之第 30 天，進行剖檢，計算懷孕成功率、黃體數目、存活及死亡之胚胎著床數目，並量測個別幼胎之體重，肉眼評量幼胎畸形及胎盤狀況。並同時進行母體器官與組織之肉眼觀察，若發現任何組織變化，保存其器官及對照組的相對器官，以備進行組織病理檢驗。



- 6.4. 以大鼠或鼯鼠進行試驗者，最高劑量組與對照組之懷孕動物，每胎中半數之胎鼠進行骨骼檢查(經染色處理製作成透明骨骼標本，以觀察骨骼內部形態變化)，其餘半數進行內臟器官檢查。最高劑量組骨骼或內臟器官有異常者，其他劑量組之胎鼠應進行骨骼及內臟器官檢查；以兔子進行試驗者，全數胎兔進行內臟器官與骨骼檢查。

受試產品屬安全評估分類第四類者，得參考 OECD 或其他國際相關指引，將致畸胎試驗及繁殖試驗整合設計成單一試驗，減少不必要之動物使用。

### (五) 致癌性試驗(Carcinogenicity Study)

執行致癌性試驗的目的在於確認受試產品在動物產生癌症的情形，並據此評估其在人類產生癌症的危險性。

#### 1. 試驗動物品種

根據動物對感染性疾病之抵抗力、動物的生命期、先天性腫瘤自然發生率及動物對致癌性物質之敏感度，選擇適當之試驗動物品種。試驗必須使用大鼠及鼯鼠各一種，雄雌各半。試驗開始之時機為動物在 6~8 週齡。

#### 2. 動物數量

每組使用雄、雌動物各 50 隻以上。若須進行試驗中期剖檢，動物數量須視剖檢的次數適量增加，而每次試驗中期剖檢，每組雄、雌宜各 10 隻以上。動物的分組應先以動物體重分批，再以適當的隨機取樣方法分配到各組。

#### 3. 給予受試產品之途徑

一般採用混入飼料或飲水中餵食。必要時得以口胃管餵食，採用口胃管餵食時之體積每次應在 10 mL/kg 動物體重以下。若餵食體積過高，可採多次給予方式。

#### 4. 劑量範圍

- 4.1. 劑量範圍可根據 90 天餵食毒性試驗結果進行設計。本試驗須進

行高、中、低劑量組與陰性對照組。

- 4.2. 給予受試產品之總劑量不得顯著影響試驗動物之基本營養需求。以受試產品計，其重量不得超過該隻動物前 3 天平均每天總飲食攝取量之 5% (w/w)。
- 4.3. 陰性對照組：因動物在飼養期間很有可能亦會自然產生癌病變，因此有必要進行陰性對照組。若受試產品給予時需使用溶媒或載體，則給予該溶媒或載體來取代受試產品。

## 5. 給予受試產品之期間

大鼠為 24 個月；小鼠 18 個月。

## 6. 觀察與檢測

### 6.1. 臨床觀察

每天觀察試驗動物至少 2 次，以確定是否有痛苦、垂死或死亡情形；另每天觀察試驗動物的臨床症狀 1 次以上，並記錄臨床症狀或不良影響，包括影響之開始時間及過程，以及動物死亡率。

### 6.2. 食物攝取量與試驗動物體重之測量

- 6.2.1. 試驗開始前及試驗期間每週至少測量體重 1 次。
- 6.2.2. 試驗期間，原則上每週至少同時測量 1 次每隻或每籠動物之食物投予量、剩餘量及掉落量，計算食物攝取量。
- 6.2.3. 受試產品以混入飼料或飲水之方式給予者，並應依貳、二、(二)之規定辦理。

### 6.3. 臨床病理檢驗

- 6.3.1. 血液檢驗(Hematology): 動物須在試驗開始投予受試產品前、給予期間之第 15 個月及犧牲時各採樣一次，以進行血液檢驗，項目同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、6.3.1.，但需特別留意是否有癌細胞的發生。
- 6.3.2. 血清生化檢驗(Clinical Chemistry): 試驗動物須在試驗開始給予受試產品前、給予期間之第 15 個月及犧牲時各採血一次，

以進行血清生化檢驗，項目同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、6.3.2.。

6.3.3. 尿液檢驗(Urinalysis)：試驗動物須在試驗開始給予受試產品前、給予期間之第 15 個月及犧牲時各收集尿液一次，檢測項目同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、6.3.3.。

6.3.4. 眼睛檢查(Ophthalmological Examination)：同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、6.3.4.。

6.3.5. 組織病理檢驗：同貳、四、(三) 90 天餵食毒性試驗、6.3.5.。

7. 試驗結束時，非腫瘤導致的動物死亡率應低於 50%；因動物飼養問題引起的動物死亡每組不得超過 10%。在試驗期間，若試驗動物出現衰弱或瀕死的現象，應將動物隔離安樂死進行剖檢。

#### (六) 繁殖試驗(Reproduction Study)

繁殖試驗係測試動物自交配前(雄性/雌性動物)，經交配，迄至受精卵著床過程中，受試產品給予造成之毒性影響或干擾作用。

##### 1. 試驗動物

通常使用大鼠或鼯鼠。若「繁殖試驗」與「致畸胎試驗」使用相同之動物物種，則該動物物種之品系亦應相同。

##### 2. 動物數量

選用大鼠或鼯鼠進行試驗時，每劑量組至少需有雄、雌各 20 隻動物以上。

##### 3. 給予受試產品之途徑

一般採用口胃管餵食，必要時得混入飼料或飲水中。採用口胃管餵食時之體積每次應在 10 mL/kg 動物體重以下，若餵食體積過高，可採多次給予方式。

##### 4. 劑量範圍

進行三個以上劑量組及陰性對照組。其使用劑量原則同貳、四、(二) 28 天餵食毒性試驗、5.劑量範圍。若受試產品給予時須使用溶媒或

載體，陰性對照組的動物則應給予該溶媒或載體。

## 5. 給予受試產品之時期

以大鼠或鼯鼠進行試驗，雄性動物宜自 5~6 週大即開始給予受試產品至少 60 天以上，然後進行交配，交配期間應持續每天給予受試產品，並持續至雄鼠犧牲為止；而成熟的母鼠則在交配前 2 週、交配期間、交配成功至胎兒器官開始形成之期間(自孕期第 0 天到第 6 天)每天給予受試產品。若由 28 天以上的重覆劑量毒性試驗之結果顯示該受試產品對精子生成並無任何影響，包括檢查雄、雌性動物之生殖器官重量及組織病理均無異常，雄鼠交配前的受試產品給予期間可改為 28 天。

## 6. 觀察與檢測

- 6.1. 臨床觀察：每天觀察試驗動物至少 2 次，以確定是否有痛苦、垂死或死亡情形；另每天觀察試驗動物的臨床症狀 1 次以上，並記錄試驗動物死亡、臨床症狀或不良影響之情形，包括影響之開始時間及過程，以及動物死亡率。
- 6.2. 食物攝取量與試驗動物體重之測量：在試驗開始前及試驗期間每週至少測量體重 1 次。試驗期間，原則上每週至少同時測量 1 次每隻或每籠動物之食物投予量、剩餘量及掉落量，計算食物攝取量。受試產品以混入飼料或飲水之方式給予者，並應依貳、二、(二)之規定辦理。
- 6.3. 交配指數(Mating Index)與生育力指數(Fertility Index)：
  - 6.3.1. 事先餵食受試產品之成熟雄鼠與雌鼠以 1：1 同籠方式使其進行交配，交配期間繼續給予相同飼料，且每天觀察雌鼠陰道栓塞或進行陰道抹片觀察是否有精子，以確定其是否『交配成功』。
  - 6.3.2. 交配期一般為 2 週，並繼續觀察其是否有懷孕。計算「交配指數」與「生育力指數」之公式如下：

交配指數 = (交配成功的雌性動物數目/雌性動物數目)

生育力指數 = (懷孕的雌性動物數目/交配成功的雌性動物數目)

- 6.3.3. 比較餵食受試產品的「試驗組動物」與沒餵食受試產品的「陰性對照組動物」，確認其「交配指數」和「生育力指數」是否有統計學上之顯著差異( $p < 0.05$ )。
- 6.4. 有試驗上之必要者，得將給予受試產品處理的雄鼠與未給予受試產品處理的雌鼠(反之亦然)共同居住於一飼養籠中，每天觀察陰道栓塞或進行陰道抹片以確定其是否交配成功。
- 6.5. 交配成功的雌鼠通常在孕期第 13~15 天進行剖檢，檢查黃體數目、胚胎的著床數目與被吸收數目、胚胎死亡率等，並同時進行器官與組織的肉眼觀察，若發現任何組織變化，保存其器官及對照組之相同器官，以備進行必要之組織病理檢驗。
- 6.6. 全部動物之睪丸、副睪、卵巢及子宮等分別保存，以備進行必要之組織病理檢驗。
- 6.7. 用以交配的雄鼠與交配不成功的雌鼠在適當時間須進行剖檢，肉眼觀察其器官與組織。