

在药物安全性评价中毒性病理的操作流程及重要性

裴天仙, 郭景玥, 杨 东, 郭传敏 *

天津药物研究院 天津新药安全性评价研究中心, 天津 300193

摘 要 临床前安全性评价的目的是提供新药对人类健康危害程度的科学依据, 预测上市新药对人类健康的危害程度。临床前安全性评价研究的质量直接关系到人类用药的安全, GLP 的建立就是为了确保实验资料的真实、完整和可靠。毒性病理学是毒理学中最为重要的组成部分, 也是临床前安全性评价工作中最基本的环节。从毒性病理的整个流程及其重要性方面进行综述。

关键词 毒性病理; 病理学评价; 显微镜; 诊断

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 04-0254-05

Operation process and significance of toxicologic pathology in drug safety evaluation

PEI Tian-xian, GUO Jing-yue, YANG Dong, GUO Chuan-min

Tianjin Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract Preclinical safety evaluation is to provide scientific basis of the health damage degrees caused by new drugs and to predict the harmful levels to human health caused by the new drugs that are going on sale. The quality of preclinical safety evaluation study is related to the safety for drug using, the set-up of GLP is to assure the reality, integrity, and reliability of the experimental data. Toxicologic pathology is the most important part of toxicology and is the important part of the preclinical safety evaluation. This article provides a review about the operational process and significance of toxicologic pathology in drug safety evaluation.

Key words toxicologic pathology; pathology evaluation; microscopy; diagnosis

药物临床前安全性评价的目的是提供新药对人类健康危害程度的科学依据, 是药物评价的核心内容之一, 是判断药物能否进入临床试验的第一要素。药品的 3 个基本要求是安全、有效和质量可控, 无论是对研发者还是监管者来说, 药物的安全性总是放在首位考虑的问题。

毒性病理学^[1]研究是药物的安全性评价中最重要的研究内容, 其目的是从形态学的侧面, 研究试验动物给予外界因素后, 所引起的器官、组织、细胞及亚细胞形态结构的变化差异, 来阐明外界因素所引起形态变化差异的剂量效应关系^[2]。确定损伤的靶器官、靶部位, 形态变化的性质特点和程度及其变化过程和转归, 分析其致损机制, 为药物安全性评价提供形态学依据和结论。毒性病理学在药物安全评价中之所以地位重要, 是因为动物的急性毒

性试验、长期毒性试验、致畸试验和致癌试验都离不开毒性病理学的检查和诊断, 而且试验的周期越长, 毒性病理学检查的结果越为重要。其可观察药物造成组织病理性损伤的部位、程度、性质和预后等基本问题, 因此可以说, 毒性病理学是毒理学中最为重要的组成部分, 也是临床前安全性评价工作中最基本的环节。下面介绍在通过 GLP 认证的实验室中毒性病理的流程。

1 大体解剖

大体解剖应从体表开始, 先整体观察动物的一般状况, 再看体表有无异常; 然后观察内部脏器, 先看胸、腹腔内有无液体, 再看各脏器组织位置、颜色、形状有无异常, 如有异常应详细描写记录病变的部位、大小、形状、色泽、软硬度、与周围组织有无粘连等。如有特殊要求, 应对特殊部位进行

收稿日期: 2010-04-06

作者简介: 裴天仙, 女, 硕士。电话: 23006905 E-mail: yp616727@sina.com

* 通讯作者 郭传敏, 副研究员, E-mail: guochmin@163.com

上述观察。取出被检查的脏器组织,并对主要脏器进行称重。

2 组织取材及修切

实验动物脏器组织取材的一般原则如下:若有肉眼可见病变,应首先认真观察取准标本病变部位,切勿漏取,全面反映出各脏器有无病变,显示病变全貌。其次,若无肉眼可见病变,可代表性取材。选取的组织材料要包括各器官的主要结构。所取材料应尽量保持肉眼标本的完整性,不宜过厚或过薄,一般厚约3~5 mm,大小为1.5~2 cm²,因此,取材大小可为1.5 cm×1.5 cm×0.5 cm。

组织修切的一般要求:① 组织的固定时间应超过48 h,不超过12周。② 组织修切时应参照大体解剖描述,必要时需做进一步的大体观察。③ 组织修切后,厚度不应超过0.3 cm。组织修切的特殊要求:① 对肿瘤或较大肿块,应取多个部分修切,并包括周围的正常组织。② 实质器官修切时,应尽量保留最大切面。③ 每侧肾脏应正中央纵切,包括皮质和髓质。④ 左右肺应沿冠状面纵切,并包括主支气管。⑤ 脑组织修切时应包括以下3个组织块:额叶皮层及基底节、顶叶皮层及丘脑、小脑及脑干。⑥ 空腔器官应纵向修切,以观察从黏膜及浆膜的变化。⑦ 固定后在气管门区打开气管,作大体检查,气管中的任何异常及肿瘤均应取样作光镜检查。⑧ 固定后取出垂体,修切后作横向切片。⑨ 头部脱钙处理后,修切沿鼻腔制成3个横向切片:与门齿平行、门齿与第一臼齿之间、第二臼齿的中央。仔细检查鼻腔的其余部分及鼻甲骨,并做好记录。⑩ 内分泌腺,淋巴结及较小肿块均应完整的包埋。

3 组织包埋及制片

包埋时应参照组织修切记录,确保全部组织和损伤部位均包埋于石蜡中。同时,包埋时应注意损伤处及小组织应放于石蜡块的表面,便于切片。组织包埋应遵守标准程序,以提高工作效率,为此可采用多器官组织一起包埋的方法,但应按大小或硬度合理分组,提高切片的质量。制片时应先用铅笔在载玻片的磨砂端作临时标记,包埋好的组织块应先切成4~6 μm厚的切片,再作HE染色和封片,之后用永久性标签标记,并确保组织块编号、临时标记号及永久标记号吻合。

制片完毕后,制片技师应先行检查制片的质量,观察项目包括:标识是否准确易认,标识位置是否

正确,盖片放置是否合理,是否有封片液溢出,是否有气泡、刀痕、组织漂浮物、空洞、皱折等,切片厚度及染色质量是否合格。同时还应确定全部损伤及组织均已制片。若发现有错误或遗漏,应及时补切或重切。

4 组织病理学评价

组织病理学评价是药物安全性评价试验最为关键的环节。首先,病检人员应查看标本切片是否标准,组织是否完全或部分缺失(如肾上腺髓质、垂体远端、小肠黏膜)。高质量的组织标本对于组织病理学评价是必需的。病理室应具备每种器官病理异常的诊断清单,以确保整个病检评价过程的统一。镜下病理观察时,观察者最好先将整个试验的组织切片在显微镜下浏览一遍,以便对切片所反映的组织形态背景及病变信息有一个初步印象,然后再逐个切片仔细观察和记录。为提供组织病理学检查的准确性和同一性,可选择性采用以下措施。

4.1 镜检前病理学家应该获得的必要信息

病理学家通常通过分析大体解剖肉眼观察所见、显微镜下组织切片观察所见、超微结构观察所见(必要且可能的情况下,通过电子显微镜完成)、临床生化数据、脏器质量系数等完成毒性病理学报告^[1]。病理学家在开始阅片之前,应该从试验计划书入手,认真理解计划书中的临床指征、动物体重、动物摄食量、临床生化数据、脏器质量系数、剖检观察所见、靶分子的相关生物学特性(组织分布和功能活性等,并可用免疫组化等方法进行检测)、供试品的已知毒性和预期活性等信息。但往往出现组织学观察结果与临床病理结果不一致的情况,病理学家应知道如何处理及分析,这就需要病理学家有相关知识的积累和综合分析问题的能力。

4.2 组织病理学评价的流程

4.2.1 病理学家应该确保标准化组织切片的获得并进行组织学评价。组织的标准切片是为了对所有试验组中的样本很好地进行比较,因而减少不一致性。确保合适的组织样本进行了处理是病理学家的职责。如果这不能实行,那么这样的组织就应该在数据的解释中记录并在病理叙述中进行讨论。

4.2.2 如果组织缺失或部分缺失,妨碍了病理学家观察或评价处理因素的作用,尤其当这些缺失是判断和解释处理因素作用必要的时,病理学家应该在一定程度上重新切取组织。

4.2.3 病理学家应该使用标准化的诊断术语和诊断标准。术语应该能够清晰地描述组织病变的特点。如果不对诊断术语的通用性加以解释,就会影响人们对毒性病理学检查的正确理解,干扰实验人员对结果的统计和判定^[3]。如果简单的术语不能够很好地描述复杂的病理改变,应该使用详细的文字描述对用于表格的诊断术语进行解释定义。如果有的术语还未统一,就采用大多数有经验的学者或病理学界意见比较一致的术语^[4]。

4.2.4 组织的评估可以根据病理学家的喜好一只一只动物或一个一个脏器进行镜检。一只一只动物进行镜检可以全面地评估某一动物的健康状态。一个一个脏器的检查可以更多地关注病变,并使得某一特定器官的病变程度在定级上保持一致。

4.2.5 对于某一种属或种系动物的自发性病变,认识试验因素是否使其病变加重是非常重要的。病理学专业人员必须清楚地了解正常动物的生物学特性、自发性疾病背景数据及各种不同种系动物器官损伤评价的背景知识,从而保证其能够很好的结合临床观察体征,药物分布情况及其他试验信息对毒性病理检查所见进行综合分析。如果处理因素加重了自发病变的发生率和病变程度,病理学家应使用合适的病变程度的定级系统进行描述。毒性病变的程度通常是连续的,并且在任何一种分类等级中都存在一个临界值。因此,病变的程度系统应该是:1)可解释的,2)可重复的,3)有意义的。如果靶器官病变的程度在数据解释时非常关键,那么对于不同等级分级的描述就应该在病理叙述中进行说明,这使得复核者对于不同组动物病变的差异心里有数。显微镜照相的照片对于传送分级系统中不同程度病变有一定帮助。好的分级系统有助于病理同行评议的进行。

4.2.6 对于致癌性研究^[5],病理学家有责任区分增生性病变、非典型性增生病变以及肿瘤性病变,并且如果可以还需要进一步对肿瘤进行分类:1)良性或恶性,2)原发性或继发性肿瘤。病理学家也可能需对单只动物死亡原因进行评估。这种评估对于整个研究的全面分析解释具有非常重要的意义。

4.3 确保组织病理学显微镜检查准确一致的操作流程

4.3.1 为了获得最好的结果,某一个试验的所有组织最好由一位病理学家完成组织病理学检查。然而,

有时因为试验数据量过于庞大或是时间紧迫,多位病理学家可能同时参与一个试验研究。如果多位病理学家参与同一个试验的组织病理学检查,不要期望他们对每一个组织、器官或动物,得出完全相同的结果。然而,当病理学家对组织进行评价时,他们尽量一致地将所受的培训和经验应用于高度变化的生物学系统中,从而避免在结果中引入人为差异。在工作时,需要更多的交流,因为不同的病理学家使用的诊断术语或对病变的定级等存在一定的差异,而这些差异可能妨碍复核以及对数据的解释或使之复杂化。

4.3.2 病理学家意识到“诊断漂移”的现象是存在的。漂移是指在单个研究中诊断术语或病变的分级在逐渐地改变。大多数试验中,较多数量的动物和组织需要在一个较长时间里进行评估,漂移是一个很常见的问题。这造成了对于处理因素诱导的病变观察的不一致,或可能影响了无效作用水平的确定。如果病理学家意识到自己在术语的应用以及病变定级存在诊断漂移,则需要对这些组织重新进行镜检。比较恰当的重新镜检可能需要采用“盲检”或“掩蔽”的方式进行。

4.3.3 病理学家在镜检前、镜检中和镜检后都应该考虑采用合适的技术来减少组织观察的偏差。有一种非常合适的技术就是“掩蔽”方法(即盲检)。切片的盲检是指病理学家事先不知道处理组、非处理组或其它对照组的情况下对组织进行镜检。病理学家一致认为在初检时采用盲检可能会增加镜检所耗费的时间并且可能对试验信息的提取的质量产生负面作用。一般认为盲检使得区别处理因素导致的变化与生理变异造成的变化非常困难。此外,在初查时采用盲检还可能会造成对细微改变的忽略。认识和了解处理组的设置,即病理学家知道哪些动物是非处理组或其它对照组,那么病理学家可能会更关注组织病理学的检查,从而发现处理组和非处理组动物重要的细微差别。总之,毒理病理学家认为了解处理组的设置可以更好地发现所有处理因素导致的改变,并提高组织病理学检查的正确性。因为盲检可能限制了病理学家对于正常生理变异的认识以及试验设计的效果,所以惯例上盲检用于特殊组织病变的复核(即定向盲检复核)。同样,如果在评估中某一已知的毒性综合征存在,即病变的范围已知,那么在不了解分组情况下可能有利于主要病变的组

织学评价。

4.3.4 同行评议 (peer review)。同行评议能够增加研究中组织病理学改变正确判断的可靠性。针对病理同行复核专家,很多国际学会组织都建议由完成毒性病理报告以外的另外一位病理学家来对重要的一般毒性试验的病理切片进行选择性的病理同行复核^[6]。正式的病理同行读片复核应该被记录在试验报告中^[7]。同行复核病理学家不需要在试验报告中签名,但应该签署一份清楚地说明所有材料都已经过复核的声明,声明应该注明主要的诊断漂移都已经被纠正,且病理学专业人员及同行复核病理学家对病理观察所见的描述和解释一致。正式的组织病理学同行评议(预期的或回顾性的)的目的包括:1)确定诊断术语的正确和一致,例如对处理因素导致的病变不正确的诊断和描述进行调查。2)确定完整性,例如对未诊断的处理因素导致的病变进行调查。3)通过复核所有靶器官和组织来确定合适的未观察到作用水平(NOEL)或未观察到有害作用水平(NOEL)。4)检查由这些数据得到的文字解释内容的正确性。同行评议的目的不是对每一个组织改变的所有细节进行确证,而是对处理因素导致的病变进行确定,以保证这些改变恰当地记录、诊断一致以及合理地进行了解释分析。

4.3.5 一个病理工作组(PWG)成立以完成初查、复核以及对病理学数据的解释。病理工作组通常由组织或病变检查的镜检专家们组成,并且他们的报告反映了这些专家的一致性意见。病理工作组也可以解决病理学专题负责人与同行评议专家之间的差异,以确保病变解释的准确性,一旦报告已经提交就可以对诊断进行改正(EPA要求),或者就管理者或其他感兴趣的组织提出的问题进行回答。如果研究数据中存在一些实质性的问题,这些问题影响处理因素导致的病变以及NOEL的判断,一个病理工作组就应该成立。通常病理工作组的结果是正式的,并且在报告中记录,因为工作组对于被检查的问题和研究的结果具有权威性。

5 病理报告

病理报告可以有以下2种形式:一种是由专题负责人和病理学专业人员共同完成综合报告,毒性病理学报告包含在综合报告中,试验专题负责人和试验病理学专业人员分别签名;另一种是,病理学专业人员单独完成毒性病理学报告并签名后,将此

报告附加在试验综合报告中。无论哪种报告形式,病理学家和其他专业专家共同合作来分析评价包括临床观察结果、临床生化数据、脏器质量数据、剖检结果及药物代谢动力学数据,并完成综合报告^[8],这都是国际GLP规范所要求的。2种形式的报告都应该提供单只动物的数据表格及汇总表格,病理描述和解释应该包含所有与试验相关的病理数据(病理形态学观察结果和临床生化数据)和对病理数据的分析及解释说明。即便在单独签署病理报告的情况下,病理学专业人员也应该参与综合报告的完成,确保受试物相关的所有病理数据与其他试验数据相关联,并被准确地记录在报告中。病理学专业人员应该对原始数据、分析过的数据及病理观察所见的描述和解释负责并签字。

6 组织病理学各标本归档

6.1 病理资料管理归档

病理学检查的文字资料中组织学检查报告及与专题相关的记录在检查结束后均交与专题负责人,病理实验室其他记录均定时归档;而非文字资料如石蜡包埋块、病理切片按专题随时归档。这样便于病理资料的保存和查找。

6.2 病理留样湿标本归档

病理取材所剩湿标本每只动物单瓶(袋)保存,每一批实验单独存放;每一标本瓶(袋)均应有标识,并标注清楚专题编号或名称、动物号、动物病理号、固定液种类及配制日期、标本采集日期等;保存期间应随时注意固定液的添加,以没过保存标本为准;保存时间应以能够进行质量评价为时限;实验结束后,标本应及时归档同时填写归档记录。

7 结语

随着毒性病理学的发展,越来越多的人认识到在药物安全性评价的过程中,形成一套可行的毒性病理学的检验和评价程序标准,可以有效减少系统误差,提高毒性病理诊断的准确性和一致性,成为判断受试物是否安全的可靠依据。在毒性病理诊断过程中,无论是硬件设备的配置,还是制片和阅片人员专业知识的培训都非常重要。虽然也有越来越多的人认识到毒性病理的重要性,但是其在毒理学中的地位仍不能完全体现,还需要得到相关人员的重视和支持。目前,毒性病理的整个操作过程中仍然存在大量的问题,这就需要病理工作者在实践中不断的改进和提高,并进一步加强研究。

参考文献

- [1] Crissman J W, Goodman D G, Hildebrandt P K, *et al*. Best practice guideline: toxicologic histopathology [J]. *Toxicol Pathol*, 2004, 32 (1): 126-131.
- [2] 张 桥. 卫生毒理学基础[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [3] Shanckelford C, Long G, Wolf J. Qualitative and qualitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2002, 30 (1): 93-96.
- [4] Maronpot R R, Montgomery C A, Boorman G A. National toxicology program nomenclature for hepatoproliferative lesions of rat [J]. *Toxicol Pathol*, 1986, 14 (2): 263-273.
- [5] Gold L S, Manley N B, Slone T H. Compendium of chemical carcinogens by target organ: results of chronic bioassays in rats, micehamsters, dogs, and monkeys [J]. *Toxicol Pathol*, 2001, 29 (6): 639-652.
- [6] Society of Toxicologic Pathologists. Peer review in toxicologic pathology: some recommendations [J]. *Toxicol Pathol*, 1991, 19 (3): 290-292.
- [7] Society of Toxicologic Pathologists. Documentation of pathology peer review [J]. *Toxicol Pathol*, 1997, 25 (6): 655.
- [8] Ward J M, Hardistry J F. Peer review in toxicologic pathology [J]. *Toxicol Pathol*, 1995, 23 (2): 223-234.

郑重声明

天津**中草药**杂志社（出版《**中草药**》、Chinese Herbal Medicines (CHM)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊）未与任何单位或个人签署版面合作及论文代理发表协议，凡是以天津**中草药**杂志社及其所属期刊的名义进行的版面合作及论文代理发表等非法活动，均严重侵害了天津**中草药**杂志社的合法权益，天津**中草药**杂志社将保留对其采取法律行动的权利，特此郑重声明。

希望广大作者、读者认准天津**中草药**杂志社门户网站“www.中草药杂志社.中国或www.tiprpress.com”，切勿上当受骗；若发现假冒天津**中草药**杂志社及所属期刊的情况，请检举揭发。

电话：022-27474913 E-mail:zcy@tiprpress.com

天津**中草药**杂志社