

• 专 论 •

从试验人员角度谈药物非临床生殖发育毒性试验的质量控制

李彦, 卜文, 王莹, 周祖明, 范玲玲, 芦欣欣, 马骋程, 沈连忠*

山东欣博药物研究有限公司, 山东 临邑 251500

摘要: 根据实践工作经验, 从试验人员的角度, 就试验前准备、试验实施、原始资料整理及总结报告撰写等方面总结了药物非临床生殖发育毒性试验的质量控制要点: ①制定科学合理的实验方案和记录表格; ②建立完善的实验动物背景数据资料库; ③制定标准统一的各项试验操作和检测指标; ④妥善整理并保存各类原始资料; ⑤严谨细致撰写总结报告。

关键词: 非临床; 生殖发育毒性试验; 质量控制

中图分类号: R994 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2015) 06-0585-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.06.001

Analysis on quality control of reproductive and developmental toxicity studies from experimenters' point of view

LI Yan, BU Wen, WANG Ying, ZHOU Zu-ming, FAN Ling-ling, LU Xin-xin, MA Cheng-cheng, SHEN Lian-zhong

Shandong Xinbo Pharmaceutical R&D, Ltd., Linyi, Shandong 251500, China

Abstract: This paper sums up the key points of quality control in reproductive and developmental toxicity studies from five aspects, such as experiment preparation, test operation, original data records compilation, and summary reports writing: ① designing scientific and reasonable experimental schemes and record forms; ② collecting the background data of experimental animals; ③ establishing uniform standards for experimental operations and detection indexes; ④ maintaining the original data records in an orderly manner and retaining for a specified period; ⑤ writing summary reports carefully and meticulously.

Key words: nonclinical; reproductive and developmental toxicity experiment; quality control

生殖发育毒性试验具有毒性反应表现形式多样、延续和滞后, 动物交配、给药、分娩和剖检时间非同步, 检测指标及其统计处理多样, 存在窝效应和窝大小不均一等特性, 是药物非临床安全性评价中最为复杂、繁琐的试验之一^[1]。因此, 如何进行药物非临床生殖发育毒性试验质量控制成为一个值得探讨的问题。现结合笔者以往工作经验, 从试验人员角度就生殖发育毒性试验中容易忽略处浅谈个人体会。

1 试验前准备

1.1 实验方案

1.1.1 实验方案常见错误

首先, 实验方案制定过

程中最常见错误为套用以往实验方案模板, 但疏于修改, 而导致实验方案前后内容不一致, 给药剂量或给药方式错误, 引用标准操作规程 (Standard Operating Procedure, SOP) 不合适等。

其次, 另一类常见错误为实验方案内容不全面, 试验操作方法描述不详细, 未涵盖试验实施过程中可能出现的所有情况。如实验方案中缺少对食仔、分娩无活胎及哺乳过程中幼仔全部死亡动物处理方式的規定等, 或未详细描述给药方法和各指标检测方法等。

再者, 由于生殖发育毒性试验检测指标繁多, 统计处理方法多样, 实验方案中易出现统计指标及

收稿日期: 2015-07-23

作者简介: 李彦 (1985—), 女, 硕士研究生, 主要从事药物生殖毒性的非临床安全性评价研究。

Tel: (0534)5056587/9-8210 E-mail: pebble_e@163.com

*通信作者 沈连忠, 男, 研究员, 主要从事药物安全性评价研究。Tel: (0534)5056586 E-mail: shlz6666@163.com

其统计方法的遗漏,最终可能无法科学、全面的反映供试品的生殖毒性作用。如供试品对传统概念中主要生殖脏器(雄性动物为例:睾丸、附睾、精囊腺和前列腺等)以外的腺体或脏器(雄性动物为例:包皮腺、精液囊、提肛肌和肛门括约肌等^[2])存在毒性作用时,实验方案中检测指标仍局限于传统概念的主要生殖脏器组织等。

细致严谨,为避免实验方案错误发生最有效的方法。方案初稿可经试验人员传阅、修改,不能仅依赖质量保证(Quality Assurance, QA)人员的审核。

1.1.2 剂量设计及检测指标选择 给药剂量和检测指标的设计关乎试验的成败,一般可根据药理、急性毒性、长期毒性和药动学研究资料或相关文献进行设计。但专题研究开展过程中发现部分文献中给药剂量和检测指标(尤其给药剂量),可能因供试品致畸效应或生殖毒性剂量范围过窄,动物品系、给药途径甚至动物饲养管理条件等的差异,不能很好的适用于所开展的专题研究。预实验有助于给药剂量和检测指标的筛选、设计。

1.2 实验动物

试验开始前首先确定使用动物的品系、年龄,遗传背景、生育力、疾病模式、畸形/变异发生率等方面的基础信息,建立全面完整、记录详尽、仔细核实的背景数据资料库,以便参考查阅,最终判断试验统计数据有无致畸效应或生殖毒性等生物学意义。不连续、未经核实或缺失的背景数据资料可能将某些动物遗传漂移所引起的效应误以为是药物的致畸效应或生殖毒性^[3]。

再者,调研并选择合格的实验动物供应商。尤其使用普通级家兔进行Ⅱ段生殖发育毒性试验更应注意选购家兔的品质。某些供应商往往私自用药以控制家兔疫病的发生。加之家兔为草食性动物,胃肠道内菌群不如杂食性和肉食性动物复杂,环境、饲料和饮水的突然改变容易导致其胃肠道内菌群紊乱,发生胃肠道性疾病。并且品质不佳的家兔受孕率低,易感染传染性疾病,导致孕兔非供试品性流产,甚至胚胎或母体死亡,干扰试验结果判定。

另外,严格控制实验动物体质量均一性。胚胎-胎仔发育毒性试验(Ⅱ段)和围产期毒性试验(Ⅲ段)采用“随机数字法”或“蛇形分组法”分组时更应注意,避免分组后动物体质量差异过大。啮齿类动物在遵循“3R原则”下尽可能缩短交配时间,

防止交配时间过长导致孕鼠体质量差异变大。必要时体质量过大或过小的动物不用于分组及试验。

1.3 记录表格

生殖毒性试验检测指标繁多,记录表格也随之增多,试验人员在专题试验开始前应准备好相关记录表格。记录表格设计一般秉承“简洁,易懂,便于记录”的原则,同时注意:①全套表格应涵盖该专题实施中所有试验操作和检测指标;②表格中结果记录可采取选择项加描述形式,替代完全描述性结果的记录,减少记录工作量和出错率。如分娩观察在“正常/异常()”观察结果对应处划“√”,出现异常,需注明何种异常时再在括号中横线处详细描述或记录;③使用实验方案或SOP中统一规定的缩写或代号。如着床痕用“IT”表示,吸收胚用“RE”表示,等;④适当增加备注栏,便于记录特殊情况;⑤必要时表格下方添加注释,便于表格的理解和使用;⑥记录表格同样应避免套用模板疏于修改的问题。

1.4 实验方案说明与发布

试验开始前实验方案说明与发布不能走过场,专题负责人(Study Director, SD)必须召集试验参与人员对实验方案进行解说,阐述试验过程中的注意事项,进行交流,协调好各部门人员和时间,尤其应统筹安排好伴随毒代检测和动物剖检时人员和时间,以便试验顺利开展。

2 试验实施

2.1 临床症状观察

药物非临床生殖发育毒性试验观察需仔细,特别注意:①动物药后反应;②垫料有无血污和流产物等异物;③动物会阴周围及下腹部有无血污和异物等流产迹象;④受孕动物体质量突然减轻等异常情况。防止动物流产、早产后食仔、难产等异常情况发现不及时。

2.2 阴道涂片

阴道涂片检查注意:①动物编号与阴道涂片一一对应,标识清楚;②使用洁净的载玻片,避免玻片中杂质干扰阅片;③涂片用棉棒、枪头或滴管等物品应灭菌,尽可能不重复使用,防止交叉污染。棉棒浸润后使用,注意避免尖锐的枪头或滴管造成动物损伤,引发阴道炎症反应。使用移液器或滴管涂布阴道冲洗液用力应缓慢、均匀,防止不同动物的阴道冲洗液滴溅,交叉污染;④使用生理盐水作为棉棒浸润液或阴道冲洗液,涂片干燥后会产生无

机盐结晶,干扰阅片,可用灭菌蒸馏水或注射用水替代;⑤对各发情阶段及其过渡阶段制定统一的划分标准,难以判定发情阶段及发情期不规律动物的涂片应经多人检阅复核。若阴道涂片中无细胞或细胞数量较少,应重新涂片和阅片,排除涂片操作失误的原因。

2.3 动物同笼交配

有关资料记载啮齿类动物一般在夜间交配,阴道栓在交配后2~8 h脱落^[4],但实际操作中发现部分大鼠上午8~9点合笼后1 h左右即可检查到脱落的阴道栓。若上午动物开始同笼交配,次日上午进行阴道栓检查,进行受孕确认,则同笼上午即交配成功的动物与夜间交配成功动物之间的时间差会导致妊娠期计算出现偏差。并且,妊娠末期胎仔生长发育较快,上述交配成功时间判定的偏差同样会影响剖宫产后胎仔体质量和身长的数值。相关资料建议,动物同笼交配最好在每天下午16:00开始。同时注意控制动物饲养室内光照和噪音,以免对动物交配行为产生影响,阴道栓检查时应于交配后次日清晨尽可能早地进行,注意不要与饲料渣混淆^[5]。另外,大鼠合笼交配后偶尔会出现黄色、琥珀样、形状不规则、无弹性、体积偏小的物体,对交配后出现上述物体的雌鼠进行阴道涂片检查,均未发现精子,认为该物体并非交配成功标志,不能记为阴道栓。同时,为避免对阴道栓未脱落的交配成功动物的遗漏,可辅助以阴道检查或阴道涂片,查看是否有未脱落的阴道栓或精子。

2.4 供试品、对照品的配制和给予

2.4.1 供试品、对照品的配制 配制前熟悉供试品和对照品理化性质等相关资料,严格按照实验方案要求进行配制及保存,并取样进行供试品分析。严禁使用配制不合格的供试品和对照品。

2.4.2 供试品、对照品的给予 生殖毒性试验动物交配时间不统一,各组间动物通常交错给药,并且妊娠动物体质量变化快,需根据动物体质量频繁调整给药量。试验人员给药操作时应仔细核对给药动物编号及其给药量,确保给药准确性。

必须在供试品维持稳定性时间内完成给药。同时注意:①需避光或低温等保存的供试品,给药过程中仍需采取相应保护措施;②配置后为混悬液的供试品,给药过程中须使用磁力搅拌器等混匀器材,以保证给予供试品浓度的均一性;③疫苗、生物制品等需低温保存的供试品给药前应先恢复常温,避

免因供试品温度过低造成给药局部不良刺激;④爱护动物,避免惊吓、摔碰和过度挤压受孕动物,尤其孕免受到摔碰或挤压等剧烈刺激易发生流产。

2.5 动物分娩、哺乳观察

2.5.1 分娩观察 准确判断动物分娩开始及结束体征,避免打扰或惊吓分娩过程中的动物,注意更换手套或用将检查动物的垫料搓擦双手,消除不同窝气味对分娩或哺乳动物的影响,避免母鼠食仔的发生。

2.5.2 哺乳观察 母鼠做窝和整理窝,照料仔鼠情况及哺乳状态,仔鼠存活情况和有无被虐体征等。

2.5.3 制定统一的动物分娩异常和哺乳异常情况判定方法和分类标准。如大鼠正常妊娠周期为21~23 d。可将早于21 d分娩定为早产,晚于23 d分娩定为晚产等。SOP或实验方案中应有关于分娩异常和哺乳异常动物的处理方法的明确规定。

2.6 胎仔(仔动物)外表、内脏、骨骼检查及仔动物发育指标和行为学检测

2.6.1 目前胎仔(仔动物)外表、内脏、骨骼检查及仔动物发育指标一般为人工检查。人工检查具有成本低,检查形式灵活的优点,但人工检查应在SOP或实验方案中制定统一的异常/变异分类名称(如输尿管折叠、弯曲或曲折成线圈时统一描述为“输尿管卷曲”,归为内脏变异,避免同时使用“输尿管蛇形”或“输尿管弯曲”等近义词)及分类评价标准(如内脏或骨骼“过大”、“过小”、“过长”、“过短”的评价标准等)。不可使用异常/变异分类名称的近义词或同义词,避免试验人员主观判定因素影响检查结果。发现胎仔(仔动物)外表、内脏、骨骼异常时应尽可能保存电子照片。

2.6.2 使用仪器设备进行动物行为学指标检测时,仪器设备应经过验证。预驯化次数及时间统一,驯化时间应适当(如大鼠转棒试验:驯化时间过短,动物转棒持续时间过短,或驯化时间过长,动物在整个转棒过程中无掉落,均影响试验结果的准确性)。正式试验重复进行两次或多次检测,取重复检测结果的均值,减少偶然误差,及时保存检测数据,防止数据丢失。噪音、试验人员情绪等会影响动物行为学评价,试验操作过程中应保持实验室内绝对安静。

2.7 动物剖检及相关指标检测

动物剖检及相关指标检测应注意:①采取合理的动物安乐死方式,避免对动物机体不当刺激导致

检测指标异常;②各组间动物剖检时间尽可能均衡;③组织脏器、胎盘及胎仔等称重前去除脂肪、血污、脐带和羊膜等异物;④胎仔身长、尾长测定采用同一标准,胎仔身体非病理性弯曲测量前应将胎仔身体弄直,由于致畸作用引起胎仔身体的病理性弯曲则直接测量;⑤采集的标本,摘取的组织脏器及时处理,组织固定液用量合适;⑥人工进行精子检查时应统一检查标准,每项操作步骤最好由单人负责,或多人进行各组均衡分配,避免人为非客观因素影响检查结果。⑦胎仔骨骼标本制作过程中每天观察标本变化状态,根据标本变化状态及时调整相应标本处理时间,防止标本消化过度、染色不全、染色过度等。⑧胎仔内脏标本固定时间应足够长,防止胎仔内脏固定不完全,组织硬度不足,而影响脑室、肾盂等结构的观察。

3 原始资料整理及总结报告撰写

3.1 原始资料整理

原始资料整理应注意:①原始资料按专题研究严格分类整理,核查记录有无缺失;②纸质记录检查有无记录不规范,修改不规范及记录不完整处;③各类标本做好标识,便于再次核查,注意阴道涂片、精子涂片、骨骼和内脏标本等标本的保存,防止损坏、丢失。阴道涂片和精子涂片保存时避免玻片间摩擦对涂片的损伤^[6-7]。胎仔骨骼和内脏标本用标本袋保存受挤压易发生损坏,标本瓶可避免上述问题,但应注意标本瓶的密闭性,防止保存液外漏。

3.2 总结报告撰写

首先,生殖毒性试验产生原始资料和数据较多,在目前数据自动采集系统应用并不广泛的情况下,多数数据需要二次整理录入。数据录入一定要多次核对,原始数据、二次录入数据和总结报告之间保持一致。其次,各项统计指标要全面,与实验方案

及原始数据核对,避免遗漏。再者,异常统计数据需参考相应品系动物的背景数据资料,避免对药物致畸性或生殖毒性做出错误判断。窝效应和窝大小等异常情况对试验结果影响的解释理由要充分合理。另外,总结报告撰写同样应注意防止套用模板产生错误。

综上所述,药物非临床生殖发育毒性试验的质量控制不仅需要QA人员的核查,更需要试验人员从研究实施者角度进行自我规范性的约束,从根本上避免错误的发生。各试验人员应履行其职责,严格执行《药物非临床研究质量管理规范》、实验方案和相关SOP。SD制定实验方案和撰写总结报告时应科学、严禁、细致。SOP及实验方案中统一各项检测指标的判定标准,并对试验参加人员进行培训,以得到真实、客观的试验结果。

参考文献

- [1] 孙祖越,周莉,闫晗,等. 药物非临床生殖发育毒性试验中逐案原则的建议[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(8): 836-843.
- [2] 孙祖越,闫晗. 生殖毒性研究进展[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(5): 365-368.
- [3] 丁日高,吴纯启. 药物生殖发育毒性研究技术特点与GLP一致性的贯彻. 药物非临床研究质量管理规范性研讨会论文集[C]. 2012, 7.
- [4] 袁伯俊,廖明阳,李波. 药物毒理学实验方法与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [5] 王志乔,袁伯俊. 临床安全性评价与实践[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1997.
- [6] 国家食品药品监督管理总局药品审评中心. 药物生殖毒性研究技术指导原则[Z]. 2006, 11.
- [7] OECD. TG416. OECD guideline for the testing of chemicals. Two-generation reproduction toxicity study[S]. 2001.