

组织交叉试验中多路径体系技术难点的探索和研究

祁德波¹, 王新国¹, 富欣², 李旻², 邢萌¹, 李欣¹, 李华^{2*}

1. 济南金域医学检验中心有限公司, 山东 济南 250100

2. 国家上海新药安全评价研究中心, 上海 201203

摘要: 组织交叉反应 (tissue cross reactivity, TCR) 是单克隆抗体药物开发过程中临床前安全评价的重要组成部分。TCR 试验的目的是发现单抗药物和靶抗原以外表位结合, 为体内试验毒副作用的监控提供参考。按照 FDA、EMA 和 CFDA 要求, TCR 需在新药临床申请 I 期临床试验前完成。近年随着单克隆抗体研发由鼠源型向全人源化单抗的转变和发展, 免疫组织化学在很多技术环节上出现了新的问题和挑战。结合自身实际工作的经验和近年来国内外组织交叉反应研究的进展, 探讨并总结单抗药物研发中 TCR 试验中的多路径体系技术难点的探索和研究经验, 期望能为进一步提高我国 TCR 试验质量, 并增加 TCR 试验对体内毒理学评价及安全用药的参考价值提供一定的参考。

关键词: 单克隆抗体; 组织交叉反应; 免疫组织化学; 技术难点

中图分类号: R967 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2017) 10 - 1372 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.10.002

Exploration on technical difficulties of multipath system in tissue cross-reactivity studies

QI De-bo¹, WANG Xin-guo¹, FU Xin², LI Min², XING Meng¹, LI Xin¹, LI Hua²

1. Jinan Kingmed Diagnostics, Jinan 250101, China

2. National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai 201203, China

Abstract: Tissue cross-reactivity (TCR) studies play an important role in the preclinical safety evaluation of monoclonal antibody (mAb) drugs. The objective of TCR studies is to find out off-target binding sites of mAbs, and provide valuable predictions for the toxicological evaluation and safety medication *in vivo*. According to the new drug application requirements of FDA, EMA and CFDA, TCR studies need to be carried out before Phase I clinic trails. As the origin of mAb drugs was transferred from murine antibodies to fully humanized antibodies in current years, immunohistochemical methods used in TCR studies were confronted with some new problems and challenges. Taking our own experiences and recent progress on TCR studies at home and abroad together, the authors summarized the recent exploration on technical difficulties of multipath system in TCR studies. This may provide valuable insight for further improving the quality of TCR studies and increase the predictive value of TCR studies for *in vivo* toxicological evaluation in China.

Key words: monoclonal antibodies; tissue cross-reactivity; immunohistochemistry; technical difficulties

特异性单克隆抗体药物治疗是恶性肿瘤^[1-2]、自身免疫性疾病^[2-3]和器官移植后免疫排斥反应^[2-4]等疾病靶向治疗的主要手段之一, 也是近几年药物开发的重点和热点。组织交叉反应 (tissue cross reactivity, TCR) 是单克隆抗体药物开发过程中的重要组成部分。TCR 试验采用免疫组织化学技术,

对一系列人和动物的组织进行染色。目的是发现单抗药物和靶抗原以外表位结合, 为临床前毒性试验相关动物种属的确定, 以及临床试验毒副作用的监控提供参考^[5]。按照 FDA、EMA 和 CFDA 要求, TCR 需在新药临床申请 I 期临床试验前完成^[6-8]。早期, 单抗药物主要是鼠源性单克隆抗体,

收稿日期: 2017-07-10

基金项目: “十二五”重大专项定向择优 (2015ZX09501004-002-006 和 2015ZX09501-007-003); 上海市新药安全评价专业技术服务平台 (15DZ2290300); 上海市浦东新区科委 CRO 项目 (PKF2014-C01)

作者简介: 祁德波, 博士, 病理主治医师。研究方向为外科病理学和分子病理学。

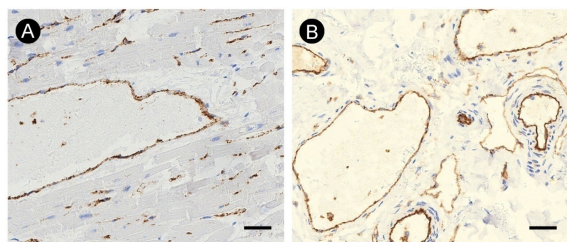
*通信作者 李华, 博士, 副研究员, 研究方向为心血管毒理和免疫毒理。E-mail: hli@ncdser.com Tel: (021)60211993

有较强的免疫原性,注射后很快会诱导人体产生抗体,从而产生耐药;另外,作为异种蛋白也可能会引发过敏反应。随着分子生物学技术和生物制药技术的飞速发展,近年单克隆抗体研发由鼠源向全人源化单抗转变,这也使 TCR 试验中免疫组织化学方法在很多技术环节上出现了一些新的问题和挑战。人源化单克隆抗体虽然没有明显免疫原性,但是人组织中可能会有 Fc 受体,可与药物的恒定区结合,从而产生非特异性着色;另外,如果采用跟鼠源性单抗相同的显色系统,就会受人体自身 IgG 的影响,导致非特异染色增多。本文中笔者就单抗药物 TCR 试验中多路径体系中存在的技术难点,结合自身实际工作的经验和近年来国外组织交叉反应研究的进展进行探讨并总结。

1 人体和动物组织的选用

1.1 手术组织或尸检组织的选择

TCR 试验中人组织来源主要有两种途径:尸体解剖组织和手术标本。手术标本是推荐的人组织来源,可及时冻存或固定,形态学和抗原保存更佳,但部分组织不易获得,如脑、垂体、心脏等;另外,手术切除组织经常带有某一种疾病,不符合要求,这就需长时间甄选收集。而尸体解剖组织,解剖一具遗体就能收集所需全套组织,但受传统观念影响,国内目前遗体捐赠少,解剖率明显低于欧美,且捐赠手续繁琐,从捐赠者死亡到组织冻存或固定时间较长,形态学和抗原保存欠佳(图1)。当今,欧美发达国家 TCR 试验用人体组织主要来自商业化运作的“组织银行”,而我国标准化 TCR 人体组织库尚未发展成熟,仅少数公司能提供组织购买服务,



尸检心脏组织 CD31 染色在血管内皮呈现较松散颗粒状,说明尸检组织保存欠佳,抗原已经开始崩解;手术乳腺组织 CD31 染色在血管内皮呈现连续线性表达,说明手术组织固定及时,抗原保存良好。比例尺代表长度为 40 μm

图1 尸检心脏组织(A)和手术乳腺组织(B) CD31 染色比较

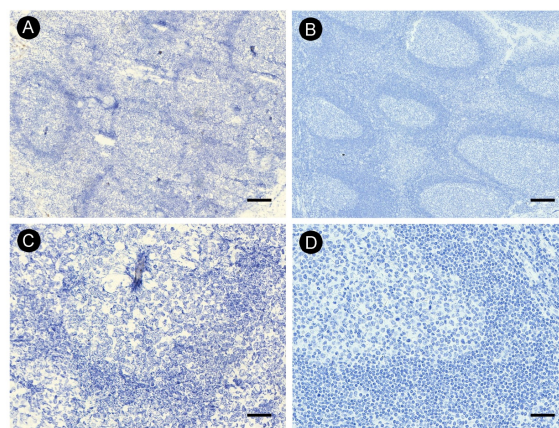
Fig. 1 Comparison of CD31 staining between postmortem cardiac tissue (A) and surgical breast tissue (B)

且组织种类严重不全,因而造成现阶段国内人体组织获取困难,且组织质量参差不齐^[9]。

1.2 冰冻组织与石蜡组织比较

据 FDA 和 EMA 要求,通常采用人和动物的冰冻组织进行 TCR 试验^[7,8,10]。冰冻组织未经过固定液处理,最大可能使抗原的结构接近生理状态,是理论上首选的试验标本。但冰冻组织需要低温冷冻保存,且对切片技术要求较高,镜下形态保存欠佳(图2A和2C),造成抗体定位靶抗原困难,进而影响亚细胞精确定位的判断(图3A);另外,富含脂肪组织,如乳腺和皮肤,以及较硬组织,如骨,很难完成制片。

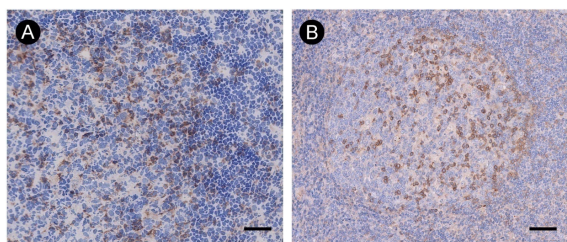
尽管目前大多数药品监管机构的指导原则不推荐使用石蜡组织进行 TCR 研究,但目前我国人体冰冻组织的获取仍有一定困难,大部分国内获得的人体冰冻组织来源复杂,组织质量参差不齐。如果从国外购买,组织来源的人种遗传背景与我国人群有很大不一致性,这可能会影响 TCR 试验的指导价值。因此,现阶段甲醛固定并石蜡包埋的组织在我国 TCR 试验中仍有重要价值,这也是 CFDA 继续批准石蜡组织可以用于 TCR 试验的重要原因^[6]。与冰冻组织相比,石蜡包埋组织保存方便,形态保存良好(图2B和2D),亚细胞定位准确(图3B)。但也应注意到固定、包埋和修复过程可改变组织的抗原结构,导致原有抗原结合表位消失,从而导致 TCR 试验失败;偶尔也会产生新的化学或空间结



所有组织均为 PBS 替代一抗,孵育后生物素系统显色。与冰冻切片相比,石蜡组织淋巴组织各结构清晰,形态保存良好。A 和 B 的比例尺代表长度为 200 μm , C 和 D 的比例尺代表长度为 40 μm

图2 人扁桃体组织冰冻(A, C)和石蜡组织(B, D)镜下形态学比较

Fig.2 Morphological comparison between frozen (A, C) and paraffin-embedded (B, D) human tonsil tissues



在冰冻切片上,由于组织形态和抗原保存欠佳,单抗药物 A 染色呈现较松散的颗粒状,亚细胞定位比较困难;在石蜡切片上,组织形态和抗原保存很好,单抗药物 A 染色呈现清晰膜/浆染色特点。比例尺代表长度为 40 μm

图3 单抗药物 A 在冰冻(A)和石蜡(B)人慢性扁桃腺炎组织染色比较

Fig.3 Comparison of monoclonal antibody drug A staining results between frozen (A) and paraffin-embedded (A) human chronic tonsillitis tissues

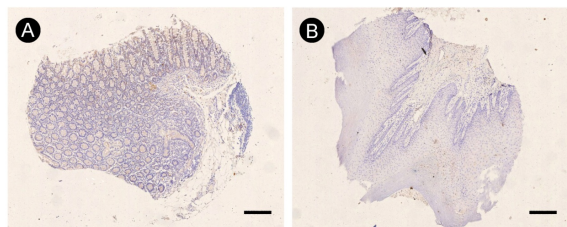
构,导致非特异性结合。因此,应采取具体情况具体分析的原则,酌情选择冰冻或石蜡组织来进行不同单抗药物的 TCR 试验研究。

1.3 组织块或芯片的选用

在国内,目前组织芯片也广泛用于 TCR 试验。与组织块相比,组织芯片为多种组织集成,能“大通量”地在短时间内完成试验;但各组织面积较小,可能不能涵盖部分器官中所有组织成分,也容易脱片;另外,同一器官或组织不同区域,抗原分布可能会有一定异质性,芯片可能会导致试验结果的不准确(图4)。因此,组织芯片推荐用于 TCR 研究预试验,能缩短摸索最佳反应条件所需时间^[9,11,12]。

2 单克隆抗体药物不同标记和显色系统的选择

在人源化单抗 TCR 试验中,常用二步法对药物

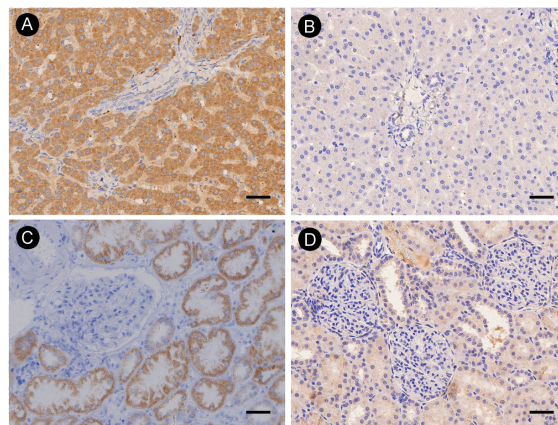


食蟹猴结肠(A)仅取到黏膜,缺乏黏膜下层和肌层;食蟹猴宫颈(B)仅取到鳞状上皮,缺乏腺上皮和纤维肌层。在使用组织块进行试验时,发现单抗药物 B 与结肠和宫颈的平滑肌纤维细胞浆有特异性结合,如果运用组织新芯片就可能漏检。比例尺代表长度为 266.7 μm

图4 单抗药物 B 在食蟹猴组织芯片上 TCR 试验染色结果

Fig.4 Staining results of monoclonal antibody drug B on cynomolgus monkey tissue chip

进行生物素标记和显色。一个药物分子可同时标记多个生物素,生物素和卵白素有很高的亲和力,且1个卵白素可同时与4个生物素结合。因此,卵白素在与药物标记的生物素结合后,再可与生物素标记的辣根过氧化物酶结合,组成信号放大和显色系统,这大大提高了敏感性。卵白素与生物素间的结合具有高度专一性,且不受酸、碱、变性剂、蛋白溶解酶以及有机溶剂的影响^[12]。生物素标记和显色系统技术简单,成熟可靠,但缺点是体内很多器官和组织,如肝、肾、胃等,存在着丰富的内源性生物素,会产生较强的内源性非特异性着色,且不能完全为阻断试剂盒所阻断,给判读造成一定困难(图5A和5C)。而 FITC 标记和显色系统,现已逐渐成为国际上 TCR 试验首选。FITC 的抗体标记技术成熟,应用广泛。但现在的技术难点是缺乏成熟可靠的抗 FITC 单克隆抗体,且价格高昂。如果直接使用荧光显微镜显色,荧光切片不能长期保存,且石蜡组织有较强自发荧光,这也会干扰结果的判读;但其优点是人和动物组织无相应内源性物质,不会产生非特异性着色,从而使结果判读简单可靠(图5B和5D)。



肝(A)和肾(C)含有丰富的内源性生物素,虽用生物素阻断试剂盒阻断,仍可见明显内源性非特异性染色;FITC 系统无相应内源性物质,肝(B)和肾(D)没有产生非特异性着色。比例尺代表长度为 40 μm

图5 单抗药物 B 分别使用生物素(A, C)和 FITC 标记(B, D)后显色效果比较

Fig.5 Comparison of monoclonal antibody drug B staining results with biotin- (A, C) or FITC-labeling (B, D)

3 阳性和阴性对照组织的选择或制作

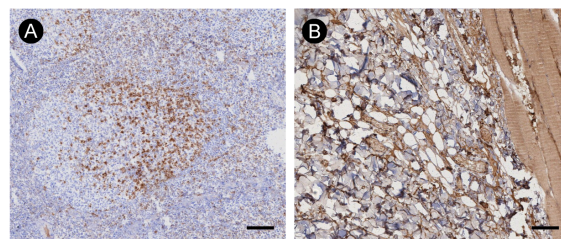
TCR 试验进行阳性和阴性对照筛选时,建议首先选用组织块^[12]。组织块靶抗原的分布和微环境更接近体内状态。但在缺乏相应对照组织时,可以考

考虑使用细胞系、纯化蛋白和抗原包被的琼脂糖珠作为对照品。筛选阳性对照组织时，可以选用表达相关靶抗原的正常组织或肿瘤组织，经商业化抗体验证后作为阳性对照组织使用（图 6A）；没有相关阳性组织时，可利用分子生物学技术将相关靶抗原基因导入特定细胞基因组，构建阳性细胞系；或将靶抗原蛋白直接注射入动物组织，构建阳性组织块，使用商业化抗体验证后使用（图 6B）。挑选阴性对照组织时，则相对容易，只需选用公认不表达相关靶抗原的正常组织、肿瘤组织或细胞，使用商业化抗体验证后作为阴性对照组织使用。

4 TCR 试验中药物最佳浓度和最高浓度的选择和设定

在 TCR 试验中，首先需将标记好的单抗药物梯度稀释后，分别对阳性对照和阴性对照组织进行染色，建立免疫组化方法学参数。如图 7 所示，最佳浓度的设置，应选择与阳性组织出现明显结合的最低浓度^[7]；需注意最佳浓度的设置不可过低，否则会影响试验敏感性。而最高浓度设置时，应选择与

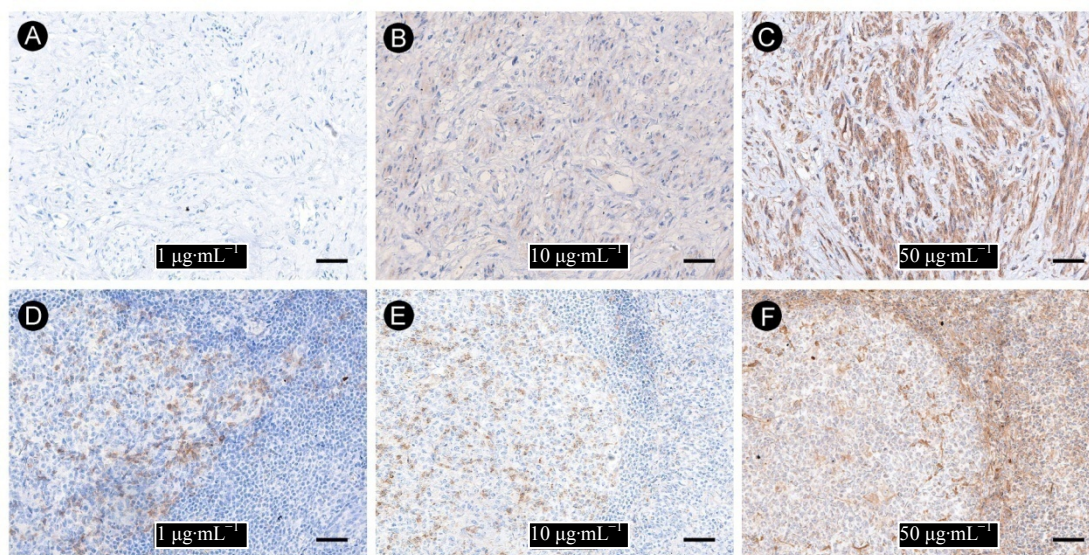
阳性组织出现明显结合，但未在阳性对照和阴性对照组织产生非特异性着色的最高浓度，这样才能保证试验结果的特异性。另外，最高浓度不应超出动物试验和人体试验能达到的最高血药浓度，这才可以保证试验结果对体内毒理学评价的参考价值。



单抗药物 A 的靶点位于淋巴组织，我们选择人慢性扁桃体炎组织为阳性对照组织，（A）为商业化抗体验证结果，阳性细胞主要分布于淋巴组织滤泡生发中心；单抗药物 B 没有筛选到合适阳性组织，（B）为将靶抗原直接注射进大鼠皮内制作组织块后，商业化抗体验证结果，可见皮内纤维结缔组织间明显阳性，可以用作阳性对照组织。比例尺代表长度为 40 μm

图 6 阳性对照组织的选择或制作

Fig.6 Selection or production of positive control tissues



A-C 为阴性对照组织（人子宫平滑肌瘤组织）染色结果，D-F 为阳性对照组织（人慢性扁桃体炎组织）染色结果。1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下，阴性对照组织无染色，阳性对照组织可见较强染色；10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下，阴性对照组织出现微弱背景着色，阳性对照组织染色强度和范围与 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下染色无明显变化；50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下，阴性对照组织出现较强非特异性着色，阳性对照组织也在滤泡间区出现了较强背景着色。因此，在浓度设定时，可以选择 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为最佳浓度，而最高浓度设定不要超过 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，这才能保证 TCR 试验结果的特异性。比例尺代表长度为 40 μm

图 7 单抗药物 A 浓度筛选结果

Fig.7 Titer selection results of monoclonal antibody drug A

5 对照组的设立

在 TCR 试验中，应设置不同对照来检测药物、试剂、染色步骤与方法的可靠性，进而保证判读结果的准确性和特异性。按照 FDA 1997 年指南^[7]规

定：TCR 试验需设立阳性对照（positive control）和阴性对照（negative control）。此外，空白试剂对照（assay control）、组织可接受性对照（tissue acceptability control）和同型对照（isotype control）

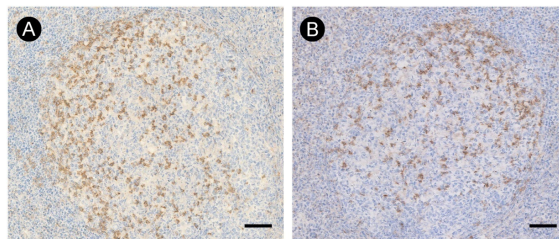
也具有重要意义^[5]。阳性对照和阴性对照可分别用来保证染色过程成功和特异性。空白试剂对照,常用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替一抗,可帮助排除非特异背景染色。组织可接受性对照,常用在组织中组成型表达蛋白,如CD31、转铁蛋白受体或 Vimetin 的抗体,确保组织合格,抗原保存良好。而同型对照,要求除互补决定区外,其他结构应与供试品药物结构完全相同,这样可以排除由于 Fc 片段或其它非特异性吸附引起的非特异性染色。

6 TCR 试验过程中免疫组化染色质量控制

TCR 试验中,免疫组化步骤较多,目前主要是手工操作,需要多批次才能完成,因而容易受到多种因素影响,从而造成不同批次染色结果之间有一定差异。笔者的经验是,每批次试验设置阳性质控对照组,通过观察不同批次间的免疫组化染色结果变化,来确定不同批次间试验条件是否一致(图8)。由于手工操作有一定的局限性,笔者进行了机器自动化免疫组化染色探索。机器操作,能最大程度保证不同批次试验条件的一致性,染色效果也明显由于手工操作(图9)。

7 免疫组化结果的解读和分析

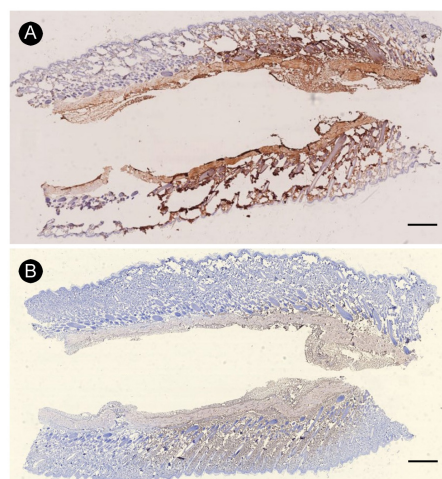
TCR 试验结果的判读是整个试验的关键环节,主要取决于病理学家对免疫组化技术的理解,对供试品靶抗原组织分布的掌握,以及形态学和免疫组化结果判读功底。在 TCR 结果判读前,应对免疫组化染色技术质量评估,如组织结构是否完整、脱蜡是否充分、是否有脱片或干片等现象。如果质量不合格,应重新试验。判读时需结合不同对照,做出阳性或阴性结果判读(图10)。作出阴性免疫组化结果判读前,应排除是否由漏加试剂、一抗失效,二抗与一抗不匹配、抗体孵育时间过短、显色试剂失效和显色时间不够等原因造成的假阴性^[5,12]。作出阳性免疫组化结果判读时,也应结合不同对照组结果,排除由封闭血清与二抗来源不一致、内源性酶和生物素、抗体浓度过高、清洗步骤不充分、抗体孵育和显色时间过长和组织假象等导致的假阳性^[5,12]。假阳性结果可能会干扰经验不足的病理学家的 TCR 结果判读,从而将假阳性结果误判为真阳性结果,判读困难时可以进行同行评议。阳性结果应半定量地观察和记录染色强度和染色范围,也应对染色进行亚细胞定位(细胞核/浆/膜),同时应记录背景着色情况。



虽然两个批次相差两个月,但这两个批次阳性对照组织染色范围和强度一致,说明染色条件基本一致。比例尺代表长度为 40 μm

图8 单抗药物 A 在 2016 年 12 月 8 日批次(A)和 2017 年 02 月 08 日批次(B)阳性质控对照染色结果比较

Fig.8 Comparison of monoclonal antibody drug A staining results in batches done on December 8, 2016 (A) and February 8, 2017 (B)



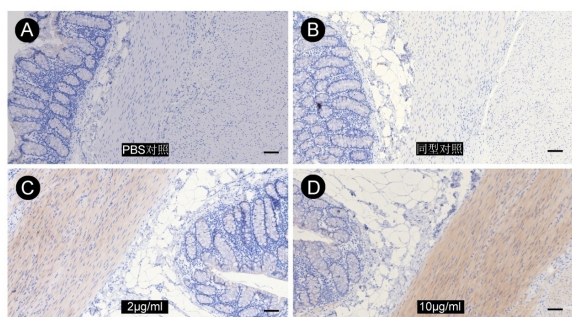
机器染色深,颜色鲜艳,而手工染色浅,颜色晦暗。比例尺代表长度为 1 000 μm

图9 单抗药物 B 机器(A)和手工染色结果比较(B)

Fig.9 Comparison of monoclonal antibody drug B staining results done by machine (A) or by manual operation (B)

对于 TCR 试验结果对体内药物毒理反应和用药安全指导有多大意义,目前仍存在较大争议。抗体与非目标靶位的结合在体内试验时并不一定预示相应部位的组织损伤,这预示 TCR 试验结果与单抗药物体内毒性反应并不一定高度相关^[13]。因此,在分析和预测阳性结果的毒理学意义时,要考虑到体外 TCR 试验环境,与体内单抗药物与靶点的结合环境是有很大的差异的。TCR 试验中组织经冷冻、固定和切片处理后,单抗药物可接触所有细胞成分,包括细胞膜、细胞质和细胞核。而在体内,大分子药物很难穿透细胞膜进入细胞内,与细胞浆和细胞核中的抗原表位结合;另外,体内还存在着血-脑屏障、血-眼屏障、血-睾屏障等,这也阻止了大分子

单抗药物转运到这些组织^[12]。因此需要结合体内毒理学安全性评价数据,对 TCR 试验结果进行综合评估和解释,特别注意要避免过度解读(图 10)。



PBS 对照(A)和同型对照(B)未见染色,但单抗药物在 $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (C)和 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (D)浓度下,平滑肌纤维胞浆均可见着色。考虑到体内单抗药物无法穿过细胞膜与胞浆内靶点结合,因而此种结合没有毒理学意义。这与毒理学结果一致,体内临床前毒理学试验结果也未观察到毒性反应。比例尺代表长度为 $40\mu\text{m}$

图 10 A-D 为单抗药物 B 在食蟹猴结肠组织染色结果
Fig.10 Figure A-D show the staining results of monoclonal antibody drug B on cynomolgus monkey tissue of colon

8 结论

TCR 试验技术和结果判读有一定技术难度,且目前国内单抗药物 TCR 试验存在较多缺陷和不足,如试验组织获得困难、组织质量参差不齐、技术体系不成熟、病理学家的经验及专业判断欠缺等。本文中笔者结合自身实际工作的经验和近年来国内外 TCR 研究的进展,系统探讨并总结了单抗药物研发中 TCR 试验多路径体系技术难点的探索和研究经验。为保证 TCR 试验高质量完成,笔者认为试验技术人员,特别是病理学家对免疫学、形态学、免疫组织化学、单抗药物研发相关理论和技术的熟练掌握是前提;通过 TCR 试验中多路径体系技术难点的探索和研究,建立成熟的技术体系和严格的质量控制体系是关键。另外,免疫组化结果要科学判读,特别是要避免对结果的过度解读,必要时应结合体内毒性试验结果进行综合分析。总之,推动和建立 TCR 试验用组织、试验体系、试验操作、结果判定及总结报告的标准化,这将有助于推动我国单抗药物研究和开发的发展和进步,并达到世界先进水平。

声明

本文中所有图片均从济南金域医学检验中心与国家上海新药安全评价研究中心联合 TCR 试验平台日常工作中获取,版权归属《药物评价研究》杂志和作者所有,未经许可,不得擅自使用。

参考文献

- [1] Sharma P, Allison J P. The future of immune checkpoint therapy [J]. Science, 2015, 348(6230): 56-61.
- [2] Jameson J L, Longo D L. Precision medicine-personalized, problematic, and promising [J]. N Engl J Med, 2015, 372(23): 2229-2234.
- [3] Bruno V, Battaglia G, Nicoletti F. The advent of monoclonal antibodies in the treatment of chronic autoimmune diseases [J]. Neurol Sci, 2011, 31(Suppl 3): 283-288.
- [4] Yeung M Y, Gabardi S, Sayegh M H. Use of polyclonal/monoclonal antibody therapies in transplantation [J]. Expert Opin Biol Ther, 2017, 17(3): 339-352.
- [5] Leach M W, Halpern W G, Johnson C W, et al. Use of tissue cross-reactivity studies in the development of antibody-based biopharmaceuticals: history, experience, methodology, and future directions [J]. Toxicol Pathol, 2010, 38(7): 1138-1166.
- [6] CFDA. 人用单克隆抗体质量控制技术指导原则 [EB/OL]. (2003-03-20) [2017-06-05]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0237/15707.html>.
- [7] FDA. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use [EB/OL]. (1997-02-28) [2015-11-21]. http://www.fda.gov/downloads/biologics_blood_vaccines/guidance_compliance_regulatory_information/other_recommendations_for_manufacturers/ucm153182.pdf.
- [8] EMEA(CHMP). Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first in human clinical trials with investigational medicinal products [EB/OL]. (2007-09-01) [2015-11-21]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002988.pdf.
- [9] 余珊珊,王海学,胡晓敏,等. 组织交叉反应试验在非临床安全性评价中的应用及案例分析 [J]. 中国新药杂志, 2016(06): 634-638.
- [10] Shi S R, Liu C, Pootrakul L, et al. Evaluation of the value of frozen tissue section used as "gold standard" for immunohistochemistry [J]. Am J Clin Pathol, 2008, 129(3): 358-366.
- [11] 林志,屈哲,吕建军,等. 单克隆抗体类药物组织交叉反应常见问题的探讨 [J]. 中国新药杂志, 2012(14): 1600-1602.
- [12] 吕建军,张硕,林志,等. 单克隆抗体及基于抗体类药物组织交叉反应研究现状及关注点 [J]. 药物分析杂志, 2015(12): 2061-2069.
- [13] Bussiere J L, Leach M W, Price K D, et al. Survey results on the use of the tissue cross-reactivity immunohistochemistry assay [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2011, 59(3): 493-502.