

毒性试验中的脏器质量及系数

倪家敏, 周 飞*, 黄暨生, 郭秋平

广州医药研究总院有限公司 药物非临床评价研究中心, 广东 广州 510240

摘 要: 脏器质量及系数的分析是药物、生物制剂、食品添加剂和医疗器械等毒性试验评价中不可或缺的部分, 可能是体现某些受试物毒性的最敏感指标。然而, 脏器的选择以及称质量条件、计算方法等均可能对试验结果的分析产生影响, 以致最终影响对受试物毒性的判断。综合分析影响脏器质量及系数的因素, 以期用科学严谨的方法进行脏器质量的评价和解释, 为毒性试验结果的评价提供一个比较准确的参考指标。

关键词: 脏器质量; 脏体系数; 脏脑系数; 毒性试验; 安全性评价

中图分类号: R992 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 10-2143-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.10.039

Organ weight and coefficient in toxicology experiments

NI Jiamin, ZHOU Fei, HUANG Jisheng, GUO Qiupin

Drug Non-clinical Evaluation Center of Guangzhou Institute of Pharmaceutical Industry, Guangzhou General Pharmaceutical Research Institute, Guangzhou Guangdong, 510240, China

Abstract: The analysis of organ weight and coefficient in toxicology experiments is an indispensable part of the evaluation of drugs, chemicals, biological agents, food additives and medical devices, because it may be the most sensitive indicators of the toxicity of test substances. However, weighing conditions (such as exsanguination or no exsanguination, weighing fresh or after fixed organs), statistical methods of weight data, and preferred organs for weighing may all have effects on the evaluation of test substances or organ weight. This article comprehensively analyzed the factors of affecting organ weights and coefficient, with a view to scientifically rigorous methods for organ weight evaluation and interpretation, in order to provide a more accurate reference index for the evaluation of results of toxicology experiments.

Key words: organ weight; organ/body weight ratio; organ/brain weight ratio; toxicology experiments; safety evaluation

判断外源性药物对动物特定脏器的影响, 即识别靶器官是毒性试验评价的一个重要指标。对于大多数毒性试验评价来说, 这个过程主要是通过对脏器的肉眼观察、称质量以及组织病理学检查来实现的。在某些情况下, 动物脏器常常没有任何肉眼和镜下变化, 但处理组动物与未处理组(对照组)动物之间的脏器质量或系数可能存在显著性统计学差异; 因此, 脏器质量可能是某些毒性试验最敏感的指标^[1-2]。处理组动物与未处理组动物的脏器质量的比较常常因组间体质量或其他因素的差异而复杂化, 所以评价脏器质量的有用性以及相应数据的统计分析方法也一直是毒性试验的讨论主题^[3]。

对脏器质量的分析是药物、生物制剂、食品添加剂和医疗器械的毒性试验评价的重要组成部分, 所以本研究综合分析影响脏器质量的因素及其数据的统计方法, 以期用科学严谨性的方法进行脏器质量评价和解释, 为分析毒性试验的结果提供参考^[4-6]。

1 脏体系数和脏脑系数的说明

当毒性试验周期较长时, 动物体质量的增幅通常是不一致的, 此时脏器的绝对质量就会受到体质量的影响; 一般而言动物的基础体质量差别大时, 其脏器质量的差别也会比较大, 因此根据这些脏器质量来判断受试物的靶器官可能得不到明确的结果^[3]。在这种情况下, 通常会采用脏体系数来统计

收稿日期: 2020-01-22

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制(2018ZX09721004-001-003)

第一作者: 倪家敏(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为毒性病理。E-mail: jiamin1014@126.com

*通信作者: 周 飞(1987—), 男, 兽医病理学家, 工程师。E-mail: feika110@hotmail.com

各组动物的脏器质量,即脏器质量除以该动物的体质量所得到的比值,以此来消除体质量增幅不一致对脏器质量的影响。

在某些毒性试验中,受试物也会对动物摄食量、消化吸收能力或其他影响动物体质量的因素产生影响,从而导致药物处理组和未处理组动物之间的体质量存在差异,而且不同药物剂量组之间的体质量也会存在差异,此时采用脏体系数可能就会使试验结果产生偏差。比如说,当给药组动物体质量及其脏器质量均由于受试物毒性而下降时,脏体系数(脏器质量与体质量的比值)可能就会趋近于正常组动物,故脏体系数就不适用于这类毒性试验。此时,通常会采用脏脑系数比来统计各组动物的脏器质量,即脏器质量除以该动物的脑质量所得到的比值,以此来消除体质量变化对脏体系数的影响;因为通常成年动物的脑质量是基本不变的,而且神经毒性类的受试物所占比例相对来说也很少^[3]。

2 不同国家、地区药政法规对脏器称质量规定的区别

美国毒性病理学会(the Society of Toxicologic Pathology, STP)曾在欧洲、北美和日本的制药、兽医、化学和食品等公司中对啮齿类和非啮齿类动物

的毒性试验中脏器的称质量做过相关调查,将收集到的数据按照行业类型和地理位置进行了评估。数据显示,脏器质量虽然被一致认为是确定受试物影响的1个很好的筛选工具,但在具体哪些脏器质量是最有价值的问题上还存在分歧^[4]。

美国环境保护局(Environmental Protection Agency, EPA)、经济合作与发展组织(Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD)、日本经济贸易产业省(Ministry of Economy, Trade and Industry, METI)、国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)等指南或指导原则已列出在啮齿类和非啮齿类动物的重复给药毒性试验中需称质量的脏器,如表1所示^[4,7-10]。与国内指导原则相比,国外各项指南主要是在生殖器官和甲状腺(含甲状旁腺)的称质量上有所不同。在某些情况下,一些指南还提出了需在特殊试验中称质量特定的脏器。例如,人用药品注册技术要求国际协调会议(international conference on harmonization, ICH)指出,在雄性生殖系统的毒性试验中应对睾丸进行称质量;欧洲药品评估机构(The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA)指出,在吸入性试验

表1 在啮齿类和非啮齿类动物的重复给药毒性试验中各法规推荐称质量的脏器^[4,9]

Table 1 Regulations listed organs to be weighed in repeated dosing toxicity studies in rodent and non-rodent species

	脑	心脏	肝脏	肾脏	脾脏	胸腺	肾上腺	甲状腺与 甲状旁腺	垂体	睾丸	附睾	前列腺	卵巢	子宫
OPPTS 重复给药,生殖/发育 筛选,OPPTS 和 METI 28 d 啮 齿类动物	X	X	X	X	X	X	X			X	X			
OECD 生殖/发育筛选经口 28 d 重复给药试验,啮齿类动物	X	X	X	X	X	X	X			X	X			
OECD/METI 啮齿类动物 90 d 经口重复给药毒性试验, OECD 非啮齿类动物	X	X	X	X	X	X	X	Xnr		X	X		X	X
JMAFF 啮齿类动物 90 d 经口 重复给药毒性试验	X	X	X	X	X	X	X	Xt		X			X	
JMAFF 非啮齿类动物 90 d 经 口重复给药毒性试验	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	
NMPA 啮齿类动物重复给药 毒性试验	X	X	X	X	X	X	X			X	X		X	X
NMPA 非啮齿类动物重复给 药毒性试验	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X

X-需称质量的脏器;Xnr-称质量甲状腺和甲状旁腺;Xt-仅称质量甲状腺;OPPTS 是 EPA 的下属机构

X - organs to be weighed; Xnr - thyroid is weighed with parathyroid; Xt - only thyroid is weighed; OPPTS is a subordinate agency of EPA

中应对肺脏进行称质量;美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)指出,在免疫毒性试验中需对免疫系统的脏器进行称质量^[4]。

3 获得脏器质量及系数数据的几个重要影响因素

3.1 放血或不放血称质量

在脏器称质量的操作中,有时会在放血是否充分的问题上存在一定分歧,特别是在出现死亡动物的毒性试验中。Sullivan^[11]通过麻醉放血处死大鼠模拟放血后脏器称质量,而采用过量麻醉处死大鼠6 h后,不放血剖检动物来模拟在毒性试验中发现死亡大鼠的情况,脏器的绝对质量和脏体系数两个数据显示,放血后称质量的肝、肾质量在统计学上显著低于未放血的质量。此外,Regoeczi等^[12]通过比较大鼠腹主动脉放血和断尾放血2种放血方法,证明血液残留对肝脏质量的称量也有显著影响,且腹主动脉放血的方法相对快速和完全。综合以上结果,Sullivan^[11]提出,如果毒性试验的方案要求不论死因都要称质量脏器,那么放血后称质量的脏器质量数据应与从死亡大鼠中获得的数据分开;最好不要称量死亡大鼠的脏器,因为相对其他大鼠,死亡大鼠中有无法控制的变量,缺少与之相匹配的对照数据。

3.2 湿质量或固定后称质量

在某些试验方案中,有时会要求对大量动物同时进行剖检,这些方案往往还会要求称量多个器官,因此这种脏器称质量是非常耗时的,可能会增加脏器的自溶、脱水和其他人为改变。Kanerva等^[13]统计和比较20只雌性大鼠和20只雄性大鼠新鲜脏器的湿质量与固定72 h后的脏器质量,发现在广泛性脏器取样中,肝脏、肾脏、大脑、肺脏、脾脏和睾丸等脏器的平均湿质量与固定后脏器的平均质量的差异有统计学意义,但这些脏器湿质量的标准误与固定后质量的标准误是相当的,说明固定引起的各脏器的变化是一致的。因此,Kanerva等^[13]提出固定后的脏器质量可能是新鲜脏器质量的一个有效替代值,但在确定固定后脏器质量的有效性之前,必须建立一个足够大的比较数据库。

4 脏器质量及系数的毒理学应用及意义

4.1 脏器系数的优选

了解绝对脏器质量、脏体系数和脏脑系数之间的关系,以及哪个参数最能预测受试物对脏器质量的真实影响,将有助于病理学家改进对脏器质量的解释。Bailey等^[1]建模分析了26项毒性试验中对照大鼠的脏器质量的数据,结果表明,脏体系数更适

合用于评价受试物对肝脏和甲状腺的毒性,而脏脑系数更适合用于评价受试物对卵巢和肾上腺的毒性;脑、心脏、肾脏、垂体和睾丸的质量无法通过这两种脏器系数来很好地建模,应使用其他分析方法,如协方差分析。

4.2 脏器质量改变与组织病理学改变的关联

毒性试验中,脏器质量的改变往往可能提示着脏器的某些病变。比如,肝脏质量的增加可能与增生、炎症或肝细胞肥大相关;心肌肥大通常在宏观和微观上都难以识别,但可以通过心脏质量的增加来判断;肾脏质量的变化可能反映出肾脏毒性、肾小管肥大或慢性进行性肾病等病变;肾上腺质量的变化可能提示与内分泌疾病或受试物效应相关的肥大、增生或萎缩;睾丸质量的变化可能与生精小管或间质水肿有关;附睾质量的变化可能是精子产生减少的敏感指标^[7,14-16]。

虽然脏器质量的改变预示着脏器的改变,但由于光学显微镜观察的局限性,这种改变并不能总是在组织病理学检查中观察到。ESTP专家指出,当肝脏质量至少增加20%时,镜下肝细胞肥大的病理改变才易辨认^[17]。所以,Hall等^[18]提出,当脏器质量发生改变时,光学显微镜下有可能是未见异常的,需要借助免疫组织化学、电镜等其他更精细的试验技术来解释这种改变。

5 在毒性试验中如何使用好脏器质量及系数的数据

在一项特定的毒性试验中,药物处理组动物的脏器质量及系数最好是与同期对照组进行比较。当同期对照组动物的脏器质量及系数异常时(与历史对照组相比,异常增高或异常降低),将导致处理组脏器质量及系数出现相对的降低或升高,从而导致假阳性结果的产生,此时将处理组的脏器质量及系数与历史对照组的脏器质量及系数进行比较可能更为准确,但要求历史对照组的年龄、性别、劳损程度、体质量、禁食状态和使用的溶媒等均与该试验相匹配^[7]。在非啮齿类动物试验中,通常每组动物数量较少,可能会出现对照组个体动物的脏器质量及系数变异较大,此时参考历史对照数据也有一定的意义。历史对照数据应定期更新,以尽量避免随时间推移而导致脏器质量及系数数据集的漂移,一般认为5年以内的数据比旧数据更合适^[7]。

6 展望

在针对脏器质量的描述中,各行业、各地区、各法规指南均有所不同,没有统一的全球标准,但普

遍认同脏器质量是常规毒性试验中一种表征受试物效应的筛选工具^[7]。然而,关于脏器质量的称质量条件、统计分析方法以及哪种脏器质量的数据最有价值还存在很多分歧,这也从一定程度上说明了脏器质量的局限性。影响动物脏器质量的因素有很多,脏器质量的改变不一定是与受试物直接相关的,也可能是一种继发反应;不能从脏器质量的改变直接判定脏器的病理改变,也不能从脏器的病理改变反推出脏器质量的改变^[3]。因此,脏器质量虽然是毒性试验的必要指标,但也只能作为试验评价的一个参考指标,需要全面综合考虑各种影响脏器质量的因素并加以标准化,才可能得到一个较为可靠的脏器绝对质量或脏体系数或脏脑系数的正常值参考范围,建立一个实用、有效的背景数据库,从而更好地服务于毒性试验评价。

参考文献

- [1] Bailey S, Zidell R, Perry R. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint ? [J]. *Toxicol Pathol*, 2004, 32(4): 448-466.
- [2] Heywood R. Target organ toxicity [J]. *Toxicol Lett*, 1981, 8(6): 349-358.
- [3] 袁本利. 药物安全评价中脏器系数的意义及不足 [J]. *中国新药杂志*, 2003, 12(11): 85-88.
- [4] Michael B, Yano B, Sellers R S, et al. Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(5): 742-750.
- [5] 孙建新, 安娟, 连军. 影响实验动物脏器重量及脏器系数因素分析 [J]. *实验动物科学*, 2009, 26(1): 49-51.
- [6] Shirley E. The analysis of organ weight data [J]. *Toxicology*, 1977, 8(1): 13-22.
- [7] Sellers R S, Morton D, Michael B, et al. Society of toxicologic pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(5): 751-755.
- [8] Buschmann J. The OECD guidelines for the testing of chemicals and pesticides [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 947: 37-56.
- [9] 国家食品药品监督管理局. 药物研究技术指导原则 (2005年) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2006.
- [10] 笪红远, 韩玲, 王庆利. 对《药物重复给药毒性研究技术指导原则》的解读 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2014, (8): 744.
- [11] Sullivan D J. The effect of exsanguination on organ weight of rats [J]. *Toxicol Pathol*, 1985, 13(3): 229-231.
- [12] Regoeczi E, Taylor P. The net weight of the rat liver [J]. *Growth*, 1978, 42(4): 451-456.
- [13] Kanerva R L, Lefever F R, Alden C L. Comparison of fresh and fixed organ weights of rats [J]. *Toxicol Pathol*, 1983, 11(2): 129-131.
- [14] Amacher D E, Schomaker S J, Boldt S E, et al. The relationship among microsomal enzyme induction, liver weight, and histological change in cynomolgus monkey toxicology studies [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(4): 528-537.
- [15] Mohr. *Cardiovascular and Musculoskeletal Systems* [M]. New York: Springer-Verlag, 1991.
- [16] Greaves P. *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation, 2nd edition* [M]. Amsterdam: Elsevier Science, 2000.
- [17] Ennulat D, Walker D, Clemon F, et al. Effects of hepatic drug-metabolizing enzyme induction on clinical pathology parameters in animals and man [J]. *Toxicol Pathol*, 2010, 38(5): 810-828.
- [18] Hall A P, Elcombe C R, Foster J R, et al. Liver hypertrophy: a review of adaptive (adverse and non-adverse) changes--conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop [J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40(7): 971-994.