

## · 研究进展 ·

# 非临床毒性试验和致癌性试验动物死亡原因分析方法简介

霍桂桃, 吕建军<sup>#</sup>, 林志, 屈哲, 杨艳伟, 张颀, 张硕, 李波<sup>\*</sup> (1. 中国食品药品检定研究院, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176)

**摘要:** 本文简要介绍了美国国家毒理研究中心动物死亡原因分类、美国毒性病理学会颁布的判定毒性试验死亡原因的建议、英国亨廷顿生命科学公司病理部致癌性试验幼龄 SD 大鼠的死亡原因分析、美国华盛顿大学比较医学和比较病理学系啮齿类动物试验死亡原因分析推荐方法等内容, 目的是为我国药物非临床安全性评价领域毒性病理学家更好地分析动物死亡原因及解释毒性试验和致癌性试验结果提供参考。

**关键词:** 非临床; 毒性试验; 致癌性试验; 死亡原因; 组织病理学; 毒性病理学家

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)03-0412-05  
doi:10.16153/j.1002-7777.2018.03.020

## A Brief Introduction to the Analytical Methods of the Cause of Death in Nonclinical Toxicity Studies and Carcinogenicity Studies

Huo Guitao, Lv Jianjun<sup>#</sup>, Lin Zhi, Qu Zhe, Yang Yanwei, Zhang Di, Zhang Shuo, Li Bo<sup>\*</sup> (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing Key Laboratory for Safety Evaluation of Drugs, Beijing 100176, China)

**Abstract:** The paper briefly introduced the clarification of the causes of animal death at the National Center for Toxicological Research (NCTR) of USA, suggestions about the determining cause of death in toxicity studies by the American Society of Toxicologic Pathology (STP), analysis of the cause of death of young Sprague-Dawley (SD) rats in carcinogenicity studies by department of pathology, Huntingdon Life Sciences, UK, as well as a proposed analytical method of cause of death in rodent studies proposed by department of comparative medicine and comparative pathology program in University of Washington, USA. The purpose of the paper is to provide some references for toxicologic pathologist to better analyze causes of death and interpretate results of toxicity studies and carcinogenicity studies in the field of nonclinical safety evaluation of drugs in China.

**Keywords:** nonclinical; toxicity study; carcinogenicity study; cause of death; histopathology; toxicologic pathologist

基金项目: 十二五国家科技重大专项课题“符合中药特点的有毒中药安平关键技术”(编号 2015ZX09501004-002); 十二五国家科技重大专项课题“生物大分子药物特殊评价关键技术研究”(编号 2015ZX09501007-004)

作者简介: 霍桂桃; E-mail: huoguitao@nifdc.org.cn

并列第一作者: 吕建军, 主任药师, 从事临床前药物安全性评价毒性病理学诊断工作; Tel: (010) 67872233-8210; E-mail: lujianjun@nifdc.org.cn

通信作者: 李波, 研究员, 教授, 从事临床前药物安全性评价工作; Tel: (010) 67095790; E-mail: libo@nifdc.org.cn

毒性病理学是药物非临床安全性评价的重要组成部分, 毒性病理学的研究目的是从形态学的侧面, 研究实验动物给予药物后, 所引起的器官、组织、细胞及亚细胞形态结构的变化差异, 来阐明药物所引起形态变化差异的剂量-效应关系, 确定病变的靶器官、靶部位, 形态变化的性质、特点、程度及其变化过程和转归, 并分析其可能的致病机制, 为药物非临床安全性评价提供形态学依据和结论<sup>[1]</sup>。毒性病理学包括大体病理学、组织病理学和临床病理学, 组织病理学评价结果对毒性试验的结果和结论非常关键, 组织病理学评价一个重要内容是动物死亡原因分析, 死亡原因分析是致癌性试验进行Peto检验的前提<sup>[2]</sup>, 并且有助于毒性病理学家更好地理解病变的生物学意义, 更好地解释毒性试验或致癌性试验的结果<sup>[3]</sup>。目前, 国内外药物非临床安全性评价领域缺乏一致性动物死亡原因分析方法, 尤其是幼龄动物早期或偶发死亡原因较难判断, 严重影响了药物非临床安全性评价毒性试验或致癌性试验结果的解释。本文简要介绍了美国国家毒理研究中心(National Center for Toxicological Research, NCTR)死亡原因分类、美国毒性病理学会(Society of Toxicologic Pathology, STP)指导判定毒性试验死亡原因的建议、英国亨廷顿生命科学公司病理部致癌性试验幼龄SD大鼠的死亡原因分析及美国华盛顿大学比较医学和比较病理学系啮齿类动物试验死亡原因分析推荐方法等内容, 以期为我国药物非临床安全性评价领域毒性病理学家更好地分析动物死亡原因及解释毒性试验和致癌性试验结果提供参考。

## 1 美国国家毒理研究中心死亡原因分类

美国国家毒理研究中心(NCTR)自成立以来, 要求致癌性试验对所有死亡和濒死动物常规明确死亡原因; 而且, 确定某一特定肿瘤是致命性或偶发性肿瘤对于选择致癌性试验统计检验方法很重要<sup>[4-5]</sup>。但是, 致癌性试验跨学科讨论小组指出病理学家将肿瘤确定为致命性或偶发性有时很困难而且准确性有待提高<sup>[6]</sup>, 不同国家和机构的毒性病理学家对于毒性试验和致癌性试验动物的死亡原因分析方法存在较大差异。因此, NCTR的毒理病理学家探讨了死亡原因的分类方法, 以提高将肿瘤确定为致命性或偶发性的准确性。目前, NCTR死亡原因分类系统包括: (1)可能性(probable): 如果

毒性病理学家认为某一特定的肿瘤(或其他病理状态)是动物死亡最可能的原因, 则确定为可能性死亡原因, 每只动物只有1个可能性死亡原因; (2)促成性(contributory): 如果没有确定可能性死亡原因, 毒性病理学家认为某一肿瘤(或其他病变)促使动物死亡, 但不是唯一的原因, 则确定为促成性死亡原因, 每只动物可有1个以上的促成性死亡原因; (3)可疑性(equivocal): 毒性病理学家认为对动物的死亡可能有影响的病变确定为可疑性死亡原因; (4)未知性(unknown): 如果毒性病理学家不能将肿瘤或其他病变确定为可能性、促成性或可疑性死亡原因, 那么该动物的死亡原因为未知性<sup>[4]</sup>。

3位毒性病理学家在NCTR开展的美国国家毒理项目(National Toxicology Program, NTP)中, 对6个104周抗组胺药慢性喂养试验的死亡和濒死Fischer 344大鼠和B6C3F小鼠的死亡原因进行了分析, 整体而言, NCTR的毒性病理学家倾向于对每只动物明确1个死亡原因, 可能性死亡原因比例较高(79%~95%), 促成性死亡原因比例为2%~14%, 仅有1只动物为可疑性死亡原因(1%), 未知性死亡原因比例为1%~12%。这些数据表明可疑性死亡原因是多余的, 可以去掉, 同时还发现死亡原因的分类与动物的年龄、性别及受试物的剂量没有明显相关性<sup>[4]</sup>, 试验数据还表明不同实验室的病理学家可达成一致性的标准, 将与年龄相关的病变分类为致命性或偶然性, 用于肿瘤数据的统计检验, 毒性病理学家的肿瘤诊断经验和动物死亡原因分析非常关键<sup>[3]</sup>。

## 2 美国毒性病理学会指导判定毒性试验死亡原因的建议

2002年, 美国毒性病理学会(STP)在啮齿类动物致癌性试验统计分析的建议文章中指出, 确定每只动物的死亡原因对致癌性试验的解释非常关键。可引起动物死亡的病变包括肿瘤性病变、心肌病、慢性肾脏疾病、创伤和感染性病变等, 病理学家应尽可能明确死亡动物或濒死动物的死亡原因, 来明确组间死亡率的差异。一些动物的死亡原因不能确定, 应记录为不确定(undetermined), 定性分析每只动物的死亡原因用于评价整个试验的结果<sup>[7]</sup>。Ettlin等人<sup>[3]</sup>和Kodell等人<sup>[4]</sup>分别于1994年和1995年对毒性试验和致癌

性试验动物死亡原因分析方法进行了综述,指出病理学家可以明确大多数死亡或濒死动物的死亡原因。STP指导判定毒性试验死亡原因建议的目的是为确定毒性试验和致癌性试验动物死亡原因提供一般性指导,包括以下6条建议<sup>[8]</sup>:(1)病理学家负责确定毒理学试验包括致癌性试验死亡或濒死动物的死亡原因,是解释性诊断过程。死亡原因的意见分歧可通过同行评议解决;(2)病理学家应获得并使用每只动物所有的信息以确定死亡原因,包括血液学、血液生化、体重、临床观察、代谢等数据;(3)每只动物的死亡原因应基于导致该动物发病或死亡的主要疾病进行确定,死亡原因的定义使用世界卫生组织死亡率和发病率编码指南的定义<sup>[9]</sup>,即引发病态事件直接导致死亡疾病、意外事故或外伤。如果有多个可能性死亡原因,病理学家应该判定哪个最可能导致死亡。如果病理学家认为多个原因对发病率和死亡率有显著影响,可以判定为多个死亡原因。应将多个相关的病变合并为一个死亡原因,例如创伤、肾功能衰竭、细菌感染等。必须强调的是,死亡原因分析是基于某一动物疾病过程的具体信息,而不是基于该物种疾病过程的一般表现;(4)病理学家应确定总死亡率以及死亡率组间的差异是否与给予受试物相关,病理解释应包括实验动物的死亡率是否与受试物相关的说明;(5)如果死亡原因不能确定,应该表述为死亡原因不确定或现有的信息不能确定死亡原因;(6)死亡原因不确定比例高时应进行相关数据的审核,病理同行评议应包括死亡原因诊断的审核,并应考虑试验的局限性、动物种属等因素。

### 3 英国亨廷顿生命科学公司病理部致癌性试验幼龄SD大鼠的死亡原因分析

毒性试验或其他动物试验早期死亡是毒理学家和病理学家关心的重要问题之一。短期(13周、26周和52周)动物试验观察到动物死亡,特别是在给药组出现动物死亡,需要解释动物死亡是否与给药相关。由于现代动物饲养方法和严格的遗传和微生物控制,与给药无关的散在动物死亡率已经显著降低,但仍会发生并对动物试验的解释造成影响。有时难以确定毒性试验或动物试验早期或散在死亡的原因,为了帮助分析早期死亡动物的死亡原因,在组织病理学诊断时应对动物的背景性病变进行记

录, Son在2004年发表文章用于指导毒性病理学家评估短期试验幼龄大鼠的死亡原因,并提供了大鼠背景性肿瘤的发生率数据<sup>[10]</sup>。

Son收集了20个SD大鼠致癌性试验的对照组动物信息,共计1284只雄性大鼠和1264只雌性大鼠,在试验前50周共有46只(占3.58%)雄性大鼠和44只(占3.48%)雌性大鼠死亡,雌雄动物的生存率没有明显差异。大鼠的死亡原因包括肿瘤性病变、非肿瘤性病变及未知性。17只(占37%)雄性大鼠和35只(占79.5%)雌性大鼠的死亡原因为肿瘤性病变;12只(占26.1%)雄性大鼠和3只(占6.8%)雌性大鼠的死亡原因为非肿瘤性病变;17只(占37%)雄性大鼠和6只(占13.6%)雌性大鼠的死亡原因未知。肿瘤性病变最常见雌性动物垂体腺瘤,在30周龄左右出现,并随大鼠周龄增长发生率逐渐增加;第二位常见肿瘤性病变是雌性动物乳腺肿瘤,9只雌性大鼠出现纤维腺瘤,6只雌性大鼠出现腺癌,最早的纤维腺瘤出现在42周,最早的腺癌出现在30周,并随大鼠周龄增长发生率逐渐增加;雌雄动物恶性淋巴瘤也相对常见,最早的恶性淋巴瘤出现在11周雌性大鼠;在41周后2只雌性动物出现组织细胞肉瘤;雄性动物各1只出现粒细胞白血病和单核细胞白血病;雌雄动物偶见脑肿瘤,例如2只雄性动物和1只雌性动物出现少突胶质细胞瘤,雌雄动物各1只出现星形细胞瘤;雄性动物各1只还出现其他类型肿瘤,包括皮肤纤维瘤,纤维肉瘤和未分化肉瘤,舌纤维肉瘤,前列腺腺癌和外耳道腺鳞状细胞癌。非肿瘤性病变包括2只雄性动物和1只雌性动物出现慢性进行性肾病;1只雄性动物出现肾盂积水;2只雄性动物在11到30周出现泌尿道扩张;雄性动物各1只还出现皮肤炎症和肝坏死;2只雄性动物出现外伤或骨折;1只雌性动物出现麻醉意外;3只雌性动物和1只雄性动物由于足部炎症而实施安乐死。足部炎症被认为是饲养相关的炎症病变,原因是动物体重不断增加并使用了金属丝底的笼具<sup>[11]</sup>。相对较大比例的动物(雄性占37%、雌性占13.6%)死亡原因未知。

致癌性试验有几种不同类型的早期死亡,如意外死亡、采血过程中死亡、出于人道原因安乐死,濒死状态安乐死及发现动物死亡。应尽可能实施出于人道原因或濒死状态动物的安乐死,主要是为了避免动物不必要的痛苦,尽量避免或减少

组织自溶对组织病理学检查的影响。即使每天观察动物1次甚至2次,并且在发现动物死亡后立即进行剖检,约10%~15%死亡动物的组织自溶严重,以致无法进行组织病理学检查,因此,致癌性试验往往很难发现所有死亡动物的确切死亡原因<sup>[12]</sup>,毒性病理学家通过分析临床数据、大体剖检和组织病理学结果,尽可能地明确死亡原因<sup>[10]</sup>。2年致癌性试验死亡原因主要是与年龄相关的非肿瘤和肿瘤性病变<sup>[3]</sup>,代谢性疾病与动物周龄的增长密切相关,因此,在幼鼠不常见;SD大鼠慢性进行性肾病和多动脉炎是常见的年龄相关病变,雄性SD大鼠多见。在Son报道致癌性试验的死亡幼鼠偶见慢性进行性肾病,但未见多动脉炎<sup>[10]</sup>,还发现未能确定死因动物的相对数量比2年致癌性试验多,雄性动物比例高于雌性动物<sup>[11,13]</sup>。

2年SD大鼠致癌性试验,主要的肿瘤性死亡原因是雄性动物垂体和皮肤肿瘤,雌性动物是垂体和乳腺肿瘤<sup>[3,13]</sup>。在Son报道致癌性试验的雌性幼鼠肿瘤发生率与上述文献报道一致,雄性幼鼠试验前50周没有观察到垂体肿瘤,雌性幼鼠肿瘤性死亡原因高于雄性幼鼠,恶性淋巴瘤幼鼠相对常见,罕见肿瘤例如舌纤维肉瘤和外耳道腺鳞状细胞癌有助于毒性病理学家将来诊断致癌性试验幼龄动物类似肿瘤,在大多数没有肿瘤发生的死亡动物,死亡原因未知<sup>[10]</sup>。

#### 4 美国华盛顿大学比较医学和比较病理学系啮齿类动物试验死亡原因分析的推荐方法

Snyder等人于2016年提出了啮齿类动物试验死亡原因分析的推荐方法,包括分析一个主要死亡原因及多个促成原因<sup>[4,14-15]</sup>,主要死亡原因是引起死亡最显著的病变,促成原因(也称为合并症)定义为病变本身不会导致立即死亡,但有助于动物的发病<sup>[4]</sup>,促成原因被认为在机制上与死亡原因相关。在1只小鼠整个生命周期动物试验中,22%的小鼠有一个主要死亡原因,70%的小鼠有2~6个促成性原因<sup>[15]</sup>,少部分动物不能明确其死亡原因<sup>[16]</sup>。

为了尽可能将临床观察和病理学检查相关联,应当监测动物整个生命周期的临床状态,包括兽医或动物饲养人员每天进行笼旁观察并记录动物的临床体征,定期进行血液和尿液的常规检查和血液生化分析、超声检查、心电图检查、X线检查、血压测定、肺功能测定以及排泄物细菌和病毒学检

查,并将结果提供给病理学家。非致死性病变,包括皮炎、轻度脱肛、眼部异常或皮下肿瘤导致的动物安乐死,如果动物反应活跃、机体状况良好应不包括在死亡原因分析中;如果动物伴中度到重度系统性疾病表现时,这些动物应包括在死亡原因分析中<sup>[15-16]</sup>。

死亡原因分析需要及时剖检、系统地收集组织器官和规范性组织取材<sup>[17]</sup>,组织病理学诊断是死亡原因分析的关键<sup>[18-20]</sup>,建议对所有大体病变及至少25种下列器官或组织进行组织病理学检查,包括头骨的软组织(肌肉)、骨和骨髓、皮肤、眼睛和相关附件、牙齿、脑、耳和相关的附件、唾液腺、肺脏、心脏、胸腺、淋巴结、肝脏、胆囊(小鼠)、肾脏、胰腺、肾上腺、脾脏、胃、小肠、大肠、脂肪组织、生殖道、乳腺(雌性)或附属性腺(雄性)、膀胱。可根据试验具体情况增加或减少检查组织,还可将显微镜下病变进行程度分级<sup>[21]</sup>,必要时可进行电子显微镜检查以帮助判断死亡原因<sup>[15-16]</sup>。

毒性病理学家应掌握常用实验动物疾病的临床表现、病理生理学及病理形态学相关知识,并对上述临床数据、大体剖检病变结果、组织病理学检查结果、临床病理检查结果进行综合分析,以确定死亡动物的主要死亡原因及促成性原因。如果现有的资料不能确定动物的死亡原因,应记录为死亡原因不确定。毒性病理学家还应确定总死亡率和组间死亡率的差别是否与受试物相关,进一步分析与受试物相关病变的生物学意义,对毒性试验或致癌性试验的结果进行解释<sup>[3,14]</sup>。

#### 5 总结及展望

毒性病理学在药物非临床安全评价中占有重要的地位,因为急性毒性试验、长期毒性试验和致癌性试验都离不开毒性病理学检查和诊断,而且试验的周期越长,毒性病理学检查的结果越重要。毒性病理学回答药物造成病理性损伤部位、程度、性质和预后等基本问题。因此,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,病理学评估结果对毒性研究结论至关重要。毒性病理学家负责确定在预定计划剖检之前死亡或濒死动物的死亡原因,并应尽可能明确一个主要死亡原因及促成性原因,但不是所有的动物都能明确死亡原因,如果现有的信息不能确定

死亡原因,应记录为死亡原因不确定。确定死亡原因需要毒性病理学家熟练掌握常用实验动物的系统病理学,常用实验动物疾病的临床表现、病理生理学及病理形态学相关知识以及专业判断。毒性病理学家应获得并综合分析每个死亡动物尽可能多的数据以帮助确定其死亡原因,包括临床观察、大体剖检病变结果、临床病理学以及组织病理学检查结果等。本文简要介绍了美国NCTR死亡原因分类、STP指导判定毒性试验死亡原因的建议、致癌性试验幼龄SD大鼠的死亡原因分析、啮齿类动物试验死亡原因分析的推荐方法等内容,希望能够为我国药物非临床安全性评价领域毒性病理学家更好地分析动物死亡原因及解释毒性试验和致癌性试验结果提供参考。

#### 参考文献 :

- [1] 任进. 毒性病理学基本原则和方法的探讨[J]. 毒理学杂志, 2007, 21 (4) : 280-281.
- [2] Peto Analysis Working Group of STP. Draft Recommendations on Classification of Rodent Neoplasms for Peto Analysis [J]. Toxicol Pathol, 2001, 29 (2) : 265-268.
- [3] Ettlin RA, Stimimann P, Prentice DE. Causes of Death in Rodent Toxicity and Carcinogenicity Studies [J]. Toxicol Pathol, 1994, 22 (2) : 165-178.
- [4] Kodell RL, Blackwell BN, Bucci TJ, et al. Cause-of-death Assignment at the National Center for Oxecological Research [J]. Toxicol Pathol, 1995, 23 (3) : 241-247.
- [5] Montesano R, Bertsch h, Tomatis L. Long-term and Short-term Screening Assays for Carcinogens [M]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1980: 311-426.
- [6] Grice HC, Ciminera JL. Carcinogenicity: the Design, Analysis, and Interpretation of Long-term Animal Studies[M]. New York: Springer-Verlag, 1988: 107-123.
- [7] The Society of Toxicologic Pathology's Recommendations on Statistical Analysis of Rodent Carcinogenicity Studies [J]. Toxicol Pathol, 2002, 30 (3) : 415-418.
- [8] Long G. Recommendations to Guide Determining Cause of Death in Toxicity Studies [J]. Toxicol Pathol, 2004, 32 (2) : 269-270.
- [9] WHO. Rules and Guidelines for Mortality and Morbidity Coding, in International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD-10[M]. Geneva: World Health Organization, 1993: 23-36.
- [10] Son WC. Factors Contributory to Death of Young Sprague-Dawley Rat in Carcinogenicity Studies [J]. Toxicol Lett, 2004, 153 (2) : 213-219.
- [11] Glaister JR. Principles of Toxicologic Pathology [M]. Philadelphia: Taylor & Francis, 1986: 159-182.
- [12] Mohr U, Capen C, Dungworth D. ILSI Monograph on the Pathology of Aging Rats[M]. Washington, DC: ILSI Press, 1994: 629-638.
- [13] Matsuzawa T, Inoue H. Biological Reference Data on CD (SD) IGS Rats [M]. Japan: Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd., 1999: 252-254, 229-235.
- [14] Snyder JM, Ward JM, Treuting PM. Cause-of-death Analysis in Rodent Aging Studies [J]. Vet Pathol, 2016, 53 (2) : 233-243.
- [15] Treuting PM, Linford NJ, Knoblaugh SE, et al. Reduction of Age-associated Pathology in Old Mice by Overexpression of Catalase in Mitochondria [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2008, 63 (8) : 813-822.
- [16] Mansikh VN. The Problem of Determination of Cause of Laboratory Animal's Death: a Critical Review of Definitions of "Fata" and "Incidental" Lesions [J]. Biochemistry (Mosc), 2014, 79 (10) : 1075-1080.
- [17] Ladiges W, Ikeno Y, Liggitt D, et al. Pathology is a Critical Aspect of Preclinical Aging Studies [J]. Pathobiol Aging Age Relat Dis, 2013, 3: doi: 10.3402/pba.v3i0.22451.
- [18] Adissu HA, Estabel J, Sunter D, et al. Histopathology Reveals Correlative and Unique Phenotypes in a High-throughput Mouse Phenotyping Screen [J]. Dis Model Mech, 2014, 7 (5) : 515-524.
- [19] Scudamore CL. Integrating Pathology Into Human Disease Modelling: How to Eat the Elephant [J]. Dis Model Mech, 2014, 7 (5) : 495-497.
- [20] Szymanska H, Lechowska-Piskorska J, Krysiak E, et al. Neoplastic and Nonneoplastic Lesions in Aging Mice of Unique and Common Inbred Strains Contribution to Modeling of Human Neoplastic Diseases [J]. Vet Pathol, 2014, 51 (3) : 663-679.
- [21] Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research [J]. Vet Pathol, 2013, 50 (6) : 1007-1015.

(收稿日期 2016年12月23日 编辑 范玉明)