



化学物(药物)毒性测试替代体系的建立及应用

施 畅, 马华智, 王全军, 吴纯启, 原 野, 石富江, 荆淑芳, 王建京, 廖明阳

(军事医学科学院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 北京 100850)

【摘要】 当前对化学物进行毒性评价的整体动物试验由于试验周期长、成本高, 存在种属差异和剂量差异, 导致其实验结果在预测人体毒性风险时受到一定的限制。本研究针对化学物安全性评价及风险评估所依赖的毒作用终点(遗传毒性、致癌性、生殖毒性、急性毒性、一般毒性), 按照动物试验替代、减少、优化的“3R”原则, 建立相应的毒性测试替代筛选体系。该体系涵盖毒性评价的绝大多数终点, 并结合分子生物学技术对毒性试验进行整合, 优化了多种动物试验操作方法, 以期缩短实验周期、降低实验成本、提高动物福利。同时该体系是基于毒作用机制进行的毒性评价, 因此试验结果具有较高的人体相关性。

【关键词】 毒性测试; 替代策略; 减少性替代; 替代性研究; 优化性替代

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 05-0006-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.05.003

Establishment and application of toxicity testing alternative system for chemicals (new drugs)

SHI Chang, MA Hua-zhi, WANG Quan-jun, WU Chun-qi, YUAN Ye,

SHI Fu-jiang, JING Shu-fang, WANG Jian-jing, LIAO Ming-yang

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

【Abstract】 There are some shortcomings of animal experiments applied in chemical toxicity testing, such as long period, large cost, species differences and dose differences, which limit the use of animal experiments' results in predicting human toxicity. Accordingly, we established a toxicity testing alternative screening system in line with the toxicity endpoints which required in chemical safety evaluation and risk assessment (genotoxicity, carcinogenicity, reproductive toxicity, acute toxicity and general toxicity) based on “3R” principles (replacement, reduction, refinement) for animal experiments. This system covers most of the endpoints of toxicity assessment, and molecular biology technology was also applied to integrate the toxicity test, as well as some operation was optimized in order to shorten the experimental period, reduce experimental costs, improve animal welfare. Furthermore, the results from the screening system have higher clinical relevance because it is based on the toxicity mechanisms.

【Key words】 Toxicity testing; Alternative strategy; Replacement; Reduction; Refinement

1 研究背景

1.1 化学物毒性测试面临的挑战

随着科学技术、经济和社会的快速发展, 新化

学物质不断增多, 人们在日常工作和生活中通过各种途径接触工农业产品、食品、日用和医用化学品及空气中的化学物质越来越多, 其中大部分化学物缺乏系统的毒理学数据, 难以正确评价其安全性, 对人类和环境构成了潜在的危害。化学物的增多

【基金项目】 北京市科委科技计划项目 (H030230150130); 国家科技重大专项课题 (2008ZX09305-003, 2012ZX09301-003-008, 2013ZX09301303)。

【通讯作者】 施畅 (1972-) 女, 副研究员, 研究方向: 药物毒理及临床前安全性评价。E-mail: shichang1231@foxmail.com

也导致时有潜在危害的存在及中毒事故的发生,因此急需对各种已知和未知的化学物进行毒性测试,以适应管理部门处理灾情、制定卫生标准的需要,并保障产品安全和环境安全。

传统的毒性测试主要依赖于整体动物试验,由于以下几方面原因,动物试验难以满足当前化学物毒性评价的巨大需求^[1,2]。(1)实验周期长、成本高。当前由于生产、生活的需要,新化学物质不断被合成,人们接触各类化合物的途径和接触量也随之增多,可想而知对所有化合物进行毒性评价将耗费大量的时间、人力和财力。(2)动物试验结果在预测人体毒性风险时存在一定的限制,主要有两方面原因:一是实验动物与人体存在种属差异,动物实验结果在用于预测人体毒性时需要进行种属外推,且实验动物遗传背景、饲养环境和接触化学物的途径均相同,而现实生活中接触化学物的人群则在遗传背景、接触途径、个体生理环境等方面千差万别;二是长期以来整体动物试验所采用的剂量远高于人体实际暴露量,因此动物实验结果还存在剂量外推的问题。(3)整体动物试验大多提供的是基于器官或细胞水平的毒性表现、毒作用特征、可能的毒作用靶器官以及毒性是否可逆,很少能够提供确切的毒性机制和发生在亚细胞水平的有害作用的原发病因,难以为监管部门的风险评价、制定管理措施及处理灾情等提供有用的信息。

1.2 “3R”原则和毒性测试替代策略

“3R”原则的核心内容为减少(reduction)、替代(replacement)和优化(refinement),其主要目的是在保证科学性的前提下,通过采用体外试验、改进动物实验的操作、改善动物生存的环境等措施减少实验动物的使用,减轻因实验操作导致动物的不适或痛苦,提高动物福利^[3]。减少性替代是指使用较少的动物获得相同的信息或者使用同等数量的动物获得更多的信息,或缩短动物实验周期。替代性研究主要是指采用无脊椎动物或人道获取的脊椎动物细胞、组织、器官进行体外研究。优化性替代主要是指在动物饲养及试验过程中,改善饲养环境,引入新技术新方法,优化实验操作,以减轻动物的不适或痛苦。

目前欧盟、美国和日本等多个国家和地区已普遍制定了动物福利的法律法规,欧洲还成立了替代方法验证中心,通过多渠道推广贯彻“3R”原则。在我国“3R”原则的贯彻也取得了一些进展,如 1997 年科技部在《关于“九五”期间实验动物发展的若干

意见》中提出建立与国际接轨的动物福利保障制度,到 2006 年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》指出动物实验应遵循“3R”原则。故此采用转基因动物、体外培养的细胞、组织器官或低等生物等试验系统替代传统的动物实验已成为化学物毒性测试的重要发展方向。同时计算机模拟程序和细胞分子生物学新技术新方法的引入,使得化学物毒性评价已发展为基于毒作用机制研究的毒性测试新模式。

毒性测试替代策略即针对化学物的毒性或特定毒性终点(遗传毒性、致癌性、生殖毒性、急性毒性、一般毒性等),采用与传统动物试验毒性评价方式不同的体外、短期的测试方案对化学物进行毒性评价,在缩短实验周期、降低实验成本、提高动物福利的同时为危害识别和剂量-反应评估提供信息,由于该体系是基于毒作用机制进行的毒性评价,因此试验结果具有较高的人体相关性。

2 研究目的及成果

本项目针对化学物毒性测试及风险评估所依赖的毒作用终点(遗传毒性、致癌性、生殖毒性、急性毒性和一般毒性),建立了相应的短期毒性测试替代方法,结合分子生物学技术对毒性试验进行整合,并优化了多种动物试验操作方法,以期缩短实验周期、降低实验成本、提高动物福利,取得良好的社会效益。

2.1 遗传毒性测试替代方法

建立 Ames 波动试验、小鼠淋巴瘤试验(MLA)、质粒 DNA 断裂试验、体外微核试验。

2.2 重复给药毒性试验伴随微核试验

建立流式细胞术检测外周血微核方法,将体内微核试验整合于重复给药毒性试验。

2.3 致癌性测试替代方法

建立转基因小鼠短期致癌性试验。

2.4 生殖毒性测试替代方法

建立大鼠胚胎中脑细胞微团培养试验并优化大鼠胎仔骨骼染色法。

2.5 急性毒性测试替代方法

建立急性毒性上下法、固定剂量法和体外细胞毒性试验方法。

2.6 一般毒性测试替代方法

优化了多种动物试验操作方法,发明了一种拟生境型实验猴笼,引进啮齿类和实验猴的环境装饰,改进啮齿类、Beagle 犬和实验猴的给药和保定器械。

3 创新点

本项目建立的毒性测试替代筛选体系有如下创新点:1、全面系统:涵盖毒性评价的绝大多数终点,实验周期短,快速、高通量,所用样品量少,可为化学物危险管理提供必须的非临床研究资料。2、应用范围广:该系统既可应用于大量的药物前体或候选药物的早期毒性优化筛选,又可应用于法规毒理学试验,并减少实验动物的使用,缩短评价周期,大大降低人力、物力和财力。3、技术领先:以毒性作用机制为基础,使毒性试验结果具有较高的人体相关性;4、获得实用新型专利:一种拟生境型实验猴笼和一种胎仔骨骼批量染色箱。

4 讨论

本项目建立的毒性测试替代筛选体系涵盖了毒性评价的绝大多数终点,在实验结果的一致性方面与当前传统的毒性试验相当,同时在减少动物使用、提高动物福利、缩短试验周期、减少人力物力方面各有优势。

在遗传毒性方面,Ames 波动试验、小鼠淋巴瘤试验、体外微核试验与传统的 Ames 试验、哺乳动物染色体畸变试验、哺乳动物骨髓细胞微核试验相比,均有较高的一致性^[4-6],且 MLA 能够同时检出诱变剂和裂变剂,较动物体内染色体畸变或微核试验检测的突变谱更广,体外微核试验还避免了动物的使用。外周血微核流式细胞术检测不仅可将微核试验与一般毒性试验进行整合,减少动物的使用,同时因无需人工阅片,大大减少了人力,提高效率,避免了人工阅片的主观性。

致癌性试验方面,哺乳动物长期致癌性试验要求动物数多,消耗的化合物量大,耗时长,费用高,肿瘤自发率高,种类多,对病理人员的要求较高,结果的假阳性率和假阴性率高,敏感性特异性较低,肿瘤的发生与人类流行病学无一致性,因此外推至人较为困难。转基因动物的短期致癌试验周期短,使用动物数量少,化学物用量少,敏感性特异性均高于哺乳动物长期致癌性试验^[7]。

生殖毒性方面,I、II、III段体内生殖毒性试验贯穿整个生殖周期,动物和样品的消耗量大,试验操作较复杂,对实验人员要求较高,显然难以用于大量化学致畸物的快速筛选。大鼠胚胎中脑细胞微团培养试验中,大鼠孕 13 d 的胚胎中脑神经细胞处于分化前期,对化学毒物的作用非常敏感,而且

试验周期短,重现性好,在致畸物的快速筛选方面有明显优势^[8]。

急性毒性方面,传统的以测定 LD₅₀ 值为目的的急性毒性试验需耗费大量动物,随着急性毒性试验在化学物毒性评价中作用和地位的改变,急性毒性的检测终点也发生了变化,并不一定都要得出 LD₅₀ 值。针对化学物的特点通过上下法或固定剂量法进行急性毒性,即能得到所需的相关信息,极大地减少了动物的使用。

此外,本项目发明的拟生境型实验猴笼,引进的啮齿类和实验猴的环境装饰,改进的啮齿类动物、Beagle 犬和实验猴的给药和保定器械均有助于提高动物福利、减轻动物痛苦。

本项目以委托课题的形式广泛应用于国内多家单位,周期短、成本低,极大地支持了应用单位新药的研发,取得了较好的社会和经济效益,得到了应用单位的高度评价。

参考文献:

- [1] Krewski D, Acosta D, Andersen M, *et al.* Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy [J]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2010, 13(2-4): 51-138.
- [2] 郭家彬,彭双清. 动物实验替代方法与 21 世纪毒性测试发展策略[J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(10): 157-161.
- [3] Bouvier d'Yvoire M, Bremer S, Casati S, *et al.* ECVAM and new technologies for toxicity testing [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 745: 154-180.
- [4] Kamber M, Flückiger-Isler S, Engelhardt G, *et al.* Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity [J]. *Mutagenesis*, 2009, 24(4): 359-366.
- [5] Liviak D, Creus A, Marcos R. Mutagenic analysis of six disinfection by-products in the Tk gene of mouse lymphoma cells [J]. *J Hazard Mater*, 2011, 190(1-3): 1045-1052.
- [6] Doherty AT. The in vitro micronucleus assay [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 817(2): 121-141.
- [7] Jacobs AC, Brown PC. Regulatory Forum Opinion Piece *: Transgenic/ Alternative Carcinogenicity Assays: A Retrospective Review of Studies Submitted to CDER/FDA1997-2014 [J]. *Toxicol Pathol*, 2015, 43(5): 605-610.
- [8] Knudsen TB, Kavlock RJ, Daston GP, *et al.* Developmental toxicity testing for safety assessment: new approaches and technologies [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2011, 92(5): 413-420.

[收稿日期] 2016-11-18