

· 综 述 ·

建立和验证药物安全性评价中实验病理学定量检测指标 参考值范围的影响因素和方法

王晓秋¹, 江佳佳²(1. 苏州西山中科药物研究开发有限公司, 江苏 苏州 215104; 2. 江苏大学澳洋肿瘤研究院,
江苏 苏州 215600)

摘要: 目前国内外药物安全性评价领域尚未见到明确的有关实验动物病理学定量检测指标参考值范围和验证指导原则。本文探索性地提出了建立和验证药物安全性评价中实验病理学定量检测指标参考值范围的影响因素和方法, 认为建立参考值范围所需评估条件应包括前瞻性或回顾性研究方式的选择、动物参考群体分组、动物参考个体筛选和数量及样品采集和检测要求等; 当动物参考群体来源、样本采集条件和检测系统发生改变时参考值范围则需进行验证, 并应根据参考值范围从统计学、生物学和毒理学意义等方面深入解析检测数据的应用。本文将有助于正确和完整地评价实验动物的健康状态和药物引起的毒性。

关键词: 药物安全性评价; 实验动物; 定量检测指标; 参考值范围

中图分类号: R965.3

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2022)09-0716-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.09.010

临床病理学检测是药物安全性评价中非常灵敏的重要研究手段, 用于实验动物健康检查和筛选、疾病诊断和监测, 评估药物对实验动物造成的毒性反应类型和程度以及毒性反应是否具有剂量关系、是否可逆等。药物安全性评价中解读给药组动物临床病理学数据改变时, 除应比较同期对照组动物数据和给药组动物给药前的基础数据之外, 还应结合实验动物临床病理学检测指标的参考值范围进行综合分析, 这样才能做出正确判断^[1]。临床病理学检测国际协调联合科学委员会推荐了药物安全性评价中血液学、临床化学和尿液分析等临床病理学检测指标^[2], 由于实验动物定量检测指标值与正常人相比差异较大, 如北平顶猴外周血白细胞参考值范围为 $(6.0\sim 31.4)\times 10^9\text{ L}^{-1}$ ^[3], 人外周血白细胞参考值范围则为 $(3.5\sim 9.5)\times 10^9\text{ L}^{-1}$ ^[4]。因此, 科学合理地建立和验证实验动物临床病理学检测指标的参考值范围具有极其重要的意义, 但目前国内外在此方面尚未颁布明确的技术指南。虽然国内外已有一些文献报道了不同动物临床部分病理学定量检测指标的参考值范围^[5-11], 但建立方法差异较大, 科学性和规范性尚存疑问, 且参考值范围的

验证也基本未有提及。因此, 本文在参考国内外临床诊断和兽医学等技术领域的相关技术指导原则及文献^[12-16]的基础之上, 结合药物安全性评价工作的特殊性, 探索性地提出药物安全性评价中实验动物临床病理学定量检测指标参考值范围的建立和验证应考虑的影响因素和方法, 为药物安全性评价研究提供参考和借鉴。

1 参考值范围的建立

临床病理学定量检测指标包括血液学、临床生物化学、凝血和免疫学等指标。建立这些定量检测指标参考值范围可以通过前瞻性研究或回顾性研究 2 种方式, 对于药物安全性评价研究机构而言, 回顾性研究显然更为可行。无论采取哪种方式, 在获得足够的健康动物临床病理学定量检测指标数据时, 均应尽快完成这些指标参考值范围的首次建立。

1.1 动物参考群体分组

实验动物的年龄、性别、营养状态、生殖状况、饲养状况、地理位置和活动等因素均有可能影响动物参考群体各项临床病理学定量检测指标的数值^[17-18], 故在理想情况下, 应为不同类别动物建立单独的参考值范围。如不可行, 参考群体应根据上述因素进行划分, 以获得能代表健康动物群体的临床病理学定量检测指标数据的生物学分布。实际

作者简介: 王晓秋, 硕士研究生, 主管检验师, 主要从事药物安全性评价临床病理学研究, E-mail: wzl070502@163.com
通讯作者: 江佳佳, E-mail: jiangjjia_2001@163.com

工作中,至少应按动物性别和年龄分组来分别建立参考值范围^[10-11]。

1.2 动物参考个体筛选标准

应建立详细的动物参考个体筛选标准,如动物体重、活动性、饮食、排泄、传染病检查和肠道寄生虫检查等,以确保排除不健康的动物^[19-20]。

对于大动物而言,可选择未进入研究专题的经适应期和检疫期的健康贮备动物,或研究专题中对照组中的健康动物和(或)给药组中给药前的健康动物。对于小动物而言,可选择未进入研究专题的经适应期和检疫期的健康贮备动物,或选择研究专题中对照组中的健康动物。

1.3 动物参考个体数量

参考值是通过参考个体某一特定量进行观察或测量而得到的检测结果。参考值范围通常包括参考上限和参考下限,两参考限之间(含 2 个参考限)的区间则为参考值范围,通常是中间 95% 的数据分布范围^[1,12]。代表每一动物参考群体的动物参考个体至少需 120 只,以保证能正确建立 90% 置信水平的临床病理学定量检测指标数据的参考值范围,如按 99% 置信水平来建立,则至少需要 198 只动物参考个体^[12-13]。例如,王茵等^[21]采用 260 只 8~10 周龄的 SD 大鼠,雌雄各 130 只,建立了多项血液生化指标的参考值范围,其中血清白蛋白和血糖的参考值范围雌雄动物之间差异无统计学意义($P>0.05$),故实际应用时可合并计算,此时这 2 项指标所建立的参考值范围来源于 260 只 SD 大鼠,可达到 99% 置信水平;而胆固醇、血清总蛋白、丙氨酸转氨酶和尿素氮的参考值范围雌雄动物之间差异有统计学意义($P<0.01$),因此在实际应用时宜按雌雄性别分别统计,此时每组动物参考个体数量为 130 只,则每组所建立的参考值范围可达到 90% 置信水平。

通常根据置信水平的要求来考虑所需动物参考个体数量即可,若纳入更多数量的动物参考个体并不会显著提高参考值范围的置信水平,且有可能增加样品采集和检测等各方面的成本。

1.4 样品采集的要求

用于建立参考值范围的动物样品的采集条件应尽可能一致,如动物禁食情况、动物保定条件、样品采集程序和样品处理程序等^[17-18],以消除样品采集环节对样品检测结果可能造成的影响。每一动物参考个体每一定量检测指标只需采集一份样品以获得单一代表性的检测数据,相同样品类型需求的定量检测指标可以共用一份样品。

1.5 样品检测的要求

用于样品检测的检测系统,广义上来说,包括检测人员、检测仪器、检测试剂和标准操作规程等要素,应为准确度和精密度等技术指标已验证合格的检测系统或检测方法,并定期参加官方机构或第三方权威机构组织的室内质评活动且成绩合格,且已为检测系统制定了科学合理的常规校准程序和室内质控程序,并严格按照试剂生产商的要求接收、储存和使用各类检测试剂。

样品应在采集后立即检测^[14-16],如因故不能立即检测,可按稳定性已验证的储存条件和储存周期进行暂存后再进行检测^[14]。检测时应严格按照已制定的相关标准操作规程进行,检测数据应在所伴随的室内质控数据符合接受标准的前提下,再经过审核无误后才能发放。

1.6 样品检测数据的处理

将每一定量检测指标的所有样品检测数据进行排序,并将最高值减去最低值以获得数据全距(range, R),将次高值加上 R/3,次低值减去 R/3 获得一个新的范围,如疑似离群值超过此范围,则应将其作为真实离群值进行剔除^[12]。若剔除离群值后样品检测数据不足 120 个,则需补足^[12]。若为前瞻性研究,则需新增动物参考群体数量继续检测直至获得足够符合要求的数据量。若为回顾性研究,则可直接调用同一动物参考群体中符合要求的数据以补足。

采用 SAS 和 SPSS 等专业统计分析软件评估每一定量检测指标剔除离群值后的所有样品检测数据是否符合正态分布(高斯分布)。对于符合正态分布的检测数据,使用参数统计方法按 $\bar{x}\pm 2SD$ 来估算参考值范围;对于不符合正态分布的检测数据,使用非参数统计方法按百分位数法来估算 $P_{2.5}\sim P_{97.5}$ 的参考值范围。

2 参考值范围的验证

2.1 参考值范围的验证条件

当一个药物安全性评价研究机构的临床病理学定量检测指标的参考值范围首次建立后,在动物参考群体的来源、样品采集条件以及检测系统未发生改变时,通常不需要定期验证参考值范围的适用性或定期更新参考值范围。

但如发生下列情况时,则在参考值范围首次建立后需进行验证:① 动物参考群体的来源、样品采集条件以及检测系统发生改变时,如动物供应商改

变、更换样本采集装置、检测仪器更新、检测试剂更换等；② 首次建立参考值范围时因故未能获得足够数量的检测数据；③ 考虑直接引用来自其他药物安全性评价研究机构公布的参考值范围。

2.2 参考值范围验证的实施

采集可以代表每一动物参考群体的 20 只动物参考个体的样品进行检测。按 1.6 处理方式, 检查每一定量检测指标全部 20 个样品检测数据中是否存在离群值, 如有则需剔除并用其它动物参考个体的样品检测数据进行补足。

如果 20 个检测数据中只有不超过 2 个数据不在原参考值范围之内, 则说明该参考值范围仍适用。

如果超过 2 个数据不在原参考值范围之内, 则应再取另外 20 只动物参考个体的样品进行检测, 同样进行离群值检查、剔除和检测数据补足, 如果新获得的 20 个检测数据中只有不超过 2 个数据不在原参考值范围之内, 则说明该参考值范围适用, 否则需要重新建立参考值范围。

3 参考值范围的应用和解析

在评估检疫期动物的健康状态、药物安全性评价研究中对照组动物的健康状态、给药组动物给药前的健康状态时, 可以直接依据临床病理学参考值范围来评估临床病理学检测数据是否异常以及异常的程度, 并结合动物一般检查、笼边观察、体重、摄食量和体温等情况对动物的健康状态进行综合判断。

在评估给药组动物给药后的临床病理学指标是否出现毒性改变以及毒性改变的程度时, 由于同一药物安全性评价研究中给药组动物和对照组动物来源、年龄、营养状态、饲养和处置方式相同, 故应先比较给药组动物与同期对照组动物的临床病理学检测数据均值之间的差异是否具有统计学意义^[1-2]。给药组动物与对照组动物的临床病理学检测数据均值之间的差异无统计学意义时, 可以初步判断给药组动物给药后临床病理学指标未出现毒性改变。给药组动物与对照组动物的临床病理学检测数据均值之间的差异有统计学意义时, 则继续检查给药组动物给药后临床病理学检测数据是否已超出参考值范围。

若给药组动物给药后的临床病理学检测数据未超过参考值范围, 则可初步判断给药组动物给药后临床病理学指标未出现毒性改变, 与同期对照组动物检测数据之间的差异虽具有统计学意义, 但并不具有生物学意义和毒理学意义。

不具有生物学意义和毒理学意义。若给药组动物给药后的临床病理学检测数据超过参考值范围, 则分析是否仅属于药效指标发生改变, 例如, 促红细胞生成素引起的红细胞数量上升、特立帕肽(teriparatide)引起的血钙升高等表明药效指标发生了改变。那么这些药效指标的改变仅具有统计学意义和生物学意义, 但并不具有毒理学意义。

若给药组动物给药后的临床病理学检测数据超过参考值范围, 且不属于药效指标, 则可初步判断这些指标的改变具有毒理学意义, 并结合给药组动物给药前检测数据和同期其他剂量组给药动物检测数据来综合评估临床病理学指标毒性改变的程度以及是否具有剂量依赖性。

另外, 由于药物安全性评价研究中各组动物数量较少, 尤其是大动物(如食蟹猴和 Beagle 犬), 因此无论给药组和对照组之间的差异是否具有统计学意义, 均应观察各组动物个体数据是否超过参考值范围。如超过, 则需结合该动物的临床观察指标和组织病理学检查结果等进行综合判断, 从而完整地评价药物毒性作用。

4 结语

目前, 已有研究报道了不同周龄幼年 SD 大鼠以及不同品系不同周龄小鼠的生化指标参考值范围^[10-11, 22]。此外, 北平顶猴、食蟹猴和 Beagle 犬等实验动物的血液学和血液生化指标的参考值范围也有报道^[3, 9, 23-24], 但凝血指标参考值范围的报道较少, 仅见 SD 大鼠的凝血酶原时间的研究报道^[25]。临床病理学定量检测指标参考值范围在药物安全性评价研究中对于正确解读临床病理学定量检测指标数据、正确评价实验动物的健康状态、实验动物疾病诊断和治疗以及正确评估药物对实验动物毒性等具有非常重要的意义。如何科学、规范地建立和验证临床病理学定量检测指标的参考值范围是一项亟待解决的问题, 希望在不远的将来能够出台相关技术指导原则, 从而为新药研发助力。

参考文献:

- [1] Whalan JE. *A Toxicologist's Guide to Clinical Pathology in Animals* [M/OL]. Cham: Springer, 2015: 2-7 [2021-05-20]. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-15853-2>.
- [2] Weingand K, Brown G, Hall R, et al. Harmonization of animal clinical pathology testing in toxicity and

- safety studies. The Joint Scientific Committee for International Harmonization of Clinical Pathology Testing[J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1996, 29(2): 198-201.
- [3] 庞伟, 吕龙宝, 王芸, 等. 北平顶猴(*Macaca leonina*)血液学和血液生化指标参考值的测定与分析[J]. 动物学研究 (*Zoological Research*), 2013, 34(2): 89-96.
- [4] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 临床检验操作规程[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 13.
- [5] Matsuzawa T, Nomura M, Unno T. Clinical pathology reference ranges of laboratory animals. Working Group II, Nonclinical Safety Evaluation Subcommittee of the Japan Pharmaceutical Manufacturers Association [J]. *J Vet Med Sci*, 1993, 55(3): 351-362.
- [6] He QL, Su GM, Liu KL, et al. Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method [J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0189837 (2017-12-20) [2021-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5738108/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0189837
- [7] Bourgès-Abella N, Geffré A, Concordet D, et al. Canine reference intervals for the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer [J]. *Vet Clin Pathol*, 2011, 40(3): 303-315.
- [8] 潘东升, 刘芳, 苗玉发, 等. Beagle犬和食蟹猴血清生化和血液学指标的测定[J]. 药物评价研究(*Drug Evaluation Research*), 2011, 34(1): 19-21.
- [9] 张六一, 张玲, 王振宇, 等. 食蟹猴血液学和生化学指标数据背景资料的建立[J]. 四川生理科学杂志(*Sichuan Journal of Physiological Sciences*), 2005, 27(1): 39-40.
- [10] 崇立明, 杨阳, 陈丽芬, 等. 幼龄SD大鼠重复给药毒性试验背景数据的建立[J]. 中国新药杂志 (*Chinese Journal of New Drugs*), 2021, 30(1): 17-24.
- [11] 牟文波, 李慧, 安会苹, 等. 幼年SD大鼠生化指标背景数据的建立和结果分析[J]. 中国药物警戒 (*Chinese Journal of Pharmacovigilance*), 2017, 14(11): 641-645.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 临床实验室检验项目参考区间的制定 (WS/T 402-2012) [EB/OL]. (2012-12-24) [2021-05-20]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/s9492/201212/84c035163f324785877dd138936f2fd1.shtml>.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. (EP28-A3c) [EB / OL]. (2010-10-19) [2021-05-20]. <https://clsi.org/standards/products/method-evaluation/documents/ep28/>.
- [14] 齐云, 蔡润兰, 刘彬, 等. 新药长毒试验动物血液生化测定规范化研究系列之五——SPF级SD大鼠血液生化参考值的建立[J]. 中国比较医学杂志(*Chinese Journal of Comparative Medicine*), 2006, 16(4): 193-196.
- [15] 齐云, 蔡润兰, 王敏, 等. 新药长毒试验动物血液生化测定规范化研究系列之六——SPF级Wistar大鼠血液生化参考值的建立[J]. 中国比较医学杂志(*Chinese Journal of Comparative Medicine*), 2006, 16(4): 197-200.
- [16] 齐云, 蔡润兰, 刘彬, 等. 新药长毒试验动物血液生化测定规范化研究系列之七——Beagle犬血液生化参考值的建立[J]. 中国比较医学杂志(*Chinese Journal of Comparative Medicine*), 2006, 16(4): 201-203, 207.
- [17] 代解杰, 唐东红, 鲁帅尧, 等. 人工饲养条件下恒河猴血液学、血液生化正常参考值测定及分析[J]. 中国实验动物学报(*Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*), 2000, 8(4): 224-230.
- [18] 杨锋, 王红星, 何永亮, 等. 实验Beagle犬血液学及血液生物化学参考值的探讨[J]. 中国比较医学杂志 (*Chinese Journal of Comparative Medicine*), 2004, 14(6): 355-358.
- [19] 邢凤英, 严国锋, 杨伟敏, 等. 3~4岁猕猴生理指标的测定[J]. 实验动物与比较医学(*Laboratory Animal and Comparative Medicine*), 2013, 33(4): 310-314.
- [20] 陈云, 池景锋, 何永恒, 等. Beagle犬不同生长时期的血液学指标[J]. 中国比较医学杂志(*Chinese Journal of Comparative Medicine*), 2004, 14(5): 304-306.
- [21] 王茵, 楼正清, 来伟旗, 等. SD大鼠血液生化指标正常参考值范围的探讨[J]. 卫生毒理学杂志 (*Journal of Health Toxicology*), 2000, 14(2): 112-113.
- [22] 胡建武, 卢胜明, 车路平, 等. 10种常见SPF级实验大、小鼠血液学及生化指标正常参考值的探讨[J]. 实验动物科学 (*Laboratory Animal Science*), 2007, 24(2): 5-10.
- [23] 王冬平, 洪宝庆, 李慕, 等. 比格犬生化指标及不同性别的比较[J]. 实验动物科学(*Laboratory Animal Science*), 2008, 25(5): 62-64.
- [24] 许丽, 苏欣, 潘琦, 等. 大鼠、犬和食蟹猴血液学和血清生化指标正常参考值的测定[J]. 实验动物与比较医学 (*Laboratory Animal and Comparative Medicine*), 2013, 33(4): 315-318.
- [25] 黄小琼, 刘盛来, 孙侠, 等. SPF级封闭群SD大鼠血清生化值及凝血酶原时间值的测定[J]. 中国比较医学杂志(*Chinese Journal of Comparative Medicine*), 2009, 19(10): 41-43.

Influencing factors and methods in establishment and verification of reference intervals of quantitative assays of experimental pathology in drug safety evaluation

WANG Xiao-qiu¹, JIANG Jia-jia²

(1. *Suzhou Xishan Zhongke Pharmaceutical Research and Development Co., Ltd., Suzhou 215104, China*; 2. *Aoyang Institute of Cancer, Jiangsu University, Suzhou 215600, China*)

Abstract: As far as drug safety evaluation is concerned, there are no specific guidelines for the establishment and verification of reference intervals for quantitative assays of experimental pathology of laboratory animals. This article attempts to present influencing factors and methods for the establishment and verification of reference intervals for laboratory animals. Assessment of the establishment of reference intervals involves selection of prospective or retrospective approaches, grouping of animal reference populations, screening of enough animal reference individuals, and sample collection and detection. The reference intervals should be verified in case of changes in the source of animal reference populations, sample collection conditions and detection systems. The test results should be analyzed in depth in terms of statistical, biological and toxicological significance based on the reference intervals. This review is expected to facilitate accurate and complete evaluation of the health status and drug-induced toxicity of laboratory animals.

Key words: drug safety evaluation; laboratory animal; quantitative assay; reference interval

Corresponding author: JIANG Jia-jia, E-mail: jiangjiajia_2001@163.com

(收稿日期: 2021-06-23 接受日期: 2021-11-19)

(本文编辑: 齐春会)