

药物安全性评价中豚鼠全身过敏试验方法的研究

翁谢川¹, 樊星², 王青秀², 施畅², 李磊宁², 欧阳兆和², 孔琦²,
王全军², 关勇彪², 丁日高²

(1. 军事医学科学院基础医学研究所神经生物学研究室, 北京 100850;
2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 国家北京药物安全评价中心, 北京 100850)

【摘要】 目的 在新药临床前安全性评价中对药物致敏性的研究日益受到重视。本实验基于我国新药评价指导原则, 分析探讨 SFDA 颁布的指导原则中豚鼠全身过敏实验方案中可能影响实验结果的问题和因素。方法 在 GLP 条件下, 以体重为 300 ~ 400 克的豚鼠为实验对象, 以牛血清白蛋白、生理盐水等受试物为对照, 研究不同致敏剂量、激发剂量、激发时间、激发途径和激发次数等条件下, 豚鼠全身过敏的发生情况。结果 在一定剂量范围内, 豚鼠全身过敏反应的发生率与致敏剂量、激发剂量和激发途径无关, 但症状发生的严重程度与致敏剂量、激发剂量和激发途径有关。结论 新药过敏性评价研究应参照指导原则, 注意试验的剂量设计和给药途径。

【关键词】 豚鼠; 致敏; 激发; 全身过敏试验

【中图分类号】 Q95-331 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)05-0051-05

doi: 10.3969.j.issn.1671.7856.2012.05.011

Research on the Methods of Active Systemic Anaphylaxis on Guinea Pig in Drug Safety Evaluation

WENG Xie-chuan¹, FAN Xing², WANG Qing-xiu², SHI Chang², LI Lei-ning², OUYANG Zhao-he², KONG Qi²,
WANG Quan-jun², GUAN Yong-biao², DING Ri-gao²

(1. Beijing Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, National Beijing Center for Drug Safety Evaluation and Research, Beijing 100850, China)

【Abstract】 **Objective** To analyze some potential factors which might affect the active systemic anaphylaxis (ASA) test on guinea pig. **Methods** In GLP conditions, guinea pigs from 300 to 400 grams were used as experimental subjects. By using the materials including bovine serum albumin and saline which are recommended for the control subjects by the guidelines, some experimental design factors such as sensitizing dose, challenge dose, challenge interval and challenge injection route, and the frequency of challenge were studied during the systemic anaphylaxis in guinea pigs. **Results** In a certain dose range, the incidence of allergic reactions in guinea pigs was not related with systemic sensitizing dose, challenge dose and challenge injection approach, but the severity of anaphylaxis symptoms has an obvious relationship with sensitizing dose, challenge dose and challenge injection route. **Conclusion** Study on the drug-induced anaphylaxis should refer to the guidelines and pay more attention to experimental design dose and the route of administration.

【Key words】 Guinea pig (*Cavia porcellus*); Sensitization; Challenge; ASA (active systemic anaphylaxis)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30500620); 重大新药创新专题 (2008Zx09305-003); 北京市自然科学基金资助项目 (7092079)。

[作者简介] 翁谢川 (1976 -), 男, 助理研究员, 研究方向: 神经药理学与新药的安全性评价。E-mail: wengxc2002@yahoo.com.cn。

[通讯作者] 丁日高 (1965 -), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 新药的安全性评价。

药物可能作为过敏原引发机体产生过敏反应。药源性过敏反应对人体危害性大,且发病率高。常见的过敏症状包括皮疹、恶心、呕吐、支气管哮喘、变应性鼻炎,严重时可发生过敏性休克、心功能衰竭等,危及生命^[1]。因此,评价药物可能引起的过敏反应成为新药临床前安全性评价的一个重要内容。根据国家食品药品监督管理局(State Food and Drug Administration, SFDA)于 2005 年颁发的《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》以及《中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光过敏反应)研究的技术指导原则》相关规定,局部给药发挥全身作用的药物(如注射剂和透皮吸收剂等)都需考察 I 型过敏反应^[2,3]。

在 SFDA 颁布的指导原则中考察 I 型过敏反应最常见的方法为豚鼠(Guinea pig)全身主动过敏试验(active systemic anaphylaxis, ASA)^[2,3]。目前普遍认为,该方法具有操作相对简单、敏感性好、结果稳定和可重复性高等特点^[4-7]。但是,在药物临床前安全性评价工作中,特别是在操作和制定该过敏试验具体方案时,一些可变的实验设计因素,如不同的致敏剂量、激发剂量、激发时间、激发途径和激发次数等,明显影响着豚鼠全身过敏的发生,从而影响到临床前药物过敏性的评价结果。因此,为了解决这些重要的可变性的实验设计因素对研究结果存在的影响,我们对其进行了研究。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级豚鼠, Dunkin Hartley 品系, 体重为 300 ~ 400 g, 由军事医学科学院动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(京) 2006-0009; 动物使用许可证号: SYXK(军) 2007-0008。饲养于国家北京药物安全评价研究中心屏障设施内。对饲养的环境温度、湿度和噪音进行严格控制, 温度控制在 20 °C ± 2 °C, 相对湿度(60 ± 10)% 左右, 光照周期 12 h: 12 h, 光照时间为 8:00 AM ~ 8:00 PM, 噪音在 60 dB 以下。另外, 保持饲养环境中空气流通, 换气次数达到(10 ~ 15)次/h。

1.2 试剂

氯化钠注射液, 石家庄四药有限公司, 生产批号: 100705118; 牛血清白蛋白, Roche 公司, 生产批号: 738328。

1.3 方法

每组 12 只, 雌雄各半。在实验的第 1、10 和 19

天测量豚鼠体重, 并对豚鼠的脱毛状况进行观察记录。动物体重的测定时间在上午 8:00 ~ 9:00 期间进行, 体重测量结束后再饲以食料。

实验按照 SFDA 推荐的全身过敏实验的程序和模式进行, 分为 3 个阶段(检疫期、致敏期、激发期), 即购进实验动物称完体重后, 进行 10 d 的检疫期。检疫期后, 挑选生理状况合格的动物进行实验随机分组。分别在动物实验的第 1 天(一次致敏组), 第 1、3、5 天(3 次致敏组)或者 1、3、5、7、9 天(5 次致敏组)进行腹腔注射致敏; 分别在实验的第 12、19、26 天根据组别进行腹腔或者腿静脉注射激发, 激发剂量为致敏剂量 2 倍。实验共分 9 组, 第一组: 生理盐水对照组; 第二组: 10 mg/kg 牛血清白蛋白组(腿静脉注射激发); 第三组: 50 mg/kg 牛血清白蛋白组(腿静脉注射激发); 第四组: 100 mg/kg 牛血清白蛋白组(腿静脉注射激发); 第五组: 100 mg/kg 牛血清白蛋白组(腹腔注射激发); 第六组: 50 mg/kg 牛血清白蛋白组(第 12 天经腿静脉注射激发); 第七组: 50 mg/kg 牛血清白蛋白组(第 26 天经腿静脉注射激发); 第八组: 50 mg/kg 牛血清白蛋白经静脉注射激发组(1 次致敏); 第九组: 50 mg/kg 牛血清白蛋白经静脉注射激发组(3 次致敏)。按不同实验因素进行实验分组情况总结如表 1。

1.4 过敏反应症状的观察和严重程度分级

按照 SFDA 颁布的指导原则对过敏反应严重程度进行评级(见表 2)。按照表 3 所示进行全身过敏反应强度的评价。

表 1 按不同实验因素进行实验分组
Tab. 1 Various groups with different experimental factors

实验分组 Group	牛血清白蛋白剂量 Dose of bovine serum albumin (mg/kg)	致敏次数 Time of sensitization	激发给药时间(天) Challenge interval (Days)
I	0	5	19
II	10	5	19
III	50	5	19
IV	100	5	19
V	100	5	19
VI	50	5	12
VII	50	5	26
VIII	50	1	19
IX	50	3	19

注: 激发给药时间为从检疫期结束后开始计算。Note: The challenge interval was counted from the end of quarantine.

表 2 过敏反应分级及症状

Tab. 2 Levels and symptoms of allergic reaction

分级 Levels	症状 Symptoms	分级 Levels	症状 Symptoms	分级 Levels	症状 Symptoms
0	正常 Normal	7	呼吸急促 Tachypnea	14	步态不稳 Gait instability
1	不安 Restlessness	8	排尿 Urination	15	跳跃 Leap
2	立毛 Piloerection	9	排粪 Diachoresis	16	喘息 Gasping
3	发抖 Tremor	10	流泪 Lacrimation	17	痉挛 Spasm
4	搔鼻 Nasal scratch	11	呼吸困难 Dyspnea	18	横转 Horizontal Turn
5	喷嚏 Sneezing	12	罗音 Rales	19	潮式呼吸 Tidal Respiration
6	咳嗽 Cough	13	紫癜 Purpura	20	死亡 Death

1.4 统计学方法

应用统计学软件 SAS9.0 非参数检验对实验结果进行分析比较。实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。差异显著性水平设为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同致敏剂量对豚鼠发生全身过敏反应的影响

生理盐水组 (I 组), 10 mg/kg (II 组)、50 mg/kg (III 组) 和 100 mg/kg 牛血清白蛋白组 (IV 组) 豚鼠均经后腿静脉注射激发。结果发现, 生理盐水对照组未发现明显的过敏症状 (激发剂量: 2ml/kg); 第 II 组 (10 mg/kg 牛血清白蛋白组) 5 只出现过敏反应弱阳性, 5 只出现过敏反应阳性, 2 只出现过敏反应强阳性; 第 III 组 (50 mg/kg 牛血清白蛋白组) 1 只出现过敏反应阳性, 8 只出现过敏反应强阳性, 3 只出现过敏反应极强阳性 (死亡); 第 IV 组 (100 mg/kg 牛血清白蛋白组) 3 只出现过敏反应强阳性, 9 只

出现过敏反应极强阳性 (死亡)。具体结果见表 4。

表 3 全身过敏反应症状等级评价标准

Tab. 3 Evaluation criteria on symptoms of systemic allergic reaction

分级 Classi- fication	过敏反应强度 Intensity of allergic reaction	症状 Symptoms
-	阴性 Negative	0 无症状 None
+	弱阳性 Weakly positive	1 ~ 4 不安、立毛、发抖、搔鼻 Restlessness, Piloerection, Tremor, Nasal scratch
++	阳性 Positive	5 ~ 10 喷嚏、咳嗽、呼吸急促、排尿、排粪、流泪 Sneezing, Cough, Tachypnea, Urination, Diachoresis, Lacrimation
+++	强阳性 Strongly positive	11 ~ 19 呼吸困难、罗音、紫癜、步态不稳、跳跃、喘息、痉挛、横转、潮式呼吸 Dyspnea, Rales, Purpura, Gait instability, Leap, Gasping, Spasm, Horizontal Turn, Tidal respiration
++++	极强阳性 Extremely strong positive	20 死亡 Death

2.2 不同激发给药途径对豚鼠发生全身过敏反应的影响

生理盐水组 (I 组)、100 mg/kg 牛血清白蛋白组 (IV 组) 经豚鼠后腿静脉注射激发, 100 mg/kg 牛血清白蛋白组 (V 组) 经腹腔注射激发。结果发现, 生理盐水对照组 12 只豚鼠均未发现明显的过敏症状 (激发剂量: 2 mL/kg); 第 IV 组 3 只出现过敏反应强阳性, 9 只出现过敏反应极强阳性 (死亡), 过敏反应的发生率为 100% (12/12); 第 V 组豚鼠 6 只出现过敏反应阴性, 6 只出现过敏反应弱阳性, 0 只出现过敏反应强阳性或者极强阳性, 过敏反应的发生率为 50% (6/12)。结果见表 5。统计结果表明, 相同

表 4 不同组别豚鼠发生全身过敏反应症状等级评价情况

Tab. 4 Levels on symptoms of active systemic anaphylaxis of guinea pig in various groups

组别 Group	动物数 N	过敏反应症状级别 Level of allergic reaction symptoms					阳性反应率 Incidence of positive reaction	极强阳性反应率 Incidence of extremely strong positive reaction
		-	+	++	+++	++++		
I	12	12	0	0	0	0	0%	0%
II	12	0	5	5	2	0	100%	0%
III	12	0	0	1	8	3	100%	25%
IV	12	0	0	0	3	9	100%	75%

注: 与第 I 组比较, II 组、III 组和 IV 组均出现明显的过敏反应, 其过敏反应发生率均为 100%, 但是其过敏反应发生的严重程度存在差别 ($df = 3, \chi^2 = 40.68, P < 0.05$)。Note: Compared with group I, three Groups II, III and IV appeared apparent allergic reaction, and the incidences of all the three groups were 100%. But the severity of the allergic reactions occurred among the three groups are different ($df = 3, \chi^2 = 40.68, P < 0.05$).

表 5 不同组别豚鼠发生全身过敏反应症状等级评价情况
Tab. 5 Levels on symptoms of active systemic anaphylaxis of guinea pig in various groups

组别 Group	动物数 N	过敏反应症状级别 Level of allergic reaction symptoms					阳性反应率 Incidence of positive reaction	极强阳性反应率 Incidence of extremely strong positive reaction
		-	+	++	+++	++++		
I	12	12	0	0	0	0	0 %	0 %
IV	12	0	0	0	3	9	100 %	75 %
V	12	6	6	0	0	0	50 %	0 %

注:相同剂量的情况下,静脉激发给药出现过敏反应的强度高于腹腔注射给药($df = 2, \chi^2 = 29.59, P < 0.05$)。Note: With the same dose of bovine serum albumin, the intensity of allergic reaction was higher in the group with intravenous administration (IV) than the group with intraperitoneal injection (V) ($df = 2, \chi^2 = 29.59, P < 0.05$)。

剂量的情况下,静脉激发给药出现过敏反应的强度高于腹腔注射给药($df = 2, \chi^2 = 29.59, P < 0.05$)。

2.3 不同激发给药时间对豚鼠发生全身过敏反应的影响

以生理盐水组(I组)为对照组,50 mg/kg 牛血清白蛋白致敏的第Ⅲ组、第Ⅵ组和第Ⅶ组豚鼠分别于致敏期结束后的第3天、第10天和第17天经后腿静脉注射激发。结果发现,第I组12只豚鼠均未发现明显的过敏症状(激发剂量:2 mL/kg);Ⅲ组1只出现过敏反应阳性,8只出现过敏反应强阳性,3只出现过敏反应极强阳性(死亡);Ⅵ组豚鼠1只出现过敏反应阴性,7只出现过敏反应阳性,4只出现过敏反应强阳性;Ⅶ组4只出现过敏反应阳性,5只出现过敏反应强阳性,2只出现过敏反应极强阳性(死亡)。结果见表6。统计结果提示,相同剂量和相同致敏激发途径的情况下,第Ⅲ组和第Ⅶ组过敏反应发生的强度要高于第Ⅵ组($df = 3, \chi^2 = 36.84, P < 0.05$)。

2.4 不同致敏次数对豚鼠发生全身过敏反应的影响

生理盐水组(I组)作为阴性对照,观察50 mg/kg 牛血清白蛋白致敏次数不同时,即Ⅲ组5次、Ⅷ组1次和Ⅸ组3次,均经后腿静脉注射激发时过

敏反应发生的情况。结果发现,I组12只豚鼠均未发现明显的过敏症状(激发剂量:2 mL/kg);Ⅲ组1只出现过敏反应阳性,8只出现过敏反应强阳性,3只出现过敏反应极强阳性(死亡);Ⅷ组豚鼠4只出现过敏反应阴性,6只出现过敏反应阳性,2只出现过敏反应强阳性;Ⅸ组3只出现过敏反应阳性,8只出现过敏反应强阳性,1只出现过敏反应极强阳性(死亡)。结果见表7。统计结果提示,在相同剂量不同致敏次数的情况下,致敏3次(Ⅸ组)和5次(Ⅲ组)出现过敏反应的强度显著高于1次致敏组(Ⅷ组)($df = 3, \chi^2 = 39.91, P < 0.05$)。

3 讨论

免疫毒性是指外源性化合物对机体免疫系统的损伤作用,包括免疫抑制和免疫增强两类。药物引起的过敏反应(超敏反应或变态反应)、自身免疫反应以及不良免疫刺激等都属于免疫系统反应性过度增强所导致的结果^[1]。根据SFDA颁布的关于化学药物、中药和天然药物临床前免疫毒性评价的技术指导原则,豚鼠主动全身过敏反应所检测的药物毒性表现为药物所致的I型过敏反应,由IgE介导。该型过敏反应在新化合物中发生率高,在药物的临床副作用中比较常见。因此,采用敏感方法和

表 6 不同组别豚鼠发生全身过敏反应症状等级评价情况
Tab. 6 Levels on symptoms of active systemic anaphylaxis of guinea pig in various groups

组别 Group	动物数 N	过敏反应症状级别 Level of allergic reaction symptoms					阳性反应率 Incidence of positive reaction	极强阳性反应率 Incidence of extremely strong positive reaction
		-	+	++	+++	++++		
I	12	12	0	0	0	0	0	0
Ⅲ	12	0	0	1	8	3	100 %	75 %
Ⅵ	12	1	6	4	1	0	92 %	0 %
Ⅶ	12	0	1	4	5	2	100 %	17 %

注:第Ⅲ组和第Ⅶ组过敏反应发生的强度要高于第Ⅵ组($df = 3, \chi^2 = 36.84, P < 0.05$)。Note: The severity of allergic reaction in Group Ⅲ and Group Ⅶ was significantly higher than Group Ⅵ ($df = 3, \chi^2 = 36.84, P < 0.05$)。

表 7 不同组别豚鼠发生全身过敏反应症状等级评价情况
Tab. 7 Level on symptoms of active systemic anaphylaxis of guinea pig in four groups

组别 Group	动物数 N	过敏反应症状级别 Level of allergic reaction symptoms					阳性反应率 Incidence of positive reaction	极强阳性反应率 Incidence of extremely strong positive reaction
		-	+	++	+++	++++		
I	12	12	0	0	0	0	0 %	0 %
III	12	0	0	1	8	3	100 %	25 %
VIII	12	4	6	2	0	0	67 %	0 %
IX	12	0	0	3	8	1	100 %	8 %

注:在相同剂量不同致敏次数的情况下,致敏 3 次(IX 组)和 5 次(III 组)出现过敏反应的强度显著高于 1 次致敏组(VIII 组)($df = 3, \chi^2 = 39.91, P < 0.05$)。Note: With the same dose of bovine serum albumin and different sensitizing times, the severity of allergic reaction in Group IX and Group III was significantly higher than Group VIII ($df = 3, \chi^2 = 39.91, P < 0.05$)。

如何评价新药可能引起过敏反应应受到足够的重视。

通过比较生理盐水对照组和不同剂量牛血清白蛋白组(10、50、100 mg/kg)豚鼠全身过敏反应发生的情况,我们发现过敏反应的发生率并没有随着剂量的增大而发生变化(均为 100%),但是豚鼠过敏反应症状的严重程度却存在明显的差别(见表 4),其中两个高剂量组 50、100 mg/kg 发生反应的严重程度明显高于 10 mg/kg。该实验结果提示,在新药的安全性评价中,一定要注意受试药物剂量的设计。剂量太低,虽然在一定范围内,过敏反应发生率不变化,但很可能由于过敏反应轻微,而被忽视。另外,牛血清白蛋白作为最常见的受试物,如果用其在实验方案的中作为阳性对照物,我们推荐的适宜剂量为 50 mg/kg。主要考虑如果剂量过小,作为阳性对照难以观察到明显的过敏反应;剂量过大,容易致大量动物死亡,固然能证明实验体系的正确性,但失去了与实验组症状比较的意义。

根据指导原则,致敏过程可以采用静脉、腹腔或皮下注射等方式,这些都是容易产生抗体的给药方法。但是我们认为多次静脉注射致敏可造成豚鼠不必要的伤害和疼痛,一般不应考虑。根据注射体积的差异,可以选择腹腔和皮下致敏,由于腹腔致敏无明显禁忌,一般可为首选。本研究发现,相同剂量和给药周期的情况下,腹腔给药大剂量激发时,豚鼠发生过敏反应的发生率和严重程度明显降低,过敏反应很轻微,不易观察,其原因可能为腹腔吸收较静脉慢所致。因此,激发途径应严格为快速静脉内给药。本研究还表明,激发给药时间过短(第 12 天)和激发给药时间过长(第 26 天),影响到了过敏反应发生率和发生强度,这与抗体 IgE 产生与消退的时间规律相关。因此激发时间在末次致敏后第 10~14 天,即检疫期结束后第 19~23 天较为理想。本研究中关于致敏次数的结果表明,致敏

次数过少(1 次),不利于抗体的产生,过敏反应较弱;致敏次数太长,会影响到实验操作成本并在致敏阶段引起过敏反应,因此在药物安全性评价中应以 3~5 次为宜。

在 GLP 条件下进行药物安全性评价,使得影响豚鼠生理状况的环境因素(如温度、湿度、噪音、空气等)和影响研究结果的实验操作因素得到了有效的控制,这在很大程度上保障了实验动物的质量和评价的有效性^[4-7]。尽管如此,影响豚鼠主动全身过敏反应的一些非实验因素以及操作环节仍可以影响到动物的质量和评价的结果。前期的研究中,我们对这些非实验因素进行了系统的研究。本研究是此基础上,进一步探讨指导原则中过敏反应实验设计方面的细节因素。研究表明,有必要遵照指导原则,注意实验方案中的剂量设计、激发途径、致敏次数和时间间隔,从而有效地评价药物可能导致的 I 型过敏反应。

参考文献:

[1] 霍艳,李波. 药物免疫毒性评价技术要求的国内外进展[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41 (20): 1525 - 1529.
 [2] 国家食品药品监督管理局. 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[J]. 2005, 16 - 27.
 [3] 国家食品药品监督管理局. 中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光过敏反应)研究的技术指导原则[J]. 指导原则编号: GPT5 - 1. 2005, 1 - 20.
 [4] 叶有春. 我国 GLP 建设与实施的几点问题和建议[J]. 安徽医药, 2006, 10(5): 388 - 389.
 [5] 翁谢川,丁日高,袁本利,关勇彪等. GLP 条件下非实验因素对实验用豚鼠生理状态的影响[J]. 中国比较医学杂志(中国实验动物学杂志), 2007, 7: 11 - 14.
 [6] 翁谢川,丁日高,袁本利等. 实验用豚鼠的生物学特性与饲养管理[J]. 生物学通报, 2007, 42(1): 13 - 14.
 [7] 岑小波,赵瀛兰,王莉等. 从药品技术审评的角度看 GLP 实施的必要性[J]. 中国药事, 2005, 19(7): 390 - 392.