

人用药品注册技术要求国际协调会

ICH 三方协调指导原则
人用药物遗传毒性试验和结果分析指导原则
S2 (R1)

2011 年 11 月 9 日
现行第四阶段版本

根据 ICH 程序，本指导原则由相应的 ICH 专家工作组制定，并由各监管机构征求了意见。在 ICH 进程第四阶段，最终草案被推荐给欧盟、日本和美国的监管机构采纳。

S2 (R1) 文件历史

编码	历史	日期
----	----	----

S2A:

药物遗传毒性试验的特殊性指导原则

S2A	指导委员会批准进入第二阶段，并发布公开征求意见。	1994年3月10日
S2A	指导委员会批准进入第四阶段，并推荐给ICH三方的监管机构采纳。	1995年7月19日

S2B:

遗传毒性：药物遗传毒性试验标准组合

S2B	指导委员会批准进入第二阶段，并发布公开征求意见。	1996年10月2日
S2B	指导委员会批准进入第四阶段，并推荐给ICH三方的监管机构采纳。	1997年7月16日

S2 (R1):

对 S2A 和 S2B 指导原则的修订，并将两者合并作为修订版的一部分。

S2 (R1)	指导委员会批准 S2 (R1) 进入第二阶段，并发布公开征求意见。	2008年3月6日
---------	-----------------------------------	-----------

现行第四阶段版本

S2 (R1)	指导委员会批准 S2 (R1) 进入第四阶段，并推荐给 ICH 三方的监管机构采纳。	2011年11月9日
---------	--	------------

人用药物遗传毒性试验和结果分析指导原则

ICH 三方协调指导原则

在 2011 年 11 月 9 日召开的 ICH 指导委员会会议上进入 ICH 进程第四阶段，本指导原则被推荐给 ICH 三方的监管机构采纳。

目录

1. 前言

- 1.1 本指导原则的目标
- 1.2 背景
- 1.3 本指导原则的适用范围
- 1.4 一般原则

2. 遗传毒性标准试验组合

- 2.1 基本原理
- 2.2 标准试验组合的两种选择
- 2.3 标准试验组合的调整
 - 2.3.1 探索性临床试验
 - 2.3.2 对细菌有毒性的受试物
 - 2.3.3 具有遗传毒性警示结构的化合物
 - 2.3.4 采用体内试验的局限性
- 2.4 生殖细胞诱变剂的检测

3. 对体外试验的建议

- 3.1 试验重复和分析
- 3.2 细菌突变试验的推荐方案
 - 3.2.1 高浓度水平的选择
 - 3.2.2 试验设计/试验方案
- 3.3 哺乳动物细胞试验的推荐方案
 - 3.3.1 高浓度的选择
 - 3.3.2 试验设计/试验方案
 - 3.3.3 阳性对照

4. 对体内试验的建议

- 4.1 检测染色体损伤的体内试验
- 4.2 其他体内遗传毒性试验
- 4.3 体内试验的剂量选择
 - 4.3.1 短期试验
 - 4.3.2 多次给药试验
 - 4.3.3 对具有血液或骨髓毒性化合物的检测
- 4.4 对于体内试验阴性结果的靶组织暴露的证据
 - 4.4.1 当体外遗传毒性试验结果为阳性（或未进行）时
 - 4.4.2 当体外遗传毒性试验结果为阴性时
- 4.5 体内遗传毒性试验的采样时间
- 4.6 分析的动物样本数
- 4.7 体内遗传毒性试验啮齿类动物雄性/雌性的使用
- 4.8 给药途径
- 4.9 体内试验阳性对照的使用
- 5. 试验结果评价和追加试验策略指导原则**
 - 5.1 生物学相关性评估
 - 5.2 体外试验结果评价
 - 5.2.1 体外细菌突变试验阳性结果的评价
 - 5.2.2 体外哺乳动物细胞试验阳性结果的评价
 - 5.2.3 体外试验阴性结果的评价
 - 5.3 体内试验结果评价
 - 5.4 对阳性结果的追加研究策略
 - 5.4.1 对体外哺乳动物细胞试验结果的追加
 - 5.4.2 对体内微核试验阳性结果的追加
 - 5.5 与致癌性试验的肿瘤发现有关的追加遗传毒性试验
- 6. 注释**
- 7. 术语表**
- 8. 参考文献**

S2 (R1): 人用药物遗传毒性试验和结果分析指导原则

1. 前言

1.1 本指导原则的目标

本指导原则为ICH S2A和S2B指导原则的替代和合并。本次修订的目的是：优化预测潜在人体风险的遗传毒性试验标准组合；为结果分析提供指导，其最终目标是改进试验对基于遗传物质改变的致癌性的风险表征能力。本修订版指导原则描述了对遗传毒性标准试验组合中的体外试验和体内试验阳性结果的追加试验和分析（包括对不相关发现的评估）的国际协调标准。本指导原则仅适用于作为人用药物开发的产品。

1.2 背景

本指导原则已考虑了最新的经济合作与发展组织（OECD）指导原则中的建议和国际遗传毒性试验专家组（IWGT）的报告中的相关内容。在一些情况下，与OECD或IWGT建议存在一些差异，本指导原则对这些差异进行了阐述。本指导原则的下述内容应与其他ICH指导原则结合使用。

1.3 本指导原则的适用范围

本指导原则主要适用于新的“小分子”药物，不适用于生物制品。ICH M3 (R2) 中提供了与临床开发进程相关的试验的进行时间。

1.4 一般原则

遗传毒性试验可定义为用于检测通过不同机制诱导遗传性损伤的化合物的体外和体内试验。这些试验能对DNA损伤及其损伤的固定进行风险鉴定。以基因突变、较大范围染色体损伤或重组形式出现的DNA损伤的固定，通常被认为是可遗传效应的基础，并且是恶性肿瘤多阶段发展过程的环节之一（恶性肿瘤发展变化是一个复杂过程，遗传学改变可能仅在其中起部分作用）。染色体数目的改变也与肿瘤发生有关，并可提示生殖细胞出现非整倍体的可能性。在检测这些类别损伤的试验中呈阳性的化合物为潜在的人类致癌剂和/或致突变剂。由于在人体中已建立了某些特定化合物的暴露和致癌性之间的相关性，而对于遗传性疾病尚难以证明有类似的相关性，因此遗传毒性试验主要用于致癌性预测。然而，因为生殖细胞突变与人类疾病明显相关，所以对化合物可能引起可遗传效应的怀

疑，应与对化合物可能引起癌症的怀疑一样，予以谨慎重视。此外，遗传毒性试验结果可能对致癌性试验的结果分析有重要作用。

2. 遗传毒性标准试验组合

2.1 基本原理

药品注册要求对其遗传毒性可能性进行全面评价。大量回顾研究显示许多在细菌回复突变（Ames）试验中检出为致突变剂的化合物是啮齿类动物致癌剂。加上体外哺乳动物细胞试验，提高了啮齿类动物致癌剂检测的灵敏度，并扩大了所检测遗传学事件的范围，但同时也降低了预测的特异性，即提高了与啮齿类动物致癌性不相关的阳性结果的发生率。尽管如此，组合方法仍是合理的，因为没有任何一个单独试验能检测所有与肿瘤发生相关的遗传毒性机制。

标准试验组合应具备以下基本特征：

（1）以一项细菌回复突变试验评价致突变性。该试验已显示能检出相关的遗传学改变，以及大部分啮齿类动物和人类的遗传毒性致癌剂。

（2）还应以哺乳动物细胞体外和/或体内试验评价遗传毒性。

一些体外哺乳动物细胞系统已被广泛应用，并经过充分的验证：体外中期相染色体畸变试验、体外微核试验（注释1）、小鼠淋巴瘤L5178Y细胞*tk*基因突变试验（MLA）。目前认为这三个试验对于检测染色体损伤同等适合，因此，如果使用本指导原则推荐的试验方案，当与标准组合中的其他遗传毒性试验一起使用时，这几个试验可互换。

试验组合中包含了体内试验，是因为一些药物在体内试验中具有诱变性但在体外试验中为阴性结果（注释2），并且由于体内试验考虑了诸如吸收、分布、代谢、排泄等因素使其值得纳入试验组合中。因此，试验组合中包含了一项体内试验，可选择外周血或骨髓红细胞微核试验，或者是骨髓中期相细胞染色体畸变试验（注释3）。来源于给药动物的淋巴细胞培养也可应用于细胞遗传学分析，虽然此种试验的应用还不广泛。

检测中期相细胞染色体畸变的体外和体内试验可检测多种类型的染色体完整性方面的改变。染色单体或染色体的断裂，如果产生无着丝粒片断，可导致微核形成；因此，无论是检测染色体畸变或是检测微核的试验，均可用于检测染色

体断裂剂。微核也可产生于细胞分裂后期时一个或多个染色体迟滞，因此微核试验也具有检测某些非整倍体诱导剂的能力。小鼠淋巴瘤试验（MLA）检测基因突变和染色体损伤两方面所致的*tk*基因突变。有一些证据显示MLA也可检测染色体丢失。

还有一些其他的体内试验可用于标准组合中，或用作追加试验以提高体外或体内试验结果评价的证据权重（见下）。恰当的体内试验（通常是两项）结果为阴性，其检测终点被认为是足够合理，且证实受试物有暴露（见4.4节），通常被认为足以证明不具有明显的遗传毒性风险。

2.2 标准试验组合的两种选择

以下标准试验组合的两种选择被认为是同等适合的（注释 4）：

选择一

- （1）一项细菌回复突变试验；
- （2）一项染色体损伤的细胞遗传学试验（体外中期相染色体畸变试验或体外微核试验），或一项体外小鼠淋巴瘤 *Tk* 基因突变试验；
- （3）一项体内遗传毒性试验，通常为采用啮齿类造血细胞进行的染色体损伤试验，用于检测微核或中期相细胞染色体畸变。

选择二

- （1）一项细菌回复突变试验；
- （2）采用两种不同组织进行的体内遗传毒性试验，通常是一项啮齿类造血细胞微核试验及第二项体内试验。典型的试验是肝 DNA 链断裂试验，除非其他试验证明是合适的（见下；也参见 4.2 节和注释 12）。

选择一具有更多的历史应用经验，部分原因是该组合被 S2A 和 S2B 指导原则推荐。然而，认为选择一和选择二同等适合的原因如下：当体外哺乳动物细胞试验结果为阳性时，两个实施良好的体内试验（采用合适的组织和显示有充分的暴露）的明确阴性结果，被认为足以证明不具有体内遗传毒性潜力（见后面的 5.4.1.1 节），因此进行两种体内试验的试验策略，与对体外试验阳性结果进行追加试验是相同的策略（注释 4）。

在两种标准试验组合选择中，体内试验可采用单次给药或重复给药的试验设计。如果具有科学合理性，采用重复给药时应尽量将遗传毒性终点指标整合入

一般毒性试验中。当在体内评价一项以上的终点指标时，最好是将它们合并在一项试验中。在重复给药毒性试验开始前，通常可获得试验剂量对于重复给药毒性试验是否合适的充分信息，该信息可用于确定进行一项急性遗传毒性试验合适，还是进行一项结合性试验合适。

依照当前建议进行试验实施和评价，完成了任何一种标准试验组合，如果试验结果为阴性，通常可提供不具有遗传毒性作用的充分保证，而无需进行其他试验。标准试验组合结果为阳性的化合物，根据其治疗用途，可能需进行更多的试验（见第 5 节）。

有一些体内试验可用作试验组合选择二中的第二项体内试验（见第 4.2 节），其中一些试验可整合入重复给药毒性试验中。由于肝脏的暴露和代谢能力，肝脏是代表性的首选组织，但是体内组织和试验的选择应根据多种因素来确定，例如药物可能的作用机制、体内代谢特点或者被认为是相关的暴露组织等任何信息。

从体外哺乳动物细胞试验和体外或体内微核试验中可得到染色体数目改变方面的信息。标准组合方案中能提示具有该种潜力的因素是有丝分裂指数升高、多倍体诱导和微核评估。在 MLA 中可检测到纺锤体损害也有一些试验证据。选择二中的体内遗传毒性试验首选微核试验，而不是染色体畸变试验，因微核试验具有检测染色体丢失（可能导致非整倍体）的更直接能力。

建议采用标准试验组合并不意味着其他遗传毒性试验不充分或不合适。其他试验可用作标准试验组合得到的遗传毒性试验结果的进一步研究（见 4.2 节和 5 节）。如果需要且被充分证明合适，也可采用替代的种属（包括非啮齿类）进行试验。

在标准组合中的一项或多项试验可能由于技术原因而无法实施的情况下，如果能提供充分的科学合理性，经过验证的其他试验可用作替代试验。

2.3 标准试验组合的调整

以下描述了标准试验组合可能需要调整的情况。

2.3.1 探索性临床试验

对于某些探索性临床试验，可能仅需较少的遗传毒性试验支持，或对体内试验最高剂量的合适性有不同的标准（参见 ICH M3（R2）指导原则）。

2.3.2 对细菌有毒性的受试物

当化合物（如某些抗生素）对细菌有高毒性时，仍应进行细菌回复突变（Ames）试验，如同在哺乳动物细胞上检测细胞毒性化合物一样，因为致突变性可发生于较低的、毒性较小的浓度。在这种情况下，还应进行任何一项体外哺乳动物细胞试验，即应采用标准组合选择一。

2.3.3 具有遗传毒性警示结构的化合物

标准试验组合通常可检出有警示结构的化合物（注释5），因为大部分“警示结构”被定义为与细菌诱变性有关。已知少数化学类别在哺乳动物细胞染色体损伤试验中比在细菌突变试验中更易检测到。因此，具有警示结构的化合物在任何一种试验组合中结果为阴性时，通常已足以证明其不具有遗传毒性。但是，对于具有某些特殊警示结构的化合物，则需要对标准组合方案进行调整（注释5）。附加试验的选择或方案的调整取决于这些警示结构化合物的化学性质、已知活性和任何代谢信息。

2.3.4 采用体内试验的局限性

对有些化合物，很多体内试验（尤其是骨髓、外周血、肝脏）不能提供额外的有用信息。这些化合物包括毒代或药代动力学资料表明其不能被全身吸收，因此无法在靶组织暴露者，如一些放射显影剂、含铝抗酸剂、吸入给药化合物和一些皮肤或其他局部用药。在改变给药途径也不能提供足够的靶组织暴露，以及对暴露量最高的组织没有合适的遗传毒性试验的情况下，仅根据体外试验进行评价可能是合适的。在某些情况下，可以在给药接触部位评价遗传毒性作用，尽管这些试验尚未被广泛应用（注释6）。

2.4 生殖细胞诱变剂的检测

比较研究结果显示，从定性的意义上说，大多数生殖细胞诱变剂很可能在体细胞试验中检出具有遗传毒性，因此体内体细胞遗传毒性试验的阴性结果通常提示对生殖细胞无影响。

3. 对体外试验的建议

3.1 试验重复和分析

试验结果的重现性是包含有新方法或得到非预期结果的试验研究的基本组成部分。但是，采用标准的、已广泛应用的遗传毒性试验进行常规试验时往往不

需要重复。这些试验都经过充分验证且具有充分的内部控制，对明确的阳性或阴性结果试验通常不需要重复。最理想的是试验能得到明确的阳性或阴性结果。但是，试验结果有时达不到预先设定的阳性或阴性结果的判定标准，因此被定为“可疑”。统计学方法的应用有助于数据分析；但是，充分的生物学意义分析是至关重要的。对可疑结果进行重复试验，可得到：①一个明确的阳性结果，因此总体结果为阳性；②一个阴性结果，所以可疑结果缺乏重现性，总体结果为阴性；③另一个可疑的结果，最后结论仍维持可疑。

3.2 细菌突变试验的推荐方案

OECD指导原则（1997）和IWGT报告（Gatehouse等，1994）给出了对方案的建议。

3.2.1 高浓度的选择

最高浓度水平

当不受溶解度或细胞毒性限制时，推荐最高浓度为5000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ （对于液体受试物为5 $\mu\text{l}/\text{皿}$ ）。

溶解度的限制

对于细菌培养，如果沉淀不干扰评分、不受细胞毒性限制，应对产生沉淀的浓度进行评分，且最高浓度不超过5000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ （对于液体受试物为5 $\mu\text{l}/\text{皿}$ ）。如果未观察到细胞毒性，应以产生沉淀的最低浓度作为进行评分的最高浓度。如果观察到浓度相关的细胞毒性或诱变性，则不管溶解度如何，应按如下所述的根据细胞毒性来确定最高浓度。

细胞毒性的限制

在Ames试验中，进行评分的浓度应显示出明显的细胞毒性，但最高浓度不超过5000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 。细胞毒性可通过回复突变菌落数目的减少，和（或）背景菌苔的消失或减少来检测。

3.2.2 试验设计/试验方案

推荐的菌株组合（OECD）包括可检测碱基置换和移码突变的菌株，如下：鼠伤寒沙门氏菌 TA98；TA100；TA1535；TA1537 或 TA97 或 TA97a 之一；TA102 或大肠埃希杆菌 WP2 *uvrA* 或大肠埃希杆菌 WP2 *uvrA*（pKM101）之一。

与 OECD 和 IWGT 报告建议的一个不同点是：基于药物检测的经验，当 Ames

试验结果是明确的阳性或阴性，且是在完全适当的方案下进行（包括在有和无代谢活化条件下使用所有菌株，能满足高浓度选择标准的合适的浓度范围，有合适的阳性和阴性对照）时，一个单独的 Ames 试验被认为是足够的。而且，对于药物检测，无论是平板掺入法或是预培养法对于该单个试验均是合适的（注释7）。得到可疑或弱阳性结果可能提示需进行重复试验，重复试验时可能需调整方案，如采用合适的浓度水平间距。

3.3 哺乳动物细胞试验的推荐方案

OECD指导原则（1997）和IWGT出版物（如Kirsch-Volders 等，2003；Moore 等，2006）给出了对方案的建议，Moore 等（2006）也给出了对MLA结果分析的建议，包括采用全球评价。此处将说明对于检测药物与这些建议的一些不同点，特别是最高浓度的选择（详见下文）。

3.3.1 高浓度的选择

最高浓度

当不受溶媒或培养液中的溶解度或细胞毒性限制时，推荐的最高浓度是1 mM或0.5 mg/ml（选择其中较低者）（注释8）。

溶解度的限制

当受到溶解度限制时，若不受细胞毒性限制，最高浓度应采用培养液中产生最少可见沉淀的最低浓度（若其不干扰评分）。应通过肉眼或光镜检查等方法对沉淀进行评价，来说明在培养过程中沉淀持续存在或出现（至给药结束）。

细胞毒性

在检测中期相染色体畸变或微核的体外细胞遗传学试验中，最高浓度产生的细胞毒性应不超过细胞生长减少约50%（注释9和10）。对于MLA，最高浓度产生的细胞毒性应为80~90%，通过RTG（相对总生长率）在20~10%之间来测定（注释9）。

3.3.2 试验设计/试验方案

对于体外中期相细胞染色体损伤的细胞遗传学评价，试验方案应包括在有和无代谢活化两种条件、设有合适的阳性和阴性对照情况下进行试验。受试物应给药处理3~6小时，采样时间为从给药开始后的约1.5个正常细胞周期。在有和无活化代谢两种条件下短期给药试验结果为阴性或可疑时，还应进行无代谢活化条件

下持续给药约1.5个正常细胞周期的试验。同样的原则也适用于体外微核试验，除了采样时间为从给药处理后的1.5~2个正常细胞周期（以让细胞完成有丝分裂并进入下一个分裂间期）之外。对于这两种体外细胞遗传学试验，某些类型的化合物可能需调整试验方案，因为它们在给药更长时间、延长采样时间或恢复期后更易检测到，如某些核苷类似物或亚硝酸胺类。在中期相染色体畸变试验中，应通过记录中期相多倍体（包括核内复制）占中期相细胞的百分比率来获得倍数状态信息。对于MLA，试验方案应包括在有和无代谢活化两种条件、设有合适的阳性和阴性对照情况下进行试验，受试物应给药处理3~4小时。在有和无活化代谢两种条件下短期给药试验均得到阴性或可疑结果时，还应进行无活化代谢条件下持续给药约24小时的试验。标准的MLA应包括：①含有主要诱导小集落的阳性对照；②应对阳性对照、溶媒对照、至少一个出现阳性结果的受试物浓度（只要出现阳性结果就应进行），并包括出现最高突变率的培养基，进行突变集落大小的测定。

对于体外哺乳动物细胞试验，应采用如上所述的固定的已确证的因素（如不同的给药时间、在有和无代谢活化两种条件下进行试验）。在这些试验后，试验结果为明确的阴性或阳性时，通常无需进一步的确证性试验。对于可疑或弱阳性结果可能需要重复试验，重复试验时可能需调整方案，比如合适的受试物浓度间距。

3.3.3 阳性对照

设置平行的阳性对照很重要，但是，检测遗传毒性的体外哺乳动物细胞试验已充分标准化，使得可仅在代谢活化条件下采用阳性对照（当与非代谢活化条件试验平行进行时），以证明代谢活化系统的活性和试验系统的反应性。

4. 对体内试验的建议

4.1 检测染色体损伤的体内试验

采用骨髓细胞分析染色体畸变或检测含微核的嗜多染红细胞的体内方法均可用于检测染色体断裂剂。大鼠和小鼠均被认为可用于骨髓微核试验。微核也可采用小鼠外周血中未成熟（如嗜多染）红细胞或大鼠血液中新生网织红细胞测定（注释3）。同样，也可采用来源于其他任何种属（在这些种属的骨髓或外周血上

已显示对检测断裂剂/非整倍体诱导剂有足够灵敏度)的未成熟红细胞(注释3)。如果已经过充分的验证,可采用自动化分析系统(图像分析和流式细胞计数)(OECD, 1997; Hayashi 等, 2000; 2007)。染色体畸变也可通过给药的啮齿类动物的外周淋巴细胞培养来进行检测分析(注释11)。

4.2 其他体内遗传毒性试验

与标准组合选择二中的第二项试验相同的体内试验,可用作追加试验以在评价体外或体内试验结果时提高证据权重(注释11和12)。虽然体外试验中所见的作用类型和任何机制信息可有助于指导体内试验的选择,但是,采用标准方法在大部分组织上检测染色体畸变或内源基因的基因突变是不可行的。虽然在啮齿类转基因动物上可检测突变,但该试验需要较长的给药时间(如28天)以使突变表达、固定、积累,尤其是在细胞分裂极少的组织上(注释12)。因此,第二种体内试验经常以评价DNA损伤为终点指标来作为替代终点。对试验应用经验和试验方案建议已有大量文献报道的试验包括:DNA链断裂试验如单细胞凝胶电泳(“彗星”)试验和碱洗脱试验、转基因小鼠体内突变试验和DNA共价结合试验(所有这些试验均可采用多种组织,注释12),以及肝脏程序外DNA合成(UDS)试验。

4.3 体内试验的剂量选择

通常对有代表性的三个剂量水平进行分析检测(Hayashi 等, 2005)。

4.3.1 短期试验

对于短期试验(通常是给药1~3次),遗传毒性试验推荐的最高剂量是:限度剂量2000mg/kg(若可耐受),或最大耐受量[如微核试验(OECD)],最大耐受量的定义为产生毒性表现的剂量,而基于同样的剂量范围,稍高一些剂量即预期会产生死亡。类似的建议也适用于彗星试验(Hartmann 等, 2003)和转基因突变试验(Heddle 等, 2000)。剂量选择时也应考虑骨髓红细胞生成的抑制。最高剂量之下的其他剂量一般剂量间距为约2~3倍。

4.3.2 多次给药试验

标准组合选择一

当体内遗传毒性试验整合在重复给药毒性试验中时,若该重复给药毒性试验符合支持进行人体临床试验的一个充分试验的标准,则通常认为对于遗传毒性评

价剂量是合适的；这与OECD指导原则关于体内微核试验的剂量选择标准有差异。这适用于体外哺乳动物细胞试验为阴性（或“不相关的阳性”，见第5节）的情况。

追加试验或标准组合选择二

当进行追加试验以阐明任何遗传毒性指征时，或当采用无体外哺乳动物细胞试验的标准组合选择二时，应对多种因素进行评价以确定高剂量是否适用于遗传毒性评价。毒性试验（尤其是大鼠试验）中的高剂量如满足以下任意一条标准，即足以证明该高剂量可用于微核分析或其他遗传毒性评价：

（1）最大可行剂量（MFD），基于药物在溶媒中的物理-化学特性（如果在该溶媒中的MFD与急性给药试验可达到的剂量相似；注释13）。

（2）对于14天或更长时间的试验，如果能耐受，限度剂量为1000 mg/kg。

（3）最大可能暴露量，通过达到暴露峰值/稳态或化合物的蓄积来证明。与之相反，母体化合物随给药时间增加而暴露量明显减少（如比起始暴露量减少 $\geq 50\%$ ），使得该试验不合适（除非可获得开始给药后较短几天内的血样）。如果这种现象发生于单性别，通常在试验结束时不对暴露量减少的该性别进行评价，除非该性别中令人关注的代谢物的暴露量增加。

（4）高剂量 \geq 急性给药试验所采用高剂量的50%，即接近最小致死量，如果该急性给药试验资料由于其他原因可获得。[当前的OECD指导原则中所述的急性给药微核试验的高剂量为，高于该剂量预期将有死亡；对于其他体内试验也有相似的指导建议（如Hartmann等，2003）。]

仅基于无毒性的暴露范围（高于临床暴露量的若干倍）来选择高剂量，被认为是不充分合理的。

4.3.3对具有血液或骨髓毒性化合物的检测

可诱导非整倍体的许多化合物，如强的纺锤体抑制剂，仅在接近毒性剂量的狭窄剂量范围内可被骨髓或血的体内微核试验检出。对于某些断裂剂也是如此。如果毒性资料提示对红细胞系有严重毒性（如明显的嗜多染红细胞（PCE）或网织红细胞抑制），则进行评价的剂量应在该具有毒性的高剂量之下、间距不超过约2倍。如果一个多周给药的重复给药毒性试验中未包含有合适的剂量，有助于检测非整倍体诱导剂和某些毒性断裂剂的附加资料可来源于以下任何一种试验：

(1) 当随着给药时间延长毒性明显升高时，建议进行早期采血样（在第3~4天）。例如，当在多周给药试验（如28天）中采用血或骨髓进行微核测定，以及进行网织红细胞计数时，明显的血液毒性会影响检测微核的能力，即在急性给药后诱导可检测到的微核升高的剂量，在多次给药后可能毒性太大了以至于无法进行分析（Hamada等，2001）。采用早期采样可为检测到断裂剂或潜在的非整倍体诱导剂提供保证（注释14和15）。

(2) 一项体外哺乳动物细胞微核试验。

(3) 一项急性给药骨髓微核试验。

4.4 对于体内试验阴性结果的靶组织暴露的证据

在遗传毒性试验策略中，体内试验具有重要作用。体内试验结果的价值与确定受试物在靶组织中有充分暴露直接相关，尤其是当体外试验显示出令人信服的遗传毒性证据而体内试验结果为阴性时，或者是当未进行体外哺乳动物细胞试验时。充分暴露的证据包括有疑问组织的毒性，或如下所述的毒代动力学资料。

4.4.1 当体外遗传毒性试验结果为阳性（或未进行）时

体内暴露的评估应采用与遗传毒性试验相同的动物种属、品系和给药途径，在最高剂量或其他相关剂量中进行。当在毒性试验中检测遗传毒性时，作为毒性评价的一部分，暴露信息通常可获得。

体内暴露应采用以下任何一种方法进行证明：

(1) 细胞毒性：

a. 细胞遗传学试验：通过微核试验中在各剂量组和各采样时间点，所用组织（骨髓或外周血）中未成熟红细胞占红细胞总数的比例发生显著变化来获得；或通过染色体畸变试验中有丝分裂指数显著的降低来检测。

b. 其他体内遗传毒性试验：应评价肝脏或组织的毒性，如通过组织病理学检查或血液生化学毒性指标来评价。

(2) 暴露：

a. 测定血液或血浆中的药物相关物质。骨髓是血液灌注性良好的组织，血液或血浆中药物相关物质的水平通常与骨髓中观察到的水平相似。无论何种给药途径，对于有全身暴露的药物，肝脏预期都会有暴露。

b. 直接测定靶组织中的药物相关物质，或组织暴露的放射自显影检测。

如果全身暴露与预期的临床暴露相似或更低，可能需采用替代的方法，如：
①采用不同的给药途径；②采用具有更高暴露的不同种属；③采用不同的组织或
试验（参见2.3.4节“采用体内试验的局限性”）。

如果无法达到充分暴露（例如化合物在靶组织显示出极低的生物利用度），
常规的体内遗传毒性试验价值很小。

4.4.2 当体外遗传毒性试验结果为阴性时

若体外试验未显示出潜在的遗传毒性，体内（全身）暴露可采用上述任何一种
方法来进行评估，或者也可采用为其他目的而进行的标准啮齿类动物吸收、
分布、代谢和排泄（ADME）试验结果来进行推算对。

4.5 体内遗传毒性试验的采样时间

体内微核（MN）、染色体畸变和UDS试验的采样时间选择应遵循OECD指
导原则（1997）。

当微核试验整合在多周的重复给药毒性试验中时，应在末次给药的次日进
行外周血或骨髓的采样（参见上述附加采血样时间的建议）。

对于其他遗传毒性试验，采样时间应根据所测定的终点指标进行合理选择；
如，DNA损伤/链断裂测定通常在每日给药、重复多次给药的末次给药后的几个
小时内（如2~6小时）进行采样。在单次给药情况下，应采用两个采样时间点：
给药后的几个小时内和24小时。

原则上，只要最高剂量/暴露是足够的，任何给药期限的试验均可认为是合
适的。

4.6 分析的动物样本数

分析的动物样本数根据微核试验（OECD）或其他遗传毒性试验的当前建议
进行确定，通常不必对毒性试验中的所有给药动物进行分析。用于遗传毒性分析
的动物应从毒性试验的组中随机选择。

4.7 体内遗传毒性试验啮齿类动物雄性/雌性的使用

若检测性别特异性药物，试验可在相应性别中进行。急性给药的体内遗传毒
性试验通常仅在一种性别中进行。对于急性试验，只有在已有的毒性、代谢或暴
露（ C_{max} 或 AUC）资料提示在所用动物种属上存在有毒理学意义的性别差异时，
才考虑采用两种性别。否则，急性遗传毒性试验单用雄性动物即可。当遗传毒性

试验整合在两种性别动物的重复给药毒性试验中时，应对两种性别动物进行采样，但是如果毒性/代谢方面没有明显性别差异，可仅对单一性别进行评价。对性别进行评价的剂量水平需符合合适的剂量水平标准（参见 4.3.2 和 4.3.3 节）。

类似的原则也适用于其他已确证的体内遗传毒性试验。

4.8 给药途径

通常，给药途径应与临床拟用途径一致，如口服、静脉或皮下，但是，为获得全身暴露，在适当时可进行调整，如对于局部给药的化合物（参见 2.3.4 节）。

4.9 体内试验阳性对照的使用

对于体内试验，在实验室已确定具备进行该试验的能力后，仅周期性地设置阳性对照，而不是在每个试验中都设置平行的阳性对照，被认为是合适的（注释 16）。

5. 试验结果评价和追加试验策略指导原则

对比试验已明确显示，在预测啮齿类动物致癌性时每种体外试验系统均可产生假阴性和假阳性结果。遗传毒性试验组合（包括体内和体外试验）检测的是主要通过直接的遗传损伤机制的致癌剂，如大多数已知的人类致癌剂。因此，这些组合不期望用于检测非遗传毒性致癌剂。一些实验条件，如体外代谢活化系统的有限活化能力，可能导致体外试验出现假阴性结果。试验组合方法的设计是为了减少具有潜在遗传毒性的化合物产生假阴性结果的风险。另一方面，任何一项遗传毒性试验中的阳性结果并不总是意味着受试物对人体具有遗传毒性/致癌性风险。

虽然体外试验阳性结果可提示药物内在的遗传毒性特征，但是，在大多数情况下，恰当的体内试验才能确定这些体外试验阳性信号的生物学意义。而且，由于一些遗传毒性的间接机制仅在一定浓度以上才发挥作用，对于具有这些机制证据的药物类别有可能确定一个安全剂量水平（阈值）（参见：下面的 5.2 节，Müller 和 Kasper, 2000; Scott 等, 1991; Thybaud 等, 2007）。

5.1 生物学相关性评估

假定试验已在采用合适的剂量间距、毒性水平等条件下进行，建议如下：

体外或体内试验中出现遗传毒性表观上的轻微增加，首先应评价是否有重现

性和生物学意义。认为结果无生物学意义的例子包括：

(1) 与阴性或溶媒对照组的数值相比有统计学意义的轻微增加，但是在该试验机构的合适的历史背景数据范围内。

(2) 弱/可疑的阳性结果不可重现。

若以上任一情况应用证据权重分析提示其不具有潜在遗传毒性，该试验结果被认为是阴性或无生物学相关性，无需进行进一步试验。

5.2 体外试验结果评价

在评价阳性结果时，尤其是细菌回复突变试验，应考虑受试物的纯度，以确定阳性结果是否是由于污染物所致。

5.2.1 体外细菌突变试验阳性结果的评价

由于Ames试验的阳性结果被认为提示了DNA反应性，为评估患者用药的潜在风险，需进行广泛的追加试验评价体内致突变和致癌性潜力，除非通过适当的风险-获益分析证明是合理的。

有一些菌落的人为升高而非真正的回复突变的典型例子。这可发生于由于氨基酸的污染（即为沙门氏菌株提供组氨酸或为大肠埃希杆菌菌株提供色氨酸），因此细菌回复突变试验不适合检测可能会降解的肽类。也存在一些细菌回复突变试验阳性结果不能提示在人体内具有遗传毒性潜力的例子，例如当发生细菌特异性代谢时，如被细菌硝基还原酶活化。

5.2.2 体外哺乳动物细胞试验阳性结果的评价

IWGT报告（如Thybaud 等，2007）中讨论了关于遗传毒性试验阳性结果时的证据权重评估和追加试验的建议。另外，科研文献列出了许多可导致有可疑相关性的体外试验阳性结果的情况。因此，任何体外试验阳性结果应根据下述的证据权重分析进行评价。以下所列并非详尽，仅供下结论时参考：

(1) 体内不存在的条件（pH值、渗透压、沉淀物）。

（需要注意的是：1 mM的限度避免了渗透压的升高，以及，如果受试物改变了pH值，建议给药时应调整pH值至不给药培养液的正常pH值。）

(2) 阳性结果仅发生于产生高细胞毒性的浓度。

在MLA试验中，阳性结果发生于RTG减少 $\geq 80\%$ 时。

对体外细胞遗传学试验，阳性结果发生于细胞生长抑制 $\geq 50\%$ 时。

对以上任何一种情况，如果采用证据权重分析提示不具有遗传毒性潜力，接下来可进行标准组合选择一。因而，进行单独一个体内试验被认为是足够的。

5.2.3 体外试验阴性结果的评价

对于体外试验阴性结果，在特殊情况下需考虑进行进一步的试验，例如（以下所列并非详尽，仅供下结论时参考）：化合物的结构或已知代谢特征提示标准的体外代谢活化方法（如啮齿类动物肝脏S9）可能不合适；化合物的结构或已知活性提示采用其他试验方法或系统可能更合适。

5.3 体内试验结果评价

体内试验方法具有考虑到与人体应用时可能相关的吸收、分布、排泄等因素的优点，而体外试验则不具备。此外，与体外试验常规使用的代谢系统相比，体内试验的代谢可能更具有相关性。如果体内与体外试验的结果不一致，对其中的差异应根据具体问题具体分析的原则进行考虑/解释分析，如代谢差异、化合物在体内快速和高效的排泄。

体内遗传毒性试验也具有给出误导性假阳性结果的可能性，而该结果并不提示具有真正的遗传毒性。例如：

（1）未给予任何遗传毒性物质，但由于干扰了红细胞生成而导致微核率升高（Tweats 等，2007，I）。

（2）DNA 加合物数据应根据内源性加合物的已知背景水平进行解释。

（3）与毒性相关的间接作用可能影响 DNA 链断裂试验的结果（如碱洗脱和彗星试验）。

因此，评价遗传毒性数据时要考虑所有的毒理学和血液学结果，这一点很重要（注释 15）。与毒理学改变相关的间接作用可能具有一个安全范围，且可能无临床相关性。

5.4 对阳性结果的追加研究策略

5.4.1 对体外哺乳动物细胞试验结果的追加

以下讨论基于假定Ames试验结果为阴性。

5.4.1.1 机制/体内试验追加

当对说明缺乏生物学相关性的证据权重不充分时，对体外哺乳动物细胞试验阳性结果建议进行追加试验以提供试验证据，无论是通过附加的体外试验[下(1)]

或者通过进行两种合适的体内试验[下(2)], 如下:

(1) 有助于对缺乏生物学相关性的遗传毒性提供证据权重的机制信息, 常来自于体外试验, 例如, 在MLA中诱导染色体畸变或突变的受试物不是DNA损伤性物质的证据(如, 除Ames试验之外的其他突变/DNA损伤试验结果为阴性; 化学结构上的考虑), 或者体内可能不相关或可能具有阈值的间接机制的证据(如抑制DNA合成、仅在高浓度时产生活化氧簇, 等等)(Galloway 等, 1998; Scott 等, 1991; Muller和 Kasper, 2000)。类似的试验也可用作体外微核试验阳性结果的追加试验, 或者在这种情况下证据可包括提示染色体丢失/非整倍体的已知机制, 或提示染色体丢失的着丝粒染色试验(注释17)。多倍体在体外染色体畸变试验中为一种常见现象。虽然非整倍体剂可诱导多倍体产生, 但仅依据多倍体并不能提示受试物具有诱导非整倍体的潜力, 而仅能提示细胞周期紊乱; 多倍体也常常与细胞毒性的升高有关。如果在体外试验中仅见多倍体, 而未见结构上的染色体断裂, 一个确保具有适当暴露的体内微核试验阴性结果, 通常可提供缺乏非整倍体诱导潜力的充分证据。

如果上述机制信息和证据权重分析支持不具有相关的遗传毒性, 仅需要单独一个具有合适暴露证据的体内试验, 来确定受试物缺乏遗传毒性作用。代表性的是一个细胞遗传学试验, 而且, 当为染色体丢失潜力进行追加试验时要求进行体内微核试验。

如果证据权重不充分或无充分的机制信息以排除相关的遗传毒性潜力, 通常要求进行两个体内试验, 该体内试验需要采用合适的终点指标和合适的组织(通常是两种不同组织), 且试验的一个重点为在体内模型上获得充分的暴露。

或者

(2) 进行两个合适的体内试验, 通常采用不同的组织, 并且有暴露的支持性证据。

总之, 在终点指标充分证明合理并证明有暴露(见4.4.1节)的适当的体内试验的阴性结果, 足以证明受试物不具有遗传毒性风险。

5.4.1.2 依赖于S9活化的体外试验阳性结果的追加

当阳性结果仅见于S9活化系统存在条件下, 首先应确认是否是代谢活化的原因, 而不是其他一些不同条件(如, 与非活化培养条件下的 $\geq 10\%$ 血清比较, S9

混合物中血清浓度低或无血清)。因而追加试验策略的目的是确定体外结果与体内条件的相关性,通常重点为肝脏的体内试验(注释18)。

5.4.2 对体内微核试验阳性结果的追加

若体内试验显示微核率升高,应对所有的毒理学资料进行评价,以确定非遗传毒性作用是否是其原因或是其中的一个作用因素(注释15)。如果怀疑存在干扰红细胞生成或生理学(如体温偏低或过高)的非特异性作用,进行一项体内染色体畸变试验可能更为合适。如果怀疑一个“真正”的微核率升高,应采用证明该升高是否是由于染色体丢失或染色体断裂所致的策略(注释17)。有证据表明非整倍体诱导作用,如纺锤体毒剂,遵循非线性的剂量反应关系。因此,有可能可确定该作用是否有阈值暴露(低于该暴露下预期不会有染色体丢失),以及确定与临床暴露相比是否存在合适的安全范围。

总之,化合物遗传毒性潜力的评价应综合考虑所有结果,并承认体外和体内试验具有各自的内在价值和局限性。

5.5 与致癌性试验的肿瘤发现有关的追加遗传毒性试验

在遗传毒性标准试验组合中呈阴性结果,但在致癌性试验中显示肿瘤发生率升高,而且无充分证据可确定是非遗传毒性作用机制的化合物,应在合适的模型上进行附加的遗传毒性试验。为了帮助了解作用方式,附加试验可包括改变体外试验的代谢活化条件,或包括检测肿瘤诱导靶器官遗传性损伤的体内试验,如DNA链断裂试验(如彗星试验或碱洗脱试验)、肝UDS试验、DNA加合试验(如通过³²P-后标记)、转基因突变诱导试验,或肿瘤相关基因遗传学改变的分子特征性分析(Kasper等,2007)。

6. 注释

(1) 体外微核试验已由国际性合作研究进行了全面评价(Kirsch-Volders等,2003),已被ECVAM认可(Corvi等,2008),而且是OECD指导原则487的主题(2010)。

(2) 尽管只有少数但仍有相当数量的遗传毒性致癌剂能被骨髓染色体损伤试验可靠地检出,但在标准组合选择所列出的体外试验中却得到阴性、弱阳性或相互矛盾的结果。丙卡巴肼、对苯二酚、氨基甲酸乙酯、苯等致癌剂即属于此类。

Tweats 等（2007，II）描述了来自于公司调查中的其他一些例子。

（3）原则上，造血细胞的微核可采用任何种属的骨髓，以及循环系统中的含微核红细胞不会被脾脏清除的动物种属的血液进行评价。在老鼠上，微核可通过血中的嗜多染红细胞进行测定，当老鼠连续给药约4周或更长时间时也可采用成熟红细胞（正染红细胞）进行测定。虽然大鼠可快速清除循环中的含微核红细胞，但是已确定大鼠血液网织红细胞中可检测到由一系列断裂剂和非整倍体剂诱导的微核（Wakata 等，1998；Hamada 等，2001）。大鼠血液也可用于微核分析，只要所用方法学可确保能分析新生网织红细胞（Hayashi等，2007；MacGregor 等，2006），而且与骨髓相比，大鼠的血液样本量足够大，可提供合适的统计学灵敏度以确定更低的微核水平（Kissling等，2007）。无论选择何种方法，骨髓或血液，自动化或人工分析，每个实验室均应确定适当的最小样本量大小以保证测定误差保持在低于动物之间的变异水平。

现已有一些在犬和恒河猴上诱导微核的经验（Harper等，2007；Hotchkiss等，2008）。这些替代种属可能有用的一个例子是：评价在啮齿类动物上不能充分出现但却可在犬或猴上形成的人体代谢物。

（4）虽然标准组合的两种选择同等适合，个别受试物的特定信息可提示首选其中一种选择。例如，如果动物模型上的全身暴露与预期临床暴露相当或更低，应进行体外试验即选择一（也参见第2.3.4 和4.4.1节）。另一方面，预期在肝脏产生短暂的活性代谢物时，推荐采用包含有一项肝脏试验的选择二。

（5）某些具有遗传毒性警示结构的分子实体被认为与化学物质的致癌和/或致突变潜力有因果关系。警示结构包括烷化亲电子中心、不稳定环氧化物、芳香胺、偶氮结构、*N*-亚硝基基团、芳香硝基基团（Ashby 和 Paton，1994）。对有特殊警示结构的几类化合物（如含有偶氮基团的分子、糖苷类、活化需要还原硝基的化合物如硝基咪唑类、代谢活化需要一种不同的啮齿类动物 S9 的化合物如非那西汀），已确定采用特殊的方案调整/附加试验对遗传毒性的优化检测非常重要。

（6）采用皮肤和结肠进行诱导微核的体内试验已有一些经验（Hayashi 等，2007），而且在这些组织中进行 DNA 损伤试验也是一种合适的替代方法。

（7）一些化合物采用平板掺入法或预培养法均可很容易地被检测到，虽然两

者存在明显的量的差异，但却无质的差异（Gatehouse 等，1994）。制药工业界的经验是采用两种方案对药物进行试验，两种方法未产生不同的结果，而且，在 IWGT 报告（Gatehouse 等，1994）中列出的在预培养法中更容易检测到的化合物类别的例子通常不是药物，且在采用肝脏进行的体内遗传毒性试验结果中为阳性。这些物质包括短链脂肪亚硝胺、二价金属、醛（如甲醛、丁烯醛）、偶氮染料（如甲基黄）、吡咯里西啶类生物碱、烯丙基化合物（异硫氰酸烯丙酯、氯丙烯）和硝基（芳香族、脂肪族）化合物。

（8）体外哺乳动物细胞试验最高浓度为1mM的理由包括如下：第一，试验组合包含了Ames试验和一项体内试验。该组合优化了遗传毒性致癌剂的检测而不仅仅依赖于任何一个单独的试验。无法被Ames试验或体内遗传毒性试验检测到，而在体外哺乳动物细胞试验也仅在浓度在1 mM以上才能检测到，但具有担忧（DNA损伤性致癌剂）的这类化合物存在的可能性极低。第二，1 mM的限度支持危险度鉴定的要素，该浓度已高于现有已知药物的临床暴露，包括那些药物富集组织内的暴露（Goodman & Gilman's, 2001），也高于临床前体内试验中通常能达到的水平。已知某些药物为了治疗作用需要相当高的临床暴露，如核苷类似物和一些抗生素。虽然与现有药物比较效价可能是申请人的兴趣所在，甚至可能在高于1 mM的限度上进行比较，但最终还是由体内试验来确定与人体安全性的相关性。对于分子量非常低的药物（如低于200），应考虑更高的受试物浓度。

（9）虽然一些遗传毒性致癌剂在体外遗传毒性试验中无法检测到，除非所检测浓度达到可诱导一定程度的细胞毒性，但是，DNA损伤性药物通常在仅出现中等程度的毒性时即可被检测到（Greenwood 等，2004）。随着细胞毒性的升高，化合物或其代谢物通过非直接DNA损伤的机制可产生与细胞毒性相关而非遗传毒性的“阳性”结果。此种继发于非DNA靶点损伤的间接诱导DNA损伤，更易发生于在某一浓度阈值之上，而在较低的、药理学相关浓度时，预期不会发生对细胞进程的干扰。

在细胞遗传学试验中，即使已知是致癌剂的弱的断裂剂，在细胞计数减少不超过50%时也得到阳性结果。另一方面，那些非DNA损伤性、致突变性或致癌性的化合物，在出现细胞毒性的浓度时可诱导染色体断裂。对于染色体畸变试验和体外微核试验这两种体外细胞遗传学试验，生长减少约50%的限度是合适的。

对于采用细胞系进行的细胞遗传学试验，测定细胞群生长的经时性改变[通过测定培养过程中的相对于对照的细胞数的改变，如通过群体倍增（population doubling, PD; 注释10）的方法]是测定细胞毒性的一种有效方法，因为细胞计数方法可低估毒性。对于淋巴细胞培养，增殖抑制不超过50%被认为是足够的；这可通过中期相畸变试验的分裂指数（MI）和体外微核试验的基于胞质分裂阻滞的指数来测定。另外，对于体外微核试验，由于在有丝分裂后的细胞间期进行微核计数，因此确定细胞已完成了细胞周期非常重要。这可通过应用细胞松弛素B以允许核分裂而非细胞分裂来达到，使可在双核细胞中计数微核（首选淋巴细胞方法）。对于细胞系，也可用其他证明细胞增殖的方法，包括如上所述的细胞群生长的经时性改变（PD）（Kirsch-Volders 等，2003）。

对于小鼠淋巴瘤试验（MLA），对于软琼脂法和微孔法两种方法，将最高剂量设为相对总生长率（RTG）接近20%（10~20%）的浓度，均可达到合适的灵敏度（Moore 等，2002）。采用当前标准对已发表资料进行回顾，发现在MLA中仅在低于20%RTG浓度时得到阳性结果，同时为啮齿类动物致癌物的化学物质极为少见，而且该类化合物缺乏令人信服的遗传毒性致癌剂的证据。一致的意见是当突变升高仅见于低于20%RTG的情况下进行结果分析时需谨慎，而且，如果突变升高仅见于 $\leq 10\%$ RTG时，该结果可能不被认为是阳性。

总之，在对生长/存活的减少接近或超过50%（细胞遗传学试验）或80%（MLA）时所获得的阳性结果进行分析时应谨慎。以这种细胞毒性/集落存活的浓度水平给药处理过的细胞进行评价可产生更高的灵敏度，但是也带来了不相关的阳性结果增加的风险，这一点已得到公认。遗传毒性评价采用试验组合的策略方法，是为了在不依赖于在高细胞毒性下的单一体外哺乳动物试验情况下，确保有合适的灵敏度。

为获得合适的毒性范围，在一个较宽的浓度范围内进行初步的范围探索试验是有益的，但是，在遗传毒性试验中，采用剂距非常接近（低于两倍稀释度）的多个浓度进行试验，通常是非常关键的。可对更多、额外的浓度进行试验，但是不必对所有浓度都进行遗传毒性评价。例如，这不是指要为了准确达到细胞生长减少50%或RTG减少80%而进行大量试验。

（10）对体外细胞遗传学试验，用相对细胞生长测定来评价毒性是合适的，

因为细胞计数可能低估毒性（Greenwood 等，2004）。采用计算群体倍增（见术语）来估计生长减少水平50%的方法，结果显示，非突变剂或非致癌剂得到阳性结果的频率会降低，而通过直接作用于DNA的药物可得到可靠的阳性结果。

（11）在某些情况下，采用来源于单次或多次给予受试物后的实验动物的培养淋巴细胞检测中期相染色体畸变是有用的，就如同可采用骨髓中期相细胞一样。因为循环中的淋巴细胞是不可复制的，对于需要通过细胞复制才能显示出遗传毒性作用的药物（如某些核苷类似物）在该种细胞类型中预期检测不到。由于一些淋巴细胞寿命相对较长，原则上它们具有体内蓄积未修复DNA损伤的潜力，这将使当细胞在体外受到刺激进行分裂时畸变率升高。体内淋巴细胞试验可用于断裂剂指征的追加，但是，对于造血细胞微核试验，采用其他组织（如肝脏）的试验通常可补充提供更多信息量，因为肝脏中药物和代谢物的暴露通常更高。

（12）在试验组合中包含第二项体内试验，是为了通过采用一种对药物和/或其代谢物具有良好暴露的组织来确证缺乏遗传毒性；一小部分认为有遗传毒性的致癌剂在肝脏试验中结果为阳性，但在体内骨髓细胞遗传学试验中结果却为阴性。这些例子很可能反映出缺乏合适的代谢活性或缺乏向骨髓造血细胞传递的活性中间体。

DNA链断裂、DNA加合物、转基因突变试验具有可在许多组织上应用的优点。虽然除了UDS试验外，对于DNA链断裂试验（彗星和碱洗脱试验）、DNA加合物（共价结合）试验和转基因啮齿类动物突变试验也已有相当多的经验、已发表的文献和方案建议，但是对所有这些体内试验仍未产生国际上公认的方案。对于体外MLA为阳性结果、主要诱导大集落，而且已知在体外中期相试验中不诱导染色体断裂的化合物，一项体内突变试验，如转基因小鼠试验，应优先于DNA链断裂试验之前考虑进行。UDS试验被认为主要适用于诱导大的DNA加合物或Ames试验为阳性结果的化合物。由于细胞毒性会诱导DNA链断裂，需进行仔细的细胞毒性评价，以避免与DNA链断裂试验结果相混淆。这在体外碱洗脱试验中能很好地辨别（Storer等，1996），但在彗星试验中未得到充分确证。原则上在采用合适的剂量水平和采样时间时，DNA链断裂试验可整合在重复给药毒性试验中。

由于成熟动物的肝脏不是高度有丝分裂的组织，第二种试验通常采用非细胞

遗传学终点，但是，当分裂肝细胞存在时，如在部分肝切除术后，或在年轻大鼠上（Hayashi等，2007），采用肝脏进行微核试验也是可能的，并可检测已知的遗传毒性化合物。

（13）对于常规的溶媒，如甲基纤维素水溶液，这通常是适合的，但是对于吐温80之类的溶媒，能给予的容积可比急性给药试验给予的量低30倍。

（14）如果毒理试验设计中包含了附加的血样采集，如用于测定暴露水平，应引起谨慎关注。此种出血可干扰微核分析的结果，因为红细胞生成受出血的刺激可导致含微核的红细胞升高。

（15）微核升高可发生于未给予任何遗传毒性物质时，而由于红细胞生成的干扰（如再生障碍性贫血，髓外造血作用）、应激、体温偏低或体温过高所致（由Tweats等回顾性评价，2007，I）。在血中，脾脏功能的改变可影响含微核细胞从血中的清除，可导致循环中的含微核红细胞数量的轻微升高。

（16）短期或重复给药遗传毒性试验的阳性对照：对于微核（和其他细胞遗传学）试验，阳性对照的目的是验证阅片计数者能可靠地检测微核的升高。这可通过急性给予阳性对照的小组别动物（单性别）的周期性试验（每隔几个月）中的采样来实现。对于人工计数，这种载玻片可掺入至每个试验的编号载玻片中进行阅片。根据其染色特性或微核频率，阳性对照载玻片对于阅片者不应是显而易见的。对于自动化计数，每个试验中均应采用合适的质控样本。

对于其他体内遗传毒性试验，阳性对照的目的是验证采用所选择的动物种属、组织和方案的试验能可靠地检测DNA损伤/诱变性升高。在一个实验室已证明在大量的独立的试验中始终能检测到合适的阳性对照化合物后，如果实验条件不改变，周期性地有阳性对照的试验通常是足够的。但是，对于彗星试验，目前建议采用平行的阳性对照。

（17）确定微核诱导是否是主要由于染色体丢失或染色体断裂所致，应包括对体外或体内微核染色以确定着丝粒是否存在，例如，在着丝粒位置的DNA序列采用有探针的荧光原位杂交（FISH），或者采用抗着丝粒蛋白的标记抗体。如果大多数诱导的微核是着丝粒阳性，这提示有染色体丢失。（注意：虽然强微管毒剂诸如秋水仙碱和长春碱不会产生100%着丝点阳性的微核，但典型的超过70%~80%，而在风险评估中公认为主要是非整倍体诱导剂）。一个替代的方法是

进行一项中期相结构畸变体外或体内试验；如果结果是阴性，则提示该微核诱导与染色体丢失有关。

(18) 标准诱导的 S9 混合物具比人 S9 更高的活化能力，并缺乏 II 相解毒能力，除非添加特异性的辅助因子。而且，在体外测试底物浓度高时可发生非特异的活化作用（参见 Kirkland 等，2007）。采用人 S9 或其他人类相关的活化系统进行遗传毒性试验是有用的。分析遗传毒性试验中培养物的代谢产物特性，与临床前动物种属（在非诱导的微粒体或肝细胞上，或体内）或来自于人体样本的已知代谢产物特性进行比较，也可有助于确定试验结果的相关性（Ku 等，2007），而且，追加试验通常采用肝脏进行的体内试验。在 S9 存在条件下体外试验得到阳性结果的化合物，在体内可能不诱导遗传毒性，因为不形成代谢产物或形成量极微，或被代谢性解毒或快速排泄，这种情况可提示受试物缺乏体内风险。

7、术语表

碱洗脱试验 (Alkaline elution assay): 见 DNA 链断裂试验。

非整倍体 (Aneuploidy): 细胞或生物体中染色体数目不成倍数的改变。

碱基置换 (Base substitution): 核苷酸序列中单个或多个碱基被其他碱基替代, 从而可导致蛋白质的改变。

细胞增殖 (Cell proliferation): 细胞分化以及形成子细胞的能力。

着丝粒/着丝点 (Centromere/kinetochore): 用于连接姐妹染色单体和附着纺锤丝, 使子代染色体移向两极并确保含有子核的染色体中的必不可少的结构。

染色体断裂剂 (Clastogen): 能诱发染色体结构断裂 (光镜下通常可检出) 的物质。

克隆形成率 (Cloning efficiency): 单个细胞形成克隆的能力。通常将少量细胞接种于适宜的环境培养后测量。

彗星试验 (Comet assay): 见 DNA 链断裂试验。

培养聚集性 (Culture confluency): 通过肉眼对培养基中细胞密度的定量测定。

细胞遗传学评价 (Cytogenetic evaluation): 用光学显微镜对有丝分裂或减数分裂期的染色体结构进行分析, 或进行微核分析。

DNA 加合物 (DNA adduct): 化合物与 DNA 的共价结合产物。

DNA 修复 (DNA repair): DNA 损伤后原始 DNA 序列的重建。

DNA 链断裂 (DNA strand breaks): DNA 的单链或双链被切断。

DNA 链断裂试验 (DNA strand break assay): 碱处理使某种类型的 DNA 损伤转化为链断裂, 其可通过碱洗脱技术 (测定在过滤器中的移动速率), 或通过单细胞凝胶电泳或彗星试验 (将细胞加样于载玻片的凝胶薄层, 通以电流, 使 DNA 断裂短片段从细胞核中迁移出形成“彗尾”) 来检测。DNA 迁移的程度通过染色细胞在显微镜下观察测定。

移码突变 (Frameshift mutation): 基因的核苷酸序列中插入或缺失一个或两个相邻碱基的一种突变 (遗传密码改变), 这可导致蛋白质的改变或缩短。

基因突变 (Gene mutation): 单个基因或基因调控序列中可检出的一种永久性改变, 这种改变可以是点突变、插入或缺失。

遗传学终点 (Genetic endpoint): 所研究的某种明确类型或类别的遗传学改变 (如基因突变、染色体畸变、DNA 链断裂、DNA 修复、DNA 加合物形成等)。

遗传毒性 (Genotoxicity): 泛指各种机制导致发生的任何有害的遗传物质改变。

微核 (Micronucleus): 细胞中含有核 DNA 的微粒, 可含有整条染色体、或有着丝粒或无着丝粒的染色体断裂片段。

有丝分裂指数 (Mitotic index): 标本 (涂片) 中处于有丝分裂不同阶段的细胞占非有丝分裂 (分裂间期) 的细胞数的百分比。

染色体数目改变 (Numerical chromosome changes): 染色体数目与原来的染色体单倍体或二倍体不同; 对于细胞系, 其染色体数目与原型染色体不同。

质粒 (Plasmid): 加入到正常细菌基因组中的遗传物质。一个质粒可能插入宿主染色体或形成染色体外单元。

点突变 (Point mutations): 通常仅限于单个 DNA 碱基对的遗传密码改变。

嗜多染红细胞 (Polychromatic erythrocyte): 分化中期的未成熟红细胞, 因其含有核糖体, 可通过 RNA 的选择性染色与成熟的正染红细胞 (不含核糖体) 区分。

多倍体 (Polyploidy): 细胞中染色体倍数的数目变化, 大致为单倍体数目的整数倍。核内复制是多倍体的一种形态类型, 其为染色体对在中期相进行联合成为“双分染色体”。

群体倍增或培养生长 (Population doubling or culture growth): 其可采用不同的方法来计算; 一个合适的公式的例子是: 群体倍增(PDs)=最终计数 (N) 除以初始 (基线) 计数 (X₀) 比值的 log 值, 再除以 log 2, 即 $PD = [\log(N \div X_0)] \div \log 2$ 。

重组 (Recombination): DNA 的断裂和平衡或不平衡的重新组合。

相对总生长率 (RTG, relative total growth): 该细胞毒性检测方法采用相对混悬增长率 (基于从给药开始至给药后的第二天的细胞丢失及细胞生长), 乘以突变量化分析时的相对接种效率而得出。

单细胞凝胶电泳试验 (Single cell gel Electrophoresis assay): 彗星试验, 见 DNA 链断裂试验。

存活率（在致突变试验中）(Survival)：存活细胞与死亡细胞的比例。通常经过一段给药时间后，采用染色或集落计数的方法来确定。

转基因 (Transgene)：将外源性或外来基因导入至宿主体细胞或生殖系细胞的基因组中。

程序外DNA合成 (UDS) (Unscheduled DNA synthesis)：为应对DNA损伤，在S期以外的细胞周期中发生的DNA合成。通常与DNA切除修复有关。

8. 参考文献

Ashby J, Paton D. The influence of chemical structure on the extent and sites of carcinogenesis for 522 rodent carcinogens and 55 different human carcinogen exposures. *Mutat Res* 1994;286:3-74.

Corvi R, Albertini S, Hartung T, Hoffmann S, Maurici D, Pfuhler S et al. ECVAM Retrospective Validation of the *in vitro* micronucleus test (MNT). *Mutagenesis* 2008;23:271-283.

Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T et al. Report from the working group on bacterial mutation assays: international workshop on standardisation of genotoxicity test procedures. *Mutat Res* 1994;312:217-33.

Goodman & Gilman. The pharmacological basis of therapeutics. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. 10th ed. New York: McGraw-Hill Professional 2001.

Greenwood SK, Hill RB, Sun JT, Armstrong MJ, Johnson TE, Gara JP et al. Population Doubling: A simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results. *Environ Mol Mutagen* 2004;43:36-44.

Hamada S., Sutou S, Morita T, Wakata A, Asanami S, Hosoya S et al. Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: summary of the 13th collaborative study by the collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)–Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Environ Mol Mutagen* 2001;37:93-110.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 2003;18:45-51.

Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Adler I, Blakey DH, Dertinger SD et al. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:234-52.

Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Blakey DH, Dertinger SD, Abramsson-Zetterberg L et al. *In vivo* erythrocyte micronucleus assay. III. Validation and regulatory acceptance of

automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mutat Res* 2007;627:10-30.

Heddle JA, Dean S, Nohmi T, Boerrigter M, Casciano D, Douglas GR et al. *In vivo* transgenic mutation assays. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:253-9.

Hotchkiss CE, Bishop ME, Dertinger SD, Slikker W, Moore MM, MacGregor JT. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes IV: an index of chromosomal damage in the rhesus monkey (*macaca mulatta*). *Toxicol Sci* 2008 ;102:352-8.

Kasper P, Uno Y, Mauthe R, Asano N, Douglas G, Matthews E et al. Follow-up testing of rodent carcinogens not positive in the standard genotoxicity testing battery: IWGT workgroup report. *Mutat Res* 2007;627:106-116.

Kenelly JC, Waters R, Ashby J, Lefevre PA, Burlinson B, Benford DJ et al. *In vivo* rat liver UDS assay. In: Supplementary Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. Kirkland DJ, Fox M, editors. Cambridge University Press 1993;52-77.

Kirkland DJ, Pfuhrer S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F et al. How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: report of the ECVAM workshop. *Mutat Res* 2007;628:31-55.

Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M et al. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutat Res* 2003;540:153-63.

Kissling GE, Dertinger SD, Hayashi M, MacGregor JT. Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: dependence on number of cells scored and inter-animal variability. *Mutat Res* 2007;634:235-40.

Ku WW, Bigger A, Brambilla G, Glatt H, Gocke E, Guzzie PJ et al. Strategy for genotoxicity testing-metabolic considerations. *Mutat Res* 2007;627:59-77.

MacGregor JT, Bishop ME, McNamee JP, Hayashi M, Asano N, Wakata A et al. Flow Cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat. *Toxicol Sci* 2006;94:92-107.

Moore MM, Honma M, Clements J, Harrington-Brock K, Awogi T, Bolcsfoldi G et al. Mouse lymphoma thymidine kinase locus gene mutation assay: follow-up international workshop on genotoxicity test procedures—New Orleans, Louisiana, April 2000. *Environ Mol Mutagen*

2002;40:292-9.

Moore MM, Honma M, Clements J, Bolcsfoldi G, Burlinson B, Cifone M et al. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: follow-up meeting of the international workshop on genotoxicity testing—Aberdeen, Scotland, 2003—Assay acceptance criteria, positive controls, and data evaluation. *Environ Mol Mutagen* 2006;47:1-5.

Müller L, Kasper P. Human biological relevance and the use of threshold arguments in regulatory genotoxicity assessment: experience with pharmaceuticals. *Mutat Res* 2000;464:9-34.

OECD Guidelines for Genetic Toxicology 1997.

Scott D, Galloway SM, Marshall RR, Ishidate M Jr, Brusick D, Ashby J et al. Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICP EMC task group 9. *Mutat Res* 1991;257:147-204.

Storer RD, McKelvey TW, Kraynak AR, Elia MC, Barnum JE, Harmon LS et al. Revalidation of the *in vitro* alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds. *Mutat Res* 1996;368:59-101.

Suzuki H, Ikeda N, Kobayashi K, Terashima Y, Shimada Y, Suzuki T et al. Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats. A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) - Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Mutat Res* 2005;583:133-45.

Thybaud V, Aardema M, Clements J, Dearfield K, Galloway S, Hayashi M et al. Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing. *Mutat Res* 2007;627:41-58.

Tweats DJ, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Morita T et al. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. *Mutat Res* 2007;627:78-91.

Tweats DJ, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Morita T et al. Report of the IWGT working group on strategy/interpretation of regulatory *in vivo* tests. II. Identification of

in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. *Mutat Res* 2007;627:92-105.

Wakata, A, Miyamae Y, Sato S, Suzuki T, Morita T, Asano N et al. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. *MMS. Environ Mol Mutagen* 1998;32:84-100.