

附件 12

急性经口毒性试验 上下增减剂量法

Acute Oral Toxicity Test Up-and Down Procedure

1 范围

本方法规定了急性经口毒性试验 上下增减剂量法（上下法）的基本原则、要求和方法。

本方法适用于化妆品原料安全性毒理学检测。

2 试验目的

急性经口毒性试验是评估化妆品原料毒性特性的第一步，通过短时间经口染毒可提供对健康危害的信息。试验结果可作为化妆品原料毒性分级和标签标识以及确定亚慢性毒性试验和其他毒理学试验剂量的依据。

3 定义

3.1 急性经口毒性 acute oral toxicity

一次或在 24 h 内多次经口给予实验动物受试物后，动物在短期内出现的健康损害效应。

3.2 经口半数致死量（LD₅₀）oral medium lethal dose

经口一次给予受试物后，引起实验动物总体中半数死亡的毒物的统计学剂量。以单位体重接受受试物的重量(mg/kg 或 g/kg)来表示。

3.3 延迟死亡 delayed death

设定的给药间隔（通常为 48 h）内不引起受试动物死亡或出现濒死状态，但在 14 d 的观察期间内出现死亡。

3.4 剂量级数因子 dose progression factor

也称为剂量步进因子。是指主试验中，当前剂量的一只动物存活或死亡时，下一只动物染毒剂量增加或降低倍数。剂量级数因子建议为 1/（估计的剂量-反应曲线斜率）的反对数。默认的剂量级数因子为 3.2，即 0.5（1/2）的反对数。

3.5 限值剂量 limit dose

受试动物进行急性经口毒性试验的上限剂量（2000 mg/kg 或 5000 mg/kg）。

3.6 逆转 reversal

是指在某个染毒剂量下观察动物无反应，在下一个染毒剂量下观察动物有反应的现象，反之亦然（也就是前一个动物发生反应，后一个动物无反应）。因此，一对不同的动物染毒反应情况产生一个逆转。

3.7 名义受试动物量 nominal sample size

是指受试动物的总数量按下列规则减去一定量动物数：（1）减去染毒序列开始时出现相同反应的最后 1 只动物之前的受试动物数量，（2）或减去第一次发生逆转的一对动物之前受试动物的数量。如在一个模拟序列：OOOXXOXO 中（X 表示死亡，O 表示存活），此时，受试动物的总数量（或常规意义的动物数）是 8，名义受试动物量是 6。

3.8 概率 probit

是“概率积分转换（probability integral transformation）”术语的缩写，预期反应与剂量（通常为对数值）呈标准正态分布（对称轴为反应均值，尺度参数为标准差 σ ），剂量反应模型的概率可以通过其与 σ 的倒数成直线关系进行分析。致死量的标准正态分布曲线是对称的，曲线的中值就是真实 LD₅₀ 或中位值。

3.9 标准偏差（ σ ） standard deviation

是一个对数正态曲线的标准偏差，用来描述受试动物对受试物的耐受范围（如染毒剂量超过耐受剂量，受试动物预期能发生反应）。预估的 σ 值可以预测受试动物对整个染毒剂量区间发生反应的变异性。

3.10 斜率（剂量-反应曲线） slope (of the dose-response curve)

剂量反应曲线的斜率，是反应曲线相对于剂量数轴的倾斜程度。在进行概率分析时，用概率值表示的反应相对于对数剂量呈直线关系，此时，斜率是 σ 的倒数（ σ 是表示受试动物耐受性正态分布的标准偏差）。

4 试验的基本原则

该方法旨在以最小量的动物测出化妆品原料的急性经口毒性，适合于能引起动物快速死亡的受试物。按照预定的试验规则和程序，以管饲法经口给予受试物。染毒后观察动物的毒性反应和死亡情况。试验期间死亡的动物要进行尸检，试验结束时仍存活的动物要处死并进行尸检。本方法主要适用于啮齿类动物的研究，通常选用雌性大鼠。也可选用其他啮齿类动物。

该方法分为限量试验（limit test）和主试验（main test）。限量试验用不多于 5 只动物评价受试物 LD₅₀ 是否高于限值剂量（2000 mg/kg，或 5000 mg/kg），主要用于有资料提示受试物毒性可能较小的情况。主试验采用一个单一剂量级数染毒序列，每次一只动物，根据动物的存活情况确定下一只动物的染毒剂量，染毒间隔通常为 48 h。当满足停止规则之一时，停止染毒，采用最大似然法对 LD₅₀ 进行计算。根据试验结果对 LD₅₀ 和置信区间进行评估。

本方法给出了试验停止规则和 LD₅₀ 计算方法，实际工作中可采用计算机化的程序进行剂量设计和结果计算。

5 试验方法

5.1 受试物

受试物应溶解或悬浮于适宜的介质中，建议首选水，其次考虑使用植物油（如玉米油）或其他介质（如羧甲基纤维素、明胶、淀粉等），制成溶液、混悬液或乳浊液。对非水介质，应了解其毒理特性，否则应在试验前先确定其毒性。每次经口染毒液体的最大容量取决于实

验动物的大小，对啮齿类动物所给液体容量一般为 1 mL/100 g，水溶液可至 2 mL/100 g。通过调整受试物溶液浓度使各剂量组经口染毒的容量一致。

5.2 实验动物和饲养环境

啮齿类动物中首选大鼠，也可选用其他啮齿类动物。通常选用单一性别大鼠。在缺乏构效关系或无提示雄性更为敏感性别动物的前提下，一般选用雌性动物进行试验。当用雄性大鼠做试验时，要提供充分的理由。

应选用年轻健康动物和非经产、未受孕的雌性动物。在试验开始时，动物应在 8 周~12 周龄，体重变异应不超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。如果进行连续的试验，要注意确保在整个研究中动物的体重和周龄符合要求。试验前动物要在实验动物房环境中至少适应 3~5 d 时间。

实验动物及实验动物房应符合国家相应规定。选用标准配合饲料，饮水不限制。

5.3 剂量水平

限量试验采用限值剂量（2000 mg/kg，或 5000 mg/kg）。主试验按照低于最佳估算 LD_{50} 一级的剂量给第一只动物染毒。如果受试动物存活，第二只动物采用高一级剂量染毒；如果第一只受试动物死亡，第二只动物就采用低一级剂量。剂量级数因子默认为 3.2。对每只动物都应认真观察至 48 h 后，才能决定是否对下一只动物染毒或染毒剂量的多少。当满足停止规则之一时，停止染毒。大多数情况下，在出现第一次逆转后再进行 4 只动物就可完成试验。

5.4 试验步骤

5.4.1 染毒

动物在染毒前应禁食（大鼠禁食不禁水过夜，小鼠禁食不禁水 3 h~4 h）。禁食后对动物称重，根据禁食后的动物体重计算染毒剂量，然后再进行染毒。对动物用管饲法一次进行染毒，若估计受试物毒性很低，一次给予容量太大，也可在 24 h 内分 2~3 次染毒，但合并作为一次剂量计算。染毒后继续禁食 3 h~4 h。若采用分批多次染毒，根据染毒间隔长短，必要时可给动物一定量的食物和水。

5.4.2 限量试验和主试验

如果有相关的资料表明受试物可能无毒（致死量高于限值剂量），可以进行限量试验。受试物的毒性信息可以通过相似化合物或相似混合物及产品的测试信息来获得。当受试物的毒性信息很少或没有时，或推测到受试物有毒时，应进行主试验。

5.4.2.1 限量试验

（1）2000 mg/kg 限量试验

用 2000 mg/kg 剂量对一只动物进行染毒。间隔期内（48 h）如果动物出现死亡，进行主试验并计算 LD_{50} 。如果动物存活，对另外 4 只动物进行连续染毒，动物总数为 5 只。观察期内（14 d）如果有 3 只动物出现死亡，停止限量试验，进行主试验。如果 3 只或 3 只以上动物存活，那么 LD_{50} 大于 2000 mg/kg。如果试验中动物出现意外的延迟死亡，此时要停

止染毒并观察所有的动物，看其他动物在相同的观察周期是否也会出现死亡。延迟死亡的动物应同其他死亡的动物一样记入死亡数量。

结果评估如下（O=无反应即存活，X=反应即死亡）：

a) 当 3 只或以上动物出现死亡，LD₅₀ 低于限量剂量（2000 mg/kg），需进行主试验。

O XO XX

O OX XX

O XX OX

O XX X

b) 测试 5 只动物。当 3 只或 3 只以上动物存活，则 LD₅₀ 大于限量剂量（2000 mg/kg）。

O OO OO

O OO XO

O OO OX

O OO XX

O XO XO

O XO OO/X

O OX XO

O OX OO/X

O XX OO

（2）5000 mg/kg 限量试验

只在为满足监管需求的特殊情况下才使用 5000 mg/kg 进行限量试验。出于对动物的人道考虑，不主张对 GHS（全球化学品统一分类和标签制度）第 5 类（LD₅₀ 介于 2000 mg/kg~5000 mg/kg）物质进行动物试验，只有当试验结果极可能涉及人类或动物健康以及环境保护等因素时，方考虑进行该试验。

对一只动物用 5000 mg/kg 剂量进行染毒，如果动物死亡，就进行主试验来确定 LD₅₀。如果动物存活，继续对另外两只动物进行染毒。如果两只动物都存活，则 LD₅₀ 高于限值剂量，限量试验结束（持续观察 14 d，不对另外的动物进行染毒）。如果一只或者两只动物出现死亡，那么再给另外两只动物染毒，每次一只。

如果试验中有一只动物出现延迟死亡且其他动物存活，此时应停止染毒并观察所有的动物，看其他动物在相同的观察周期是否也会死亡。延迟死亡的动物应同其他死亡的动物一样记入死亡数量。

结果评估如下：

a) 当 3 只或更多的动物死亡，LD₅₀ 低于 5000 mg/kg。

O XO XX

O OX XX

O XX OX

O XX X

b) 当 3 只或更多的动物存活，LD₅₀ 高于 5000 mg/kg。

O O O
O X O X O
O X O O
O O X X O
O O X O
O X X O O

5.4.2.2 主试验

(1) 通常每间隔 48 h 对每只动物逐一染毒。染毒间隔可根据毒性反应发生、持续时间和毒性症状的严重性调整。应当确认先前染毒的动物仍然存活后，方可进行下一个剂量的染毒。染毒间隔时间可做酌情调整（如结果不确定时）。采用固定的染毒间隔试验较易进行。但试验中调整了染毒间隔也不必要重新计算染毒剂量和似然比。选择起始剂量时，可参考所有可得到的资料，包括与受试物在结构上相关的物质信息以及受试物的所有毒性测试结果，来预估受试物 LD_{50} 和剂量反应曲线的斜率。

(2) 第一只动物的染毒剂量要比 LD_{50} 的最佳预测值低一级。如果这只动物存活，就使用较高的剂量给第二只动物染毒。如果这只动物出现死亡或者濒死的状况，就用低一级的剂量对第二只动物进行染毒。剂量级数因子应该选择为 $1/(\text{预估的剂量-反应曲线斜率})$ 的反对数，而且在整个测试中应该保持不变。当没有受试物的斜率信息时，使用默认剂量级数因子为 3.2（对应的斜率为 2）。染毒上限为 2000 mg/kg，剂量依次为 1.75 mg/kg，5.5 mg/kg，17.5 mg/kg，55 mg/kg，175 mg/kg，550 mg/kg，2000 mg/kg（有特殊监管要求时可使用染毒上限 5000 mg/kg，剂量依次为 1.75 mg/kg，5.5 mg/kg，17.5 mg/kg，55 mg/kg，175 mg/kg，550 mg/kg，1750 mg/kg，5000 mg/kg 的序列）。如果无法预测受试物的致死量信息，染毒剂量应当从 175 mg/kg 开始。通常这个剂量是亚致死量，采用此剂量可以减少动物的疼痛和受苦程度。如果动物对受试物的耐受程度变化范围预计很大（即反应-对数剂量曲线预计斜率低于 2.0），开始试验前应考虑在默认剂量级数因子（3.2）上增加剂量级数。对于已知斜率很陡的受试物，应选择比默认值小的剂量级数因子。表 1 提供了从 1 到 8 的整数斜率的剂量级数表，包括常用起始剂量 175 mg/kg。

(3) 观察至设定的时间间隔后（如 48 h），根据所有动物的试验结果确定是否继续进行染毒。当符合以下停止规则之一时，染毒可以停止：

- a) 在试验上限剂量时有连续 3 只动物存活；
- b) 在连续测试的任意 6 只动物中有 5 个逆转现象发生；
- c) 第一个逆转现象后至少有 4 只受试动物，求得的似然比超过临界值（从第一个逆转后的第 4 只动物开始，每一次染毒后都要进行计算）。

对于绝大多数 LD_{50} 和斜率的组合情况，试验出现逆转后再进行 4 到 6 只动物即可满足停止规则 c)。在一些情况下，对于剂量-反应曲线斜率较小的化学物质，可能需要更多的动物（最高试验动物数为 15）。

(4) 试验满足停止规则后，根据最终试验结果计算 LD_{50} 。

(5) 出于人道而处死的濒死动物应等同于试验死亡动物。如果试验中一只动物发生延

迟死亡，并且其他给予同等或更高剂量的动物仍存活，比较合适的做法是停止染毒，并观察所有动物，看其它动物是否会在相似的观察期内死亡。如果其他存活的动物同样出现死亡，则表明所有剂量水平都超过了 LD_{50} ，应重新进行试验，起始剂量至少低于最低的死亡剂量两级（并延长观察时间）。如果存活动物在之前死亡的动物相同或者更高剂量能够存活，则不需要改变剂量级数，因为较低剂量的死亡动物纳入计算会求得更低的 LD_{50} 值。

5.5 观察

5.5.1 染毒后，对每只动物都应有单独全面的记录，在染毒后的 30 min 内每只动物至少分别观察一次，第 1 d 内要定时观察（在前 4 h 内要特别注意）实验动物的中毒表现和死亡情况，其后至少每天进行一次仔细的检查。详细记录被毛和皮肤、眼睛和粘膜，呼吸、循环、自主神经和中枢神经系统、肢体活动和行为等改变。特别注意是否出现震颤、抽搐、流涎、腹泻、嗜睡和昏迷等症状。应记录毒作用体征出现和消失的时间和死亡时间。发现处于濒死状态动物以及动物表现出剧烈的疼痛或持续严重痛苦的病症时给予人道处死。当动物因人道原因处死或被发现死亡时，应尽可能准确地记录死亡时间。

5.5.2 观察期限一般不超过 14 d，但观察时间并非一成不变，要视动物中毒反应的严重程度、症状出现快慢和恢复期长短而定。若有延迟死亡迹象，可延长观察时间。

观察期内存活动物每周称重，观察期结束存活动物应称重，处死后进行尸检。

5.5.3 对全部动物进行大体解剖学检查，并记录全部大体病理改变。对存活 24 h 和 24 h 以上动物并存在大体病理改变的器官可进行病理组织学检查。

5.6 试验数据

需要提供个体动物的数据。所有数据应以列表形式汇总，内容包括在每个染毒剂量试验所用的动物数量、出现毒性症状的动物总数，试验过程中死亡的或人道处死的动物数量，个体动物的死亡时间，以及毒性表现及其可逆性的时间过程，尸检结果。同时提供选择起始剂量和剂量级数的基本理由和所有支持数据。

5.6.1 主试验中 LD_{50} 的计算

5.6.1.1 除了 5.6.1.2 描述的特殊情况以外，采用最大似然法对 LD_{50} 的进行计算。所有死亡动物，包括直接死亡、延迟死亡或人道处死，都应纳入最大似然法分析中。似然函数见式（1）。

$$L=L_1 L_2 \dots L_n \text{-----} (1)$$

$$\text{如果第 } i \text{ 个动物存活, } L_i=1-F(Z_i) \text{或-----} (2)$$

$$\text{如果第 } i \text{ 个动物死亡, } L_i=F(Z_i) \text{-----} (3)$$

式中：

L ——试验结果的似然值；

n ——试验动物的总数；

F ——标准正态累积分布函数（标准正态分布的概率密度函数）；

Z_i —— $(\log(d_i) - \mu) / \sigma$ ；

d_i ——第 i 个动物的染毒剂量。

μ 和 σ 为给定， σ 为标准偏差。

真实 LD_{50} 的估算值由似然值 L 取最大值时的 μ 计算得到。

σ 的估计值一般为 0.5。

5.6.1.2 在某些情况下，不能进行统计计算或有可能得出错误结果。出现以下情况时可以通过特殊方法确定 LD_{50} 的估算值：

a) 如果试验基于规则 a)（即重复进行上限剂量试验）停止，或基于限值剂量停止试验，则 LD_{50} 高于限值剂量。分类也在此基础上完成。

b) 如果所有死亡动物的染毒剂量比所有存活动物的高（或者所有存活动物的染毒剂量比所有死亡动物的高，虽然这几乎是不可能的），则 LD_{50} 介于存活动物染毒剂量和死亡动物染毒剂量之间。这时试验结果不能进一步给出准确 LD_{50} 的信息。但基于给定的 σ 值，也可以计算出最大似然 LD_{50} 。

c) 如果只有一个染毒剂量同时出现存活和死亡动物，其他死亡动物都出现在更高的染毒剂量而其他存活动物都出现在更低的染毒剂量，或者出现相反的情况，则 LD_{50} 等于那个染毒剂量。如果受试物是一个与之非常接近的相关物质，应该使用一个较小染毒剂量级数进行试验。

除上述情况外，用最大似然法计算 LD_{50} 。

5.6.1.3 最大似然计算可以采用 SAS、BMDP 等统计软件。得到的结果是 $\log LD_{50}$ 估算值及其标准误差。

5.6.1.4 似然比停止规则 c) 是基于试验程序中的三次测量，分别是对应于不同 μ 值的似然性结果。当第 6 只名义受试动物不能满足停止规则 (a) 或 (b) 时，对之后的每个动物试验进行计算。如果符合标准规则，试验停止，可用最大似然法计算出 LD_{50} 。

5.6.2 置信区间的估计

5.6.2.1 根据主试验和 LD_{50} 值的计算，可能得出 LD_{50} 的置信区间。置信区间反应了主试验的可靠性和实用性。置信区间宽表明 LD_{50} 计算值有较多的不确定性。 LD_{50} 计算值可靠性低，其实用性也有限。置信区间窄表明 LD_{50} 计算值不确定性小。 LD_{50} 计算值可靠性高，其实用性也好。这就意味着，此时如果重复进行主试验，那么新的 LD_{50} 计算值应与原来的 LD_{50} 计算值接近，并且这两个 LD_{50} 计算值都接近真实 LD_{50} 。

5.6.2.2 根据主试验结果，可得出真实 LD_{50} 两种类型置信区间中的一种。

(1) 当至少有三个染毒剂量，且中间剂量染毒至少有一只动物存活和一只动物死亡，此时，可以用轮廓似然 (profile-likelihood) 的计算程序得到一个置信区间，该区间用于描述在 95% 的情况下包含真实 LD_{50} 值。然而，由于希望使用少量的动物进行试验，实际可信度水平一般不高。使用随机停止规则改善了应对条件变化的能力，但也会导致报告的置信水平与真实置信水平存在稍许差别。

(2) 如果在某一染毒剂量或低于该剂量的所有的动物存活，且所有的动物在相邻的高一级染毒剂量时死亡，则计算的置信区间下限为所有动物存活时的最高染毒剂量，上限为所有动物死亡时的染毒剂量。这个区间标注为“近似”，即这个区间的准确置信水平不能明确。

但由于这种类型的反应仅发生在剂量反应曲线较陡时，在大多数情况下，真实 LD₅₀ 位于计算的置信区间内或非常接近。这个区间相对较窄，且在大多数的实际使用中比较准确。

5.6.2.3 在某些情况下，报告的置信区间为无穷大，此时它的下限为零，或上限为无穷大，或两者兼而有之。此类置信区间可见于所有动物死亡或所有动物存活的情况。

5.7 试验结果评价

评价试验结果时，应将 LD₅₀ 与观察到的毒性效应和尸检所见相结合考虑，LD₅₀ 值是受试物毒性分级和标签标识以及判定受试物经消化道摄入后引起动物死亡可能性大小的依据。引用 LD₅₀ 值时一定要注明所用实验动物的种属、性别、染毒途径、观察期限等。评价应包括动物接触受试物与动物异常表现（包括行为和临床改变、大体损伤、体重变化、致死效应及其他毒性作用）的发生率和严重程度之间的关系。

毒性分级见表 2。

如无特殊要求，急性经口毒性 LD₅₀ 值的大于 2000 mg/kg 时可不必进一步试验。

6 试验结果的解释

通过急性经口毒性试验和 LD₅₀ 的测定可评价受试物的毒性。其结果外推到人类的有效性很有限。

表 1 急性经口毒性试验 上下增减剂量法剂量设置（斜率为整数 1~8 时）

斜率=	1	2	3	4	5	6	7	8
	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*
							0.24	0.23
					0.275	0.26		
				0.31			0.34	0.31
			0.375			0.375		
								0.41
					0.44		0.47	
		0.55		0.55		0.55		0.55
					0.69		0.65	
								0.73
			0.81			0.82		
				0.99			0.91	0.97
					1.09	1.2		
							1.26	1.29
	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75
							2.4	2.3
					2.75	2.6		
				3.1			3.4	3.1
			3.75			3.75		
					4.4			4.1
							4.7	
		5.5		5.5		5.5		5.5

[illegible]

* 如果需要较低的剂量，将序列延续至较低的剂量

表 2 大鼠经口毒性分级

LD ₅₀ (mg/kg)	毒性分级
LD ₅₀ ≤5	第 1 级
5<LD ₅₀ ≤50	第 2 级
50<LD ₅₀ ≤300	第 3 级
300<LD ₅₀ ≤2000	第 4 级
2000<LD ₅₀ ≤5000	第 5 级