

指导原则编号:

【	H	】	G	P	T	1	-	1
---	---	---	---	---	---	---	---	---

化学药物急性毒性试验技术指导原则

二〇〇五年三月

目 录

一、概述	1
二、基本原则	1
三、研究内容	2
四、数据分析及评价	4
五、名词解释	5
六、参考文献	6
七、附录	7
八、著者	16

化学药物急性毒性试验技术指导原则

一、概述

动物急性毒性试验（Acute toxicity test, Single dose toxicity test），研究动物一次或24小时内多次给予受试物后，一定时间内所产生的毒性反应。

拟用于人体的药物通常需要进行动物急性毒性试验^[1]。急性毒性试验处在药物毒理研究的早期阶段，对阐明药物的毒性作用和了解其毒性靶器官具有重要意义。急性毒性试验所获得的信息对长期毒性试验剂量的设计和某些药物I期临床试验起始剂量的选择具有重要参考价值，并能提供一些与人类药物过量急性中毒相关的信息^[1, 2]。

本技术指导原则适用于化学药物的动物急性毒性试验。

本指导原则重点阐述急性毒性试验中动物、剂量、给药途径选择的基本原则；对所获得数据的分析及评价要求；以及其中所涉及的科学原理与制定本指导原则的背景。

二、基本原则

（一）实验管理

药物的急性毒性试验属于安全性评价研究，根据《中华人民共和国药品管理法》的规定，必须执行《药物非临床研究质量管理规范》。

（二）具体问题具体分析

急性毒性试验的设计，应该在对受试物认知的基础上，遵循“具体问题具体分析”的原则。应根据化合物的结构特点、理化性质、适应症特点和试验目的等选择合理的试验方法，设计适宜的试验方案，并结合其它药理毒理研究信息对试验结果进行全面的评价。

（三）随机、对照、重复

急性毒性试验应符合一般动物试验的基本原则，即随机、对照和重复。

三、研究内容

（一）受试物

急性毒性试验的受试物应采用制备工艺稳定、符合临床试验用质量标准规定的样品，并注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等，并附有研制单位的自检报告。所用辅料、溶媒等应标明批号、规格和生产厂家，并符合试验要求。

（二）动物^[1~4]

1、种属：不同种属的动物各有其特点，对同一药物的反应会有所不同。啮齿类动物和非啮齿类动物急性毒性试验所得的结果，无论是质还是量上均会存在差别。从充分暴露受试物毒性的角度考虑，应从啮齿类动物和非啮齿类动物中获得较为充分的安全性信息。因此，急性毒性试验应采用至少两种哺乳动物。一般应选用一种啮齿类动物加一种非啮齿类动物进行急性毒性试验。若未采用非啮齿类动物进行急性毒性试验，应阐明其合理性。

2、性别：通常采用两种性别的动物进行试验，雌雄各半。若采用单性别动物进行试验，则应阐明其合理性。

3、年龄：通常采用健康成年动物进行试验。如果受试物拟用于儿童或可能用于儿童，建议必要时采用幼年动物进行试验。

4、动物数：对于所用的动物数，应根据动物的种属和研究目的来确定。动物数应符合试验方法及其结果分析评价的需要。应在获得尽量多信息的前提下，使用尽量少的动物数。

5、体重：动物初始体重不应超过或低于平均体重的 20%。

可根据试验目的及受试物的特点，确定实验动物的性别和年龄等。动物应符合国家有关规定的等级要求，来源、品系、遗传背景清楚，并具有实验动物质量合格证。

（三）给药途径^[1~4]

给药途径不同，受试物的吸收速度、吸收率和暴露量会有所不同，因此需要采用不同给药途径进行急性毒性试验。另外，通过对不同途径给药所得结果进行比较，可以获得一些初步的生物利用度信息。通常，给药途径应至少包括临床拟用途径和一种能使原形药物较完全进入循环的途径（如静脉注射）。如果临床拟用途径为静脉给药，则仅此一种途径即可。

经口给药前动物一般应进行一段时间（通常一夜）的禁食，不禁水。因为胃内容物会影响受试物的给药容量，而啮齿类动物禁食时间的长短会影响到药物代谢酶的活性和受试物肠道内吸收，从而影响毒性的暴露。

（四）给药剂量水平^[1~4]

急性毒性试验的重点在于观察动物出现的毒性反应。可选择适当的方法进行急性毒性研究，对于非啮齿类动物给予出现明显毒性的剂量即可，给药剂量没有必要达到致死水平。

总体上，给药剂量应从未见毒性剂量到出现严重毒性（危及生命的）剂量，同时设空白和/或溶媒（辅料）对照组。

不同动物和给药途径下的最大给药容量可参考相关文献及实际情况来确定。

（五）观察时间及指标^[1,2,4,5]

给药后，一般连续观察至少 14 天，观察的间隔和频率应适当，以便能观察到毒性反应出现的时间及其恢复时间、动物死亡时间等。观察的指标包括一般指标（如动物外观、行为、对刺激的反应、分泌物、排泄物等）、动物死亡情况（死亡时间、濒死前反应等）、动物体重变化（给药前、试验结束处死动物前各称重一次，观察期间可多次称重）等。记录所有的死亡情况、出现的症状，以及症状起始的时间、严重程度、持续时间等。

（六）病理学检查^[1,2,4,5]

所有的试验动物均应进行大体解剖，包括试验过程中因濒死而处死的动物、死亡的动物以及试验结束时仍存活的动物。任何组织器官出现体积、颜色、质地等改变时，均应记录并进行组织病理学检查。

四、数据分析及评价

（一）结果处理和分析

1、根据所观察到的各种反应出现的时间、严重程度、持续时间等，分析各种反应在不同剂量时的发生率、严重程度。根据观察结果归纳分析，判断每种反应的剂量—反应及时间—反应关系。

2、判断出现的各种反应可能涉及的组织、器官或系统（参考附录一^[6]）等。

3、根据大体解剖中肉眼可见的病变和组织病理学检查的结果，初步判断可能的毒性靶器官。组织病理学检查应附有病理学检查负责人签名和药品注册申请人盖章的报告及有病变组织的病理照片。

4、根据不同剂量组各种毒性反应及发生率、动物死亡情况等，确定动物对受试物的无毒性反应剂量和严重毒性反应剂量。为此，建议采用适当

的试验方法（参见附录二）来测定最大无毒性反应剂量或最小毒性反应剂量，最大耐受剂量或近似致死量或最小致死剂量等，以初步判断受试物的安全范围。

5、对于需要测定LD₅₀的药物，应采用合理的统计学方法对其进行求算。

6、说明所使用的计算方法和统计学方法，提供所选用方法合理性的依据。

（二）综合评价

根据各种反应在不同剂量下出现的时间、发生率、剂量-反应关系、不同种属动物及实验室的历史背景数据、病理学检查的结果以及同类药物的特点，判断所出现的反应与药物作用的相关性。总结受试物的安全范围、出现毒性的严重程度及可恢复性；根据毒性可能涉及的部位，综合大体解剖和组织病理学检查的结果，初步判断毒性作用靶器官。

急性毒性试验的结果可作为后续毒理研究剂量选择的参考，也可提示一些后续毒性研究需要重点观察的指标。此外，根据不同途径给药时动物的反应情况，初步判断受试物的生物利用度，为剂型开发提供参考。

五、名词解释

最大无毒性反应剂量：即未见毒性反应剂量（No observed adverse effect level, NOAEL），指受试物在一定时间内，按一定方式与机体接触，用灵敏的现代检测方法和观察指标未发现损害作用的最高剂量。

最小毒性反应剂量：动物出现毒性反应的最小剂量。

最大耐受量（Maximal tolerance dose, MTD）：不引起受试动物死亡的最高剂量。

最小致死剂量 (Minimal lethal dose, MLD) : 引起个别受试动物出现死亡的剂量。

半数致死量 (Median lethal dose, LD₅₀) : 在一定试验条件下引起 50%受试动物死亡的剂量。该值是经统计学处理所得的结果。

六、参考文献

1、CDER, FDA. Guidance for industry: single dose acute toxicity testing for pharmaceuticals (Final).1996

2、医药品非临床试验研究会.单回投于毒性试验.见: 日本临床前研究指导原则解说. 东京: 药事日报社, 2002: 11-14

3、European Union. Single dose toxicity. European Union Medicinal Products for Human Use Guidelines (3BS1a), 1987

4、Cordier A. Single dose toxicity: Industry perspectives. In: P.F. D' Arcy and D.W.G. Harron edited, Proceedings of the First International Conference on Harmonization. Brussels: 1991, 189-191

5、Outcome - Single dose toxicity. In: P.F. D' Arcy and D.W.G. Harron edited, Proceedings of the First International Conference on Harmonization. Brussels: 1991, 184

6、Louis C D, Hayes A W. Acute toxicity and eye irritancy. In: Hays A W edited, Principles and methods of toxicology. Fourth edition, 2001: 853-916

7、OECD. Acute oral toxicity-fixed dose procedure. OECD guideline for testing of chemicals. 2001

8、British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicology. Human Toxicol, 1984 (3): 85-92

9、OECD. Guideline 425: Acute Oral Toxicity-Up and Down Procedure. OECD Guidelines for testing of chemicals. 2001

10、EPA. EPA OPPTS Harmonized Test guideline 870.1100 Acute Oral Toxicity.1998

七、附录

(一) 急性毒性试验的一般观察和指征^[6]

以下列出了一些常见的观察指征及其可能涉及的组织、器官和系统。该表格仅作为结果分析评价的参考，其他科学、合理的分析均是可以接受的；急性毒性试验中，可能需要对该表格中列出的全部或部分指征进行观察。

观察		指 征	可能涉及的组织、器官、系统
I. 鼻孔呼吸阻塞，呼吸频率和深度改变，体表颜色改变。	A.	呼吸困难：呼吸困难或费力，喘息，通常呼吸频率减慢	
		1. 腹式呼吸：隔膜呼吸，吸气时腹部明显塌陷	呼吸中枢，肋间肌麻痹，胆碱能神经麻痹
		2. 喘息：用力深吸气，有明显的吸气声	呼吸中枢，肺水肿，呼吸道分泌物蓄积，胆碱功能增强
	B.	呼吸暂停：用力呼吸后出现短暂的呼吸停止	呼吸中枢，肺心功能不全
	C.	紫绀：尾部、口和足垫呈现蓝紫色	肺心功能不足，肺水肿
	D.	呼吸急促：呼吸快而浅	呼吸中枢刺激，肺心功能不全
	E.	鼻分泌物：红色或无色	肺水肿，出血
II. 运动功能：运动频率和特	A.	自发活动、探究、梳理毛发、运动增加或减少	躯体运动，CNS

观察		指 征	可能涉及的组织、器官、系统
点的改变。	B.	困倦：动物出现昏睡，但易警醒而恢复正常活动	睡眠中枢
	C.	正常反射消失，翻正反射消失	CNS，感官，神经肌肉
	D.	麻醉：正常反射和疼痛反射消失	CNS，感官
	E.	僵住：保持原姿势不变	CNS，感官，神经肌肉，自主神经
	F.	运动失调：动物活动时运动不协调，但无痉挛、局部麻痹或僵直	CNS，感官，自主神经
	G.	异常运动：痉挛，足尖步态，踏步、忙碌、低伏	CNS，感官，神经肌肉
	H.	俯卧：不移动，腹部贴地	CNS，感官，神经肌肉
	I.	震颤：包括四肢和全身的颤抖和震颤	神经肌肉，CNS
	J.	肌束震颤：背部、肩部、后肢和足部肌肉的运动	神经肌肉，CNS，自主神经
	III. 惊厥(抽搐)：随意肌明显的无意识收缩或惊厥性收缩	A.	阵挛性抽搐：肌肉收缩和松弛交替性痉挛
B.		强直性抽搐：肌肉持续性收缩，后肢僵硬性伸展	CNS，呼吸衰竭，神经肌肉，自主神经
C.		强直性-阵挛性抽搐：两种类型抽搐交替出现	CNS，呼吸衰竭，神经肌肉，自主神经
D.		昏厥性抽搐：通常是阵挛性抽搐并伴有喘息和紫绀	CNS，呼吸衰竭，神经肌肉，自主神经
E.		角弓反张：僵直性发作，背部弓起，头抬起向后	CNS，呼吸衰竭，神经肌肉，自主神经
IV. 反射	A.	角膜眼睑闭合：接触角膜导致眼睑闭合	感官，神经肌肉
	B.	基本反射：轻轻敲击外耳内侧，导致外耳扭动	感官，神经肌肉
	C.	正位反射：翻正反射	CNS，感官，神经肌肉
	D.	牵张反射：后肢从某一表面边缘掉下时收回的能力	感官，神经肌肉
	E.	对光反射(瞳孔反射)；见光瞳孔收缩	感官，神经肌肉，自主神经
	F.	惊跳反射：对外部刺激(如触摸、噪声)的反应	感官，神经肌肉
V. 眼检指征	A.	流泪：眼泪过多，泪液清澈或有色	自主神经
	B.	缩瞳：无论有无光线，瞳孔缩小	自主神经
	C.	散瞳：无论有无光线，瞳孔扩大	自主神经
	D.	眼球突出：眼眶内眼球异常突出	自主神经

观察		指 征	可能涉及的组织、器官、系统
	E.	上睑下垂：上睑下垂，刺激后动物不能恢复正常	自主神经
	F.	血泪：眼泪呈红色	自主神经，出血，感染
	G.	上睑松弛	自主神经
	H.	结膜浑浊，虹膜炎，结膜炎	眼睛刺激（激惹）
VI. 心血管指征	A.	心动过缓：心率减慢	自主神经，肺心功能低下
	B.	心动过速：心率减慢	自主神经，肺心功能低下
	C.	血管扩张：皮肤、尾、舌、耳、足垫、结膜、阴囊发红，体热	自主神经、CNS、心输出量增加，环境温度高
	D.	血管收缩：皮肤苍白，体凉	自主神经、CNS、心输出量降低，环境温度低
	E.	心律不齐：心律异常	CNS、自主神经、肺心功能低下，心肌损伤
VII. 唾液分泌	A.	唾液分泌过多：口周毛潮湿	自主神经
VIII. 竖毛	A.	毛囊竖毛肌收缩	自主神经
IX. 痛觉丧失	A.	对痛觉刺激(如热板)反应性降低	感官，CNS
X. 肌张力	A.	张力降低：肌张力普遍降低	自主神经
	B.	张力增高：肌张力普遍增高	自主神经
XI. 胃肠指征			
排便(粪)	A.	干硬固体，干燥，量少	自主神经，便秘，胃肠动力
	B.	体液丢失，水样便	自主神经，腹泻，胃肠动力
呕吐	A.	呕吐或干呕	感官，CNS，自主神经(大鼠无呕吐)
多尿	A.	红色尿	肾脏损伤
	B.	尿失禁	自主感官
XII. 皮肤	A.	水肿：液体充盈组织所致肿胀	刺激性，肾脏功能衰竭，组织损伤，长时间静止不动
	B.	红斑：皮肤发红	刺激性，炎症，过敏

(二) 急性毒性试验常用试验方法

由于受试物的化学结构、活性成分的含量各异，毒性反应的强弱也不同，研究者应根据受试物的特点，选择以下方法或国内外公认的试验方法。

本指导原则简单介绍下列常用的试验方法，详细的实验技术细节可参考相应的文献。

1、近似致死剂量法

该方法主要用于非啮齿类的动物试验。试验方法如下：

一般采用 6 只健康的 Beagle 犬或猴。犬的年龄一般为 4-6 月龄，猴的年龄一般为 2-3 岁，选用其他动物时应说明理由。

根据小动物的毒性试验结果、受试物的化学结构和其它有关资料，估计可能引起毒性和死亡的剂量范围。按 50%递增法，设计出含数个剂量的剂量序列表。

根据估计，由剂量序列表中找出可能的致死剂量范围，在此范围内，每间隔一个剂量给一只动物，测出最低致死剂量和最高非致死剂量，然后用二者之间的剂量给一只动物。如果该剂量下动物未发生死亡，则该剂量与最低致死剂量之间的范围为近似致死剂量范围；如果该剂量下动物死亡，则该剂量与最高非致死剂量间的范围为近似致死剂量范围。

2、最大给药量法

对于某些低毒的受试物可采用该方法。在合理的最大给药浓度及给药容量的前提下，以允许的最大剂量单次给药或 24 小时内多次给药(剂量一般不超过 5g/kg 体重)，观察动物出现的反应。一般使用 10-20 只动物，连续观察 14 天。

3、固定剂量法 (Fixed-dose procedure) ^[7]

该方法最初于 1984 年由英国毒理学会提出^[8]，不以死亡作为观察终点，而是以明显的毒性体征作为终点进行评价。

试验选择 5、50、500 和 2000mg/kg 四个固定剂量进行试验，特殊情况下可增加 5000 mg/kg 剂量。实验动物首选大鼠，给药前禁食 6-12 小时，给受试物后再禁食 3-4 小时。采用一次给药的方式进行。如无资料证明雄性动物对受药试物更敏感，首先用雌性动物进行预试。根据受试物的有关资料，从上述四个剂量中选择一个作为初始剂量；若无有关资料可作参考时，可用 500mg/kg 作为初始剂量进行预试，如无毒性反应，则用 2000 mg/kg 进行预试，此剂量如无死亡发生即可结束预试。如初始剂量出现严重的毒性反应，即降低一个档次的剂量进行预试，如此时动物存活，就在此两个固定剂量之间选择一个中间剂量试验。每个剂量给一只动物，预试一般不超过 5 只动物。每个剂量试验之间至少应间隔 24 小时。给受试物后的观察期至少 7 天，如动物的毒性反应到第 7 天仍然存在，尚应继续观察 7 天。

在上述预试的基础上进行正式试验。每个剂量至少用 10 只动物，雌雄各半。根据预试的结果，在上述四种剂量中选择一个可能产生明显毒性但又不引起死亡的剂量进行试验，如预试结果表明，5.0mg/kg 引起死亡，则降低一个剂量档次进行试验。

给受试物后至少应观察 2 周，根据毒性反应的具体特点可适当延长。对每只动物均应仔细观察并详细记录各种毒性反应出现和消失的时间。给受试物当天至少应观察记录两次，以后可每天一次。观察记录的内容包括皮肤、粘膜、毛色、眼睛、呼吸、循环、自主活动及中枢神经系统行为表现等。动物死亡时间的记录要准确。给予受试物前、后各 1 周、动物死亡及试验结束时应称取动物的体重。所有动物包括死亡或处死的动物均应进

行尸检，尸检异常的器官应作组织病理学检查。固定剂量试验法所获得的结果，参考下表标准进行评价。

固定剂量法试验结果的评价

剂 量 (mg/kg)	试 验 结 果		
	存活数<100%	100%存活毒性表现明显	100%存活无明显中毒表现
5	高 毒 (Very toxic) (LD ₅₀ ≤ 25mg/kg)	有毒 (Toxic) (LD ₅₀ 25-200mg/kg)	用 50mg/kg 试验
50	有毒或高毒，用 5mg/kg 进行试验	有害 (Harmful) (LD ₅₀ 200-2000mg/kg)	用 500mg/kg 试验
500	有毒或有害，用 50mg/kg 试验	LD ₅₀ > 2000mg/kg	用 2000mg/kg 试验
2000	用 500mg/kg 试验	该化合物无严重急性中毒的危险性	

4、上下法（阶梯法，序贯法，Up and down method）^[9,10]

该方法由Dixon和Mood首次提出，1985年Bruce又进行了改进，目前是OECD和EPA推荐的方法之一。其最大的特点是节省实验动物，同时，不但可以进行毒性表现的观察，还可以估算LD₅₀及其可信限，适合于能引起动物快速死亡的药物。该方法分为限度试验和主试验。限度试验主要用于有资料提示受试物毒性可能较小的情况。可以从与受试物相关的化合物或相似的混合物或产品中获得相关毒性资料。在相关毒性资料很少或没有时，或预期受试物有毒性时，应进行主试验。

限度试验：是最多用5只动物进行的序列试验。试验剂量为2000 mg/kg，特殊情况下也可使用5000 mg/kg。

2000 mg/kg剂量水平的限度试验：将受试物给予1只动物。如果该动物死亡，则进行主试验；如果该动物存活，依次将受试物给予另外4只动物，

动物总数为 5 只。如果 1 只动物在试验后期死亡，而其他动物存活，应停止对其他动物给药，对所有动物进行观察，是否在相似的观察期间也发生死亡。后期死亡的动物应与其他死亡的动物同样计数，对结果进行如下评价：有 3 只或 3 只以上动物死亡时， LD_{50} 小于 2000mg/kg；有 3 只或 3 只以上动物存活时， LD_{50} 大于 2000 mg/kg；如果有 3 只动物死亡，则进行主试验。

5000mg/kg 剂量水平的限度试验：特殊情况下，可考虑使用 5000 mg/kg 的剂量。将受试物给予 1 只动物。如果该动物死亡，则进行主试验；如果该动物存活，将受试物给予另外 2 只动物。如果这 2 只动物都存活，则 LD_{50} 大于 5000 mg/kg，停止试验（即不再对其他动物给药，观察 14 天）。如果这 2 只动物中有 1 只死亡或者 2 只均死亡，将受试物给予另外 2 只动物，一次 1 只。如果 1 只动物在试验后期死亡，而其他动物存活，应停止对其他动物给药，对所有动物进行观察，是否在相似的观察期间也发生死亡。后期死亡的动物应与其他死亡的动物同样计数，对结果进行如下评价。有 3 只或 3 只以上动物死亡时， LD_{50} 小于 5000 mg/kg；有 3 只或 3 只以上动物存活时， LD_{50} 大于 5000 mg/kg。

主试验：由一个设定的给药程序组成，在此程序中，每次给药 1 只动物，间隔至少 48 小时。给药间隔取决于毒性出现时间、持续时间和毒性的严重程度。在确信前一只动物给药后能存活之前，应推迟按下一剂量给药。时间间隔可以适当调整，但使用单一时间间隔时，试验会更简便。

第一只动物的给药剂量低于 LD_{50} 的最接近的估计值。如果该动物存活，第二只动物给予高一级剂量；如果第一只动物死亡或出现濒死状态，第二

只动物给予低一级剂量。剂量级数因子应选定为 $1/(\text{剂量-反应曲线斜率估计值})$ 的反对数（对应于斜率 2 的级数因子为 3.2），并应在整个试验过程中保持不变。当没有受试物的斜率的有关资料时，使用 3.2 为剂量级数因子。使用默认级数因子时，剂量应从以下序列中选择：1.75、5.5、17.5、55、175、550、2000 mg/kg（或有特殊要求时 1.75、5.5、17.5、55、175、550、1750、5000 mg/kg）。如果没有受试物的致死估计值，应该从 175 mg/kg 开始。如果预期动物对该受试物的耐受程度变化很大（即，估计斜率小于 2.0），那么开始试验前应考虑增加剂量级数因子超过按对数剂量计算的默认值 0.5（即，级数因子为 3.2）。同样，对于已知斜率很陡的受试物，应选择小于默认值的级数因子。

在决定是否及如何对下一只动物给药之前，每只动物都应认真观察达 48 小时。当满足停止试验标准之一时，停止给药，同时根据终止时所有动物的状态计算 LD_{50} 估计值和可信区间。用最大可能性法计算 LD_{50} 值（美国 EPA 开发了相应的计算软件，AOT425StatPgm）。

当满足下列停止试验标准之一时，停止试验：

- (a) 连续 3 只动物存活；
- (b) 任意连续 6 只试验动物中有 5 只连续发生存活/死亡转换；
- (c) 第一只动物发生转换之后至少有 4 只动物进入试验，并且其 LD_{50} 估算值的范围超出临界值（2.5 倍）。（首次转换的第 4 只动物之后，对每次给药进行计算）。

对于LD₅₀和斜率的各种组合，在动物发生死亡/存活转换之后，用4~6只动物即可满足停止试验标准（C）。但在一些情况下，化合物的剂量-反应曲线的斜率较小，可能另外还需要增加动物（总共可达15只）。

以上为该试验方法的概述，详细的试验方法可参见相应参考文献^[11]。

用于该方法的LD₅₀计算软件可从以下地址免费下载：

<http://www.epa.gov/oppfead1/harmonization/>

5、累积剂量设计法（金字塔法，Pyramiding dosage design）

在非啮齿类动物进行急性毒性试验可采用此方法。经典的试验设计需要8只动物，分对照组和给药组，每组4只动物，雌雄各2只。

剂量的设计可以是1、3、10、30、100、300、1000、3000 mg/kg，也可以采用10、20、40、80、160、320、640、1280 mg/kg，通常隔日给予下一个高剂量，剂量逐渐加大，直到出现动物死亡时或达到剂量上限时为止。

当没有动物死亡时，MLD（最小致死剂量）和LD₅₀大于最高剂量或受限制剂量。当在某一剂量所有动物均出现死亡时，MLD和LD₅₀应在最后两个剂量之间。当在某一剂量部分动物出现死亡，部分死亡出现在后继的下一个高剂量，此时，MLD位于首次出现死亡的剂量和前一低剂量之间，LD₅₀则应在首次出现动物死亡的剂量和所有动物均死亡的剂量之间。假如没有动物死亡发生，常常以最高剂量给予动物5-7天，以确定后续的重复给药试验中高剂量的选择。

6、半数致死量法

是一种经典的急性毒性试验方法，试验结果经统计学处理可获得受试物的LD₅₀。

八、著者

《化学药物急性毒性试验技术指导原则》课题项目组