

第六章 食品中化学物质的基础毒性评价

毒理学是一门实验科学。本章介绍最基本的毒理学试验,包括系统毒性和局部毒性的研究。基础毒性是与特殊毒性相对应的,特殊毒性主要是指致癌作用、致突变作用、致畸和生殖毒性等。基础毒性研究是化学品安全性评价和危险性评价的重要组成部分。另一方面,对外源化学物系统毒性研究可能发现其毒作用的靶器官,为进一步的靶器官毒理学研究和中毒机制研究提供线索。

第一节 急性毒性试验

急性毒性试验是毒理学研究中最基础的工作,是我们了解外源化学物对机体产生的急性毒性的根本依据。1927年Trevan引入了半数致死量(LD₅₀)的概念来评价急性毒性,此后,该指标得到广泛应用,并成为急性毒性的主要指标。化学物的急性毒性资料对于安全性评价及化学物管理方面非常重要。对急性毒性试验程序国际上和我国已有一些法规。以下就试验程序的基本原则和进展作一介绍。

一、急性毒性和急性毒性试验的目的

急性毒性是指实验动物一次接触或24小时内多次接触某一化学物所引起的毒效应,甚至死亡。对于上述定义中的“一次”接触在经呼吸道与皮肤染毒时,指在一个规定的期间内使实验动物持续接触化学物的过程。而“多次”的概念是指当外源化学物毒性很低时,即使一次给予实验动物最大染毒容量还观察不到毒性作用,同时该容量还未达到规定的限制剂量时,便需要在24小时内多次染毒,从而达到规定的限制剂量。

急性毒性试验的目的:

1. 评价化学物对机体的急性毒性的大小、毒效应的特征和剂量-反应(效应)关系,并根据LD₅₀值进行急性毒性分级。
2. 为亚慢性、慢性毒性研究及其他毒理试验接触剂量的设计和观察指标的选择提供依据。
3. 为毒作用机制研究提供线索。

通过外源化学物的急性毒性试验,可以得到一系列的毒性参数,包括:①绝对致死剂量或浓度(LD₁₀₀或LC₁₀₀);②半数致死剂量或浓度(LD₅₀或LC₅₀);③最小致死剂量或浓度(MLD, LD₀₁或MLC, LC₀₁);④最大耐受剂量或浓度(MTD, LD₀或MTC, LC₀),或称为最大非致死剂量(MNLD)。以上4种参数是外源化学物急性毒性上限参数,以死亡为终点。此外,还可以得到急性毒性下限参数,即:⑤急性毒性LOAEL(观察到有害作用的最低剂量);⑥急性毒性NOAEL(未观察到有害作用的剂量)。这两个参数则是以非致死性急性毒作用为终点。因此,急性毒性试验可以分为两类。一类是以死亡为终点,以检测受试物急性毒性上限指标为目的的试验,这类试验主要是求得受试物的LD₅₀值。另一类急性毒性试验检测非致死性指标。

二、经典急性致死性毒性试验

OECD(1987)关于经典急性毒性试验规定如下。实验动物首选大鼠。应设足够的剂量组,至少3组,组间有适当的剂量间距,产生一系列毒性和死亡率,以得到剂量-反应关系和求得LD₅₀。每组至少同性别5只动物,如用雌性动物,应未产和未孕。限量试验剂量为2000mg/kg体重,用雌雄各5只动物进行试验。观察期14天,临床观察每天至少一次,观察皮肤、被毛、眼睛和粘膜改变、呼吸、循环、自主和中枢神经系统、四肢活动和行为方式的变化,特别要注意有无震颤、惊厥、腹泻、嗜睡、昏迷等现象。准确记录死亡时间。于染毒前、染毒后每周和死亡时测定体重。所有的动物均应进行大体尸体解剖,并记录观察到的全部病变,存活24小时以上的动物必要时进行组织病理学检查。可用任何一种公认的统计学方法计算LD₅₀的

值及95%的可信限范围,如Bliss法, Litchfield和Wilcoxon法, Finney法, Weil法, Thompson法, Miller和Tainter法等。

有关经典急性致死性毒性试验的要点如下:

1. 实验动物选择和处置 试验要求健康成年实验动物,一般是在小鼠、大鼠等动物中测半数致死量,并在狗中观察毒性反应。一般啮齿类动物年龄与体重相关,故可以用体重表示动物年龄。急性毒性试验一般用大鼠180~240g,小鼠18~25g,家兔2~2.5kg,豚鼠200~250g,狗10~15kg。不同品系的同种动物年龄相同会出现体重不同,以小鼠为例,纯系小鼠如C₅₇BL / 6、BALB/C体重较小,而同年龄的昆明种小鼠则体重较大。试验动物体重变异范围不应超过平均体重的20%。所用实验动物应当是雌、雄各半,雌性实验动物要求是未经交配和受孕的。如果发现受试化学物急性毒性有性别差异时,应分别求出雌性与雄性动物的LD₅₀值。如果试验是为致畸试验作剂量准备,也可仅做雌性动物的LD₅₀试验。

实验动物应进行检疫,检疫期一般为5~7天,剔除异常的动物。检疫期与实验期间雌、雄动物必须分笼饲养。实验动物根据实验设计的方法随机分组。染毒途径应模拟人可能的接触途径。经口灌胃染毒,要求试验前要对动物禁食。大鼠应过夜禁食,小鼠应禁食4小时。

大动物则在每日上午喂食前给以受试化学物。染毒后继续禁食2~4小时。但在禁食时要保障饮水的供应。

2. 实验设计 在进行剂量设计之前,首先要了解受试外源化学物的结构式、分子量、常温常压下的状态(液态、固态或气态)、生产批号、纯度、杂质成分与含量、溶解度、挥发度、pH值(可测时)等等。然后根据该受试物有关的测试规范要求,决定实验设计。对于一个新的受试化学物,我们可以先查阅文献找到与受试化学物的化学结构与理化性质相近的化学物毒性资料,取与本实验相同动物物种或品系,相同染毒途径的LD₅₀值作为参考值,选择剂量系列。例如,要测定氯乙酸的大鼠经口LD₅₀,查文献可知乙醇大鼠经口LD₅₀为10.8g / kg体重,乙酸为3.4g / kg体重,氯乙醇为71mg/kg体重。故氯取代可增强毒性,推测氯乙酸的大鼠经口LD₅₀应与氯乙醇相近,实测结果为78mg/kg体重。

剂量选择是否恰当是急性毒性试验能否成功的基础。就啮齿类动物而言,总的原则是先少量动物,以较大的剂量间隔(一般是按几何级数)给药,找出10%~90%(或0%~100%)的致死剂量范围,然后在这个剂量范围内以合适的间距设几个剂量组。在利用不同的方法计算化学物LD₅₀时,实验设计中对剂量设计和动物数的要求不同。急性致死性毒性试验可以不设阴性对照组。

3. 观察 染毒后一般要求观察14天。观察实验动物的中毒症状,对于获得受试化学物的急性毒性特征十分重要,有助于了解该化学物的靶器官。还应注意观察记录发生每种症状的时间、症状表现程度、各症状发展的过程及死亡前特征和死亡时间。临床中毒反应和死亡时间可提供中毒机制的线索。如染毒后立即出现惊厥、共济失调和死亡可能是神经毒性。经一段潜伏期后的迟发性死亡可能提示对肾或肝的作用。腹泻和 / 或竖毛,可能为植物神经兴奋。

有些化学物(如有机磷类化合物)中毒症状发展迅速且很快死亡。而有些化学物的中毒症状发展缓慢,甚至出现症状缓解,此后再发生严重症状而死亡。如碳基镍染毒早期先出现上呼吸道症状,当日即可缓解,2~3日后或更晚些才出现严重的肺水肿,呼吸困难而死亡。

实验动物个体对受试化学物的反应性快慢也有差异,如过氧化二碳酸二环己酯给小鼠腹腔注射后,在同一剂量组中最早死亡的可在染毒后7小时,而最迟的可达染毒后150小时。对于速杀性化学物也可仅根据24小时的死亡数计算LD₅₀。有些速杀性化学物(如久效磷),其24小时的LD₅₀与14天的LD₅₀没有差别。若是报告24小时的LD₅₀,则应在试验结果中加以说明。在实际工作中,应该根据受试物的有关测试规程的要求来确定观察期的长短。当然,对于特殊的化学物不能完全固定观察期限。

化学物给实验动物染毒后，动物往往出现兴奋→抑制→死亡，或者抑制→死亡的现象。如以含有氰基的氰氢酸和丙烯腈对大鼠和小鼠染毒后，都很快出现兴奋。染毒丙烯腈的动物首先出现活动增加、骚动、窜跑、甚至跳跃，之后出现呼吸困难，耳与尾青紫色；而氰氢酸呈一过性兴奋，呼吸加快、加深，之后呼吸困难，耳与尾则为桃红色。可见同为氰化物，其中毒机制有所不同。有的化学物给动物染毒后不久，动物先出现抑制现象，直至死亡。例如N-苯甲酰基-N-(3, 4-二氯苯基)-2-氨基-丙酸乙酯，给大鼠或小鼠灌胃致死剂量，动物很快表现为闭目静卧、四肢无力、站立不稳、步态蹒跚、呼吸减慢，最后缺氧、口鼻青紫死亡。有的化学物给予动物后，动物先出现刺激症状，如碳基镍吸入染毒在大、小鼠先出现前肢反复搔鼻等呼吸道刺激症状。小鼠吸入染毒某些馏温段的冷油后，大汗淋漓，被毛全湿，表现为神经系统症状。

在观察期内还需多次测量动物体重，体重改变可以反映动物染毒后的整体变化。实验动物染毒后的死亡时间也应记录、分析，有时死亡时间的分析可以提供一些重要信息。例如久效磷小鼠经口与腹腔注射染毒，均呈现随染毒剂量增加，死亡时间缩短。以死亡时间与染毒剂量作图，可呈直线负相关，提示实验动物致死是可能由于化学物原形所致。而过氧化二磷酸二环己酯给大鼠腹腔注射后呈现明显的染毒剂量对数值与死亡时间呈负相关关系，但给小鼠腹腔注射后，染毒剂量或染毒剂量对数与死亡时间无明显相关。这可能是与该化学物在大鼠和小鼠体内代谢不同有关。

急性毒性研究中，应注意观察非致死指标及其可复性，从而能够对化学物的急性毒性作全面的了解。可复性毒效应是指随着化学物从体内消失而逐渐减小以至消失的毒效应。毒作用的可复性与作用器官和系统、化学物本身的毒作用特点、化学物接触时间、特定时间内机体接触化学物的总量、动物的年龄及一般状况有关。化学物引起机体激素失衡常常是一种可复性的反应，比如化学物对甲状腺的影响，如果没有超过导致甲状腺组织损伤的阈值，则常常是一种可复性的毒效应。发生在组织再生能力迅速的器官(如肝)的损伤比发生在没有再生能力的组织(如神经)的损伤更可能是可复性的。在动物研究中观察到的不可复性的毒效应，在外推到人时比可复性毒效应更为重要。

对中毒死亡的实验动物应及时解剖作大体尸检，观察各器官有无充血、出血、水肿或其他改变，必要时对肉眼观察有变化的脏器进行组织病理学检查。实验结束时存活与对照组的动物也应作病理学检查。死亡动物的大体尸检或组织病理学检查有时可得到有价值的资料。

4. LD_{50} 计算 LD_{50} 是经统计学计算得到的毒性参数，并可报告其95%可信限。 $LD_{50}(LC_{50})$ 值是一个统计量，较少受实验动物个体易感性差异的影响，较为准确，因此是最重要的急性毒性参数，也用来进行急性毒性分级。对于非致死性指标的量化问题，可以利用 ED_{50} (median effective dose)和相应的剂量-反应关系曲线来解决。 ED_{50} 是指一次给予实验动物某种化学物引起动物群体中50%的个体出现某种特殊效应的剂量，该指标也是通过统计学计算处理得到的。

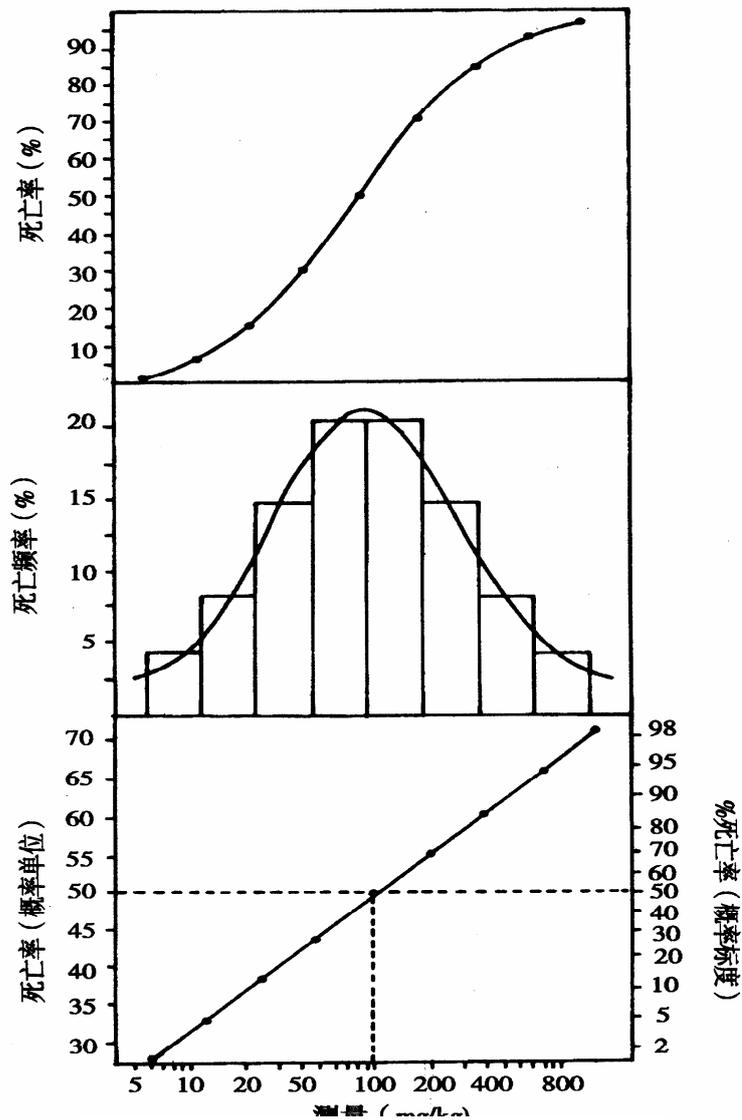
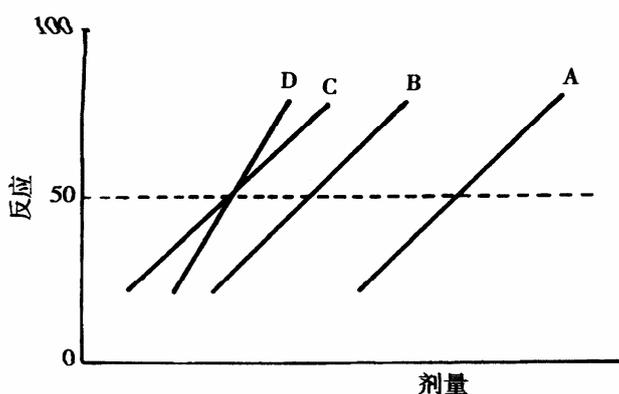


图 6-1 急性毒性的剂量-反应曲线关系曲线模式图

由图6-1可以看到在以对数剂量为横轴，死亡率为纵轴的图中，随剂量增加，累积死亡率也增加，呈“S”形曲线；如果以死亡频率为纵轴时，则不同剂量下死亡频率的分布呈正态分布，为典型的“钟罩”型；而将累积死亡率转换为概率单位后作为纵轴时，则对数剂量与死亡率(概率单位)的图形则表现为直线。因此我们可以将剂量对数值与死亡率(概率单位)的关系，进行直线回归，用最小二乘法求出a、b值。代入直线方程： $y = a + bX$ 。式中，X为剂量对数值，y为死亡率的概率单位。利用此式即可求得受试化学物的LD₅₀及其95%可信区间。

对数剂量-反应曲线的斜率在进行危险性评价时比LD₅₀的数值更重要。Finney(1978)曾指出斜率是LD₅₀标准差的倒数，反映了群体对此受试物反应的差异性。平行的剂量-反应关系曲线可能提示这两种化学物的毒作用机制、动力学特征类似。

利用LD₅₀来比较不同外源化学物急性毒性大小见图6-2。化学物A、B、C的剂量反应关系曲线(已用剂量对数和死亡率(概率单位)转换成直线)的斜率相同，而LD₅₀ A>B>C，因此，急性毒性大小的次序为C>B>A。而化学物D的LD₅₀与C相同。但斜率比C大，可见在低于LD₅₀的剂量时急性毒性C>D，即在低于LD₅₀的剂量时化学物C引起实验动物的死亡率高于化学物D。

图6-2 四种不同外源化学物的LD₅₀及剂量/反应(死亡)关系曲线

最小致死剂量(MLD)。如果急性毒性试验得到较好的剂量-反应关系, 则可直接计算LD₀₁(使一组实验动物1%死亡的剂量), 并以LD₀₁作为MLD的估计值。实际上, 即使得到很好的剂量-反应关系曲线, LD₀₁的可信限将是相当宽的, 并包含了MNLD(最大非致死剂量)。

5. 经典的急性致死性毒性试验的局限性 对经典的急性毒性试验和LD₅₀的意义, 多年来一直有不同的意见: ①消耗的物量大, 按经典法的要求测LD₅₀, 一次实验需要60~100只动物。②获得的信息有限, LD₅₀的值又不能等同于急性毒性, 死亡仅仅是评价急性毒性的许多观察终点之一。化学物单次大剂量急性中毒, 动物多死于中枢神经系统及心血管功能障碍, 并不能很好地显示出各自的毒作用特征, 另外, 由于死亡迅速, 各种器质性变化尚未发展, 不能显示出靶器官的病变。③测得的LD₅₀值实际上仅是近似值, 1977年欧洲共同体组织了13个国家的100个实验室, 统一主要的实验条件对5种化学物的LD₅₀进行测定。根据收集到的80个实验室的结果分析, 结果仍然存在相当大的差别, 可达2.44~8.38倍(表6-1)。④在安全性评价中仅评价动物死亡和简单的症状观察是不够的, 更需要的是生理学、血液学及其他化验检查所提供的深入详细的毒性信息。ICH(1991)规定在新药的报批材料中, 不必准确地测定LD₅₀, 只需了解其近似致死量和详细观察记录中毒表现即可。为此, 已发展了一些急性毒性试验的方法。

表6-1 五种化合物的LD₅₀值的实验室间变异

化合物	范围(mg/kg)	比值(最大值 / 最小值)
五氯酚	74~620	8.38
水杨酸钠	930~2328	2.50
苯胺	479~1169	2.44
乙酰苯胺	723~3060	4.23
氯化镉	105~482	4.59

三、急性毒性分级

目前国际上对外源化学物急性毒性分级的标准不统一。世界卫生组织的毒性分级标准可见表6-2。欧洲共同体的急性口服毒性分级标准为: 高毒(Very Toxic, LD₅₀<25mg/kg)、有毒(Toxic, LD₅₀为25~200mg/kg)、有害(Harmful: LD₅₀为200~2000mg/kg)、不分级(Unclassified, LD₅₀>2000mg/kg)等四个等级。除了参考国际上的几种分级标准外, 我国于1978年提出了农药及工业毒物急性毒性分级标准及农药急性毒性分级暂行标准。目前我国食品毒理则沿用了国际上六级标准, 即极毒、剧毒、中等毒、低毒、实际无毒、无毒(表6-3)。

表6-2 外源化学物急性毒性分级(WHO)

毒性分级	6只大鼠吸入4小时				
	大鼠一次经口LD ₅₀ (mg/kg)	死亡2~4只 的浓度(ppm)	兔经皮LD ₅₀ (mg/kg)	对人可能致死剂量	
				g/kg	(g/60kg)
剧毒	<1	<10	<5	<0.05	0.1
高毒	1~	10~	5~	0.05~	3
中等毒	50~	100~	44~	0.5~	30
低毒	500~	1000~	350~	5~	25
微毒	50000~	10000~	2180~	>15	>1000

表6-3 我国食品毒理急性毒性分级法[1994]

急性毒性分级	大鼠经口LD ₅₀ (mg/kg)	大致相当于体重为70kg人的致死剂量
6级(极毒)	<1	稍尝, <7滴
5级(剧毒)	1~50	7滴~1茶匙
4级(中等毒)	51~500	1茶匙~35克
3级(低毒)	501~5000	35~350克
2级(实际无毒)	5001~15000	350~1050克
1级(无毒)	>15000	>1050克

四、急性毒性试验的其他方法

1. 近似致死剂量的研究 在确定近似致死剂量的研究中, 仅用6只动物, 每只动物给以不同剂量的受试物, 每个剂量间距为1.5倍。这种实验设计可以得到近似最小致死剂量。利用该方法测试了87种化学物, 发现83%的化学物近似致死剂量都位于用经典的急性毒性试验方案所得到的LD₅₀的正、负30%范围以内。

另一种确定近似致死剂量的方法是先选择一个剂量给予2只动物, 24小时后, 观察动物的情况, 然后再根据动物反应确定下一个给药剂量; 如果动物未死亡, 以第一次给药剂量的1.5倍剂量再次给予2只动物; 如果动物死亡, 则以第一次给药剂量的2/3再次给予2只动物。重复操作一直到确定最大非致死剂量和最小致死剂量。

2. 固定剂量法(fixed dose Procedure)

固定剂量法是由英国毒理学会1984年提出, OECD于1992年正式采用。这种方法与以往方法不同的是它不以动物死亡作为观察终点, 这个方法可以利用预先选定的或固定的一系列剂量染毒, 从而观察化学物的毒性反应来对化学物的毒性进行分类及分级。实验选择的剂量范围是5、50和500mg/kg, 而最高限量是2000mg/kg。首先用50mg/kg的受试物给予10只实验动物(雌、雄各半)。如果存活率低于100%, 则再选择一组动物给予5mg/kg的受试物。如果存活率仍低于100%, 则将该受试物归于“高毒”类, 反之归于“有毒”类。如果给予50mg/kg受试物后存活率为100%, 但有毒性表现, 则不需进一步试验而将其归于“有害”类。如果给予50mg/kg后存活率为100%, 而且没有毒性表现, 继续给另外一组动物500mg/kg的受试物, 如果存活率仍为100%, 而且没有毒性表现时, 则给予2000mg/kg受试物进行观察, 如果仍然100%存活, 将受试物归于“无严重急性中毒的危险性”类。对于固定剂量法的结果评价可见表6-4。

OECD组织了对固定剂量法国际性的验证(Van Den Heuvel 1990), 11个国家的33个实验室用固定剂量法和OECD(1981)规定的经典急性毒性试验法进行实验。实验结果表明, ①毒性分级: 比较了30个化合物的两种试验法所得结果, 根据欧共体急性口服毒性的分级标准, 516次固定剂量法试验中, 有414次实验结果的毒性分级与LD₅₀的分级相同, 一致性为80.2%。

②毒性反应：从毒性反应的类别、出现和持续的时间、消失的时间等方面分析，两种试验方法未显出明显差别。③实验所用动物数：LD₅₀经典急性毒性试验，平均每个化合物用大鼠24.2只，固定剂量法平均用大鼠14.8只，明显比前者少。

表6-4 单次口服固定剂量法试验结果的评价

剂量 (mg/kg)	试验结果		
	存活率 < 100%	100%存活，毒性表现明显	100%存活，无明显中毒表现
5.0	高毒LD ₅₀ ≤ 25mg/kg	有毒	用50mg / kg试验
50.0	有毒或高毒 用5mg/kg试验	有害 LD ₅₀ 200~2000mg/kg	用500mg/kg试验
500.0	有毒或有害 用50mg/kg试验	LD ₅₀ > 2000mg/kg	用2000mg/kg试验
2000.0	用500mg/kg试验	该化学物无严重急性中毒的危险性	

3. 急性毒性分级法(acute toxic class method)

传统的急性毒性试验方法以死亡为终点，而固定剂量法以明显的毒性体征作终点。OECD(1996)急性经口毒性分级法是分阶段试验法，每阶段3只动物，根据死亡动物数，平均经2~4阶段即可判定急性毒性。所用动物少，仍可得到可接受的结论，此法基于生物统计学，并经过OECD组织的国际证实研究(Schlede等，1994)。此法应用于啮齿类，首选大鼠，利用3个固定剂量25、200、2000mg/kg体重其中之一开始进行试验，根据实验结果：

①不需要进一步试验进行分级；②下一阶段以相同剂量的另一种性别试验；③下一阶段以较高或较低的剂量水平进行(从200mg/kg体重开始的程序见图6-3)。于确认染毒动物存活后，进行下一个性别或下一个剂量的实验。动物观察14天，染毒当天观察体征和死亡至少两次，之后每日观察一次。染毒前和每周测体重，所有动物均进行大体解剖，必要时进行组织病理学检查。

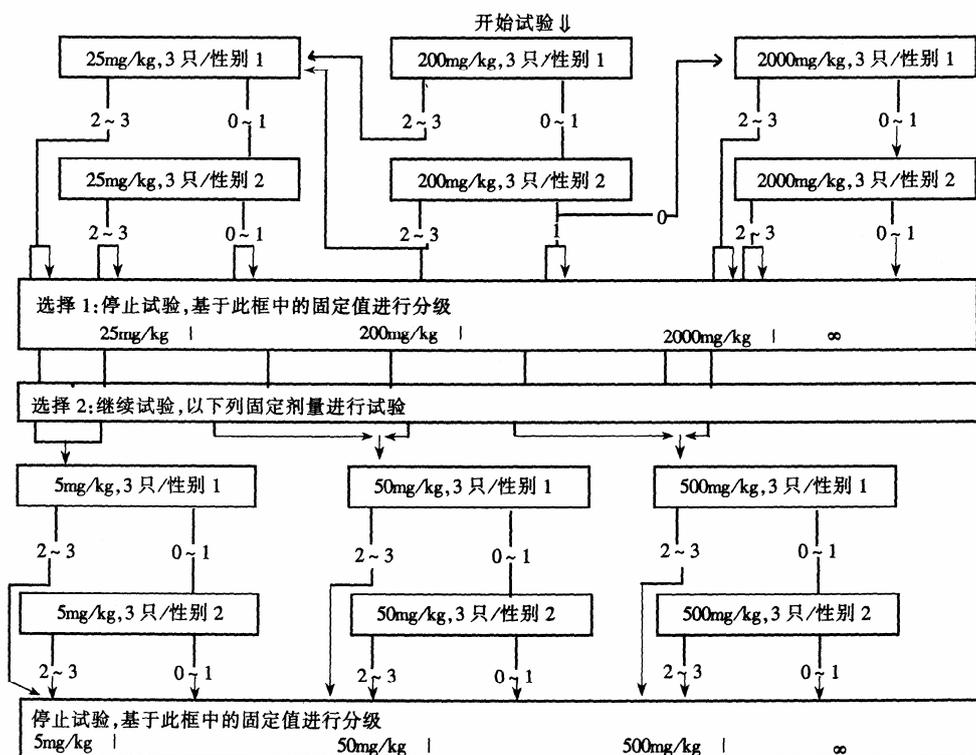


图6-3 急性毒性分级法:以200mg/kg体重开始的试验方案

4. 上、下移动法(up / down method)或阶梯法, 该法可用于观察不同的终点, 第二个动物接受化学物的剂量由第一只动物染毒后的反应决定, 如果动物死亡, 则下一个剂量降低; 如果动物存活则下一个剂量增高, 但是实验需要选择一个比较合适的剂量范围, 使得大部分的动物所接受的化学物剂量都会在真正的平均致死剂量左右。如果剂量范围过大, 则需要有更多的动物来进行观察。对于该法进行改进以后, 上、下移动法则只需要6~9只动物。Lipnick等(1995)比较了上下法、固定剂量法和经典LD₅₀法, 根据EEC分级系统对化学品急性毒性分级, 上下法和经典法一致性为23 / 25, 上下法与固定剂量法一致性为16 / 20。上下法需一个性别6~10只动物, 少于另两种方法。

5. 金字塔法(“pyramiding”study)

利用本设计观察动物急性毒性, 动物用量最少。典型的金字塔法研究在整个观察期内都给动物受试物, 一般是隔天染毒, 但剂量是逐渐增加的。例如1、3、10、30、100、300、1000和3000mg/kg剂量系列或者是10、20、40、80、160、320、640和1280mg/kg剂量系列。给予动物的剂量直接上述系列增加, 直到一只动物或两只动物死亡, 或者达到剂量上限。对于药物, 非啮齿类动物一般很少超过1000mg/kg, 啮齿类动物则很少超过3000mg/kg。金字塔法常用于非啮齿类的动物的急性毒性研究。试验组4只, 对照组4只均雌雄各半, 共8只狗。试验组于实验第0、2、4、7、9天染毒, 每次染毒后2~4h内进行临床体检, 包括触诊, 行为观察, 脊髓反射检查、瞳孔光反射、呼吸率, 心电图、直肠温度、临床实验室检查, 于实验第10天处死试验组动物, 并进行尸体解剖。

通过金字塔研究获得的资料可以得到三种结论: ①如果没有动物死亡, 则最小致死剂量和LD₅₀均大于极限剂量或实验所用最高剂量。②如果所有动物死于同一剂量, 则LD₅₀和最小致死剂量在实验所用最后两个剂量之间。③如果一只动物死于某一个剂量, 而另一只死于高一个剂量, 则最小致死剂量位于出现第一只动物死亡的剂量与前一个剂量之间, LD₅₀则位于出现第一只动物死亡的剂量与所有动物死亡的剂量之间。此法的缺点为: ①此法得不到死亡曲线, 也无法计算LD₅₀; ②本法无法确定迟发的死亡, 比如, 第二次给药后动物出现死亡, 则无法确定是由于第一次给药引起的迟发死亡, 还是第二次给药引起的死亡; ③对于有些半衰期特别长的化学物, 由于蓄积作用可能会导致得到的急性致死剂量偏低, 而由于适应性的存在, 可使得到的急性致死剂量偏高。

6. 限量试验 如受试物的毒性很低, 可用限量试验。一般啮齿类(大鼠或小鼠)20只, 也有用10只, 雌雄各半。单次染毒剂量不必超过5g / kg体重, 也有认为剂量一般不超过2g / kg体重, 对于食品毒理学试验限量可为15g / kg体重。可能的结果为: ①如果实验动物无死亡, 结论是最小致死剂量(MLD)大于该限量; ②如果死亡动物数低于50%, 结论是LD₅₀大于限量; ③如果死亡动物数高于50%, 则应重新设计, 进行常规的急性毒性试验。根据二项分布, 20只动物死亡5只, 死亡百分率的95%可信区间为9%~49%。因此, 保守的观点认为如果死亡动物数为5只或5只以下, 结论是LD₅₀大于限量; 如死亡为6只或6只以上, 即应重新设计试验。用10只大鼠或小鼠进行试验, 如无死亡或死亡动物数仅为1只, 才可认为LD₅₀大于限量。

7. 急性系统毒性试验

此试验的设计是为了更全面地确定药物的急性毒性。共有3种, 即最低急性毒性试验、完全急性毒性试验和补充的急性毒性试验。

在剂量设计上应注意, 一般设3个剂量组和1个溶剂对照组。最高剂量应有明显的毒性(包括死亡), 但不需要使全部动物死亡。如果受试物毒性很低可仅设1个限量组和1个对照组。每组10只大鼠或小鼠, 雌雄各半。最高剂量超过3g / kg体重几乎不会得到更多的毒性资料, 最高剂量不应大于人临床拟用剂量的100~300倍, 剂量间距应较大(如3~10倍)。

最低急性毒性试验: 在染毒当天(0天)测体重后染毒, 染毒后多次(如每小时1次, 共4次)

观察临床体征，此后每天1次观察体征和死亡率，于第7天和第14天测体重，第14天处死。对观察期死亡和试验结束处死的动物进行尸体解剖。

完全急性毒性试验：目的是发现靶器官，每组20只大鼠或小鼠、雌雄各半，除最低急性毒性试验的要求之外，于第0、1、2、3、4天测体重和饲料消耗，于第3天和第14天各处死50%动物进行尸体解剖、临床实验室检查及收集器官(脑、心、肝、脾、肾、胃、胸腺、睾丸)进行组织病理学检查。

补充急性毒性试验较少进行，主要是有特殊的目的，如毒物动力学研究、靶器官毒性的特殊研究等。上述三种急性系统毒性可能得到的毒性资料见表6-5。

表6-5 急性系统毒性试验可得到的资料(Gad, 1995)

致死 / 死亡率	靶器官鉴定
LD ₅₀ 及其可信限	尸体解剖
致死曲线的形状和斜率	组织学检查
最大非致死剂量或最小致死剂量，以LD ₀₁ 估计	临床化学和血液学改变
死亡时间	特定的功能试验
临床体征	免疫功能
发生和恢复时间	神经肌肉筛查
急性LOAEL和NOAEL	行为筛查
濒死体征或非濒死体征	毒物动力学
特异的或一般的毒效应	不同染毒途径的毒性差别
剂量—反应曲线与致死曲线的间隔	受试物血浆浓度，曲线下面积、分布体积，
体重改变	半衰期
体重下降或增长降低	受试物代谢谱
恢复	在关键器官的分布
饲料消耗改变	血浆浓度与临床体征发生的关系
死亡和存活动物体重变化	

第二节 亚慢性和慢性毒性试验

急性毒性试验主要是研究外源化学物急性毒作用的特征和上限参数，即LD₅₀，并据此可进行急性毒性分级。由于人体接触外源化学物往往是长期的反复的接触，利用急性毒性试验的资料难以预测慢性毒性。这是因为：①外源化学物在长期重复染毒时可产生与急性毒性试验完全不同的毒作用。如苯急性中毒引起中枢神经系统抑制，而长期反复接触可引起粒细胞缺乏及白血病。②随着动物的衰老，有些因素如组织易感性改变、代谢和生理功能的改变，以及自发性疾病等均可影响毒作用的性质和程度。③某些重要的疾病例如心脏病、慢性肾衰、肿瘤等均与年龄的增长有关。基于上述原因，进一步研究外源化学物的慢性毒性是很有必要的；

毒理学动物试验按染毒期限可分为四种，即急性、亚急性、亚慢性和慢性毒性试验，后三种可统称为重复染毒毒性试验。急性毒性试验和慢性毒性试验分别代表了人一次染毒和长期反复染毒这两种暴露特征的毒性试验方法。由于慢性毒性试验耗费大量的人力、物力和时间，亚急性、亚慢性毒性试验就具有预备或筛选试验的性质。当外源化学物在亚急性、亚慢性毒性试验中有严重的毒作用时，此受试物就应考虑放弃，只有在必要时才进行慢性毒性试验。Parkinson等(1995)报告117种药品狗亚慢性(90天)和慢性(24月)毒性试验结果与大鼠(短期或长期毒性试验)的结果比较，几乎没有发现新的毒性资料。因此，Parkinson等认为，动物

毒性试验长于6个月是没有必要的，除非是研究致癌作用。这与Lumley等(1985)的报告及日本Igarashi(1993)对90个药品的比较研究结果相似。WeiI等(1969)报告，112种受试物中，大鼠染毒90天后才出现毒性效应的只有3种(占2.5%)，其他受试物均在90天内已出现毒性效应，故认为大鼠90天毒性试验即可确定受试物的未观察到有害作用水平(NOAEI)。尽管还有争论，亚慢性毒性试验(特别是90天亚慢性试验)已成为比较常用的重复染毒毒性试验；而从科学上和经济上考虑，慢性毒性试验就倾向于和致癌试验合并进行。

由于亚慢性毒性试验和慢性毒性试验在实验设计和方法上较相似，故一并介绍。

一、亚慢性和慢性毒性试验的概念和目的

亚慢性毒性(subchronic toxicity)是指实验动物连续(通常1~3个月)重复染毒外源化学物所引起的毒性效应；慢性毒性(chronic toxicity)是指实验动物长期染毒外源化学物所引起的毒性效应。

亚慢性和慢性毒性试验的目的：

1. 确定受试物亚慢性和慢性毒性的效应谱，对在急性及亚急性毒性试验中发现的毒作用提供新的信息，并发现在急性及亚急性毒性试验中未发现的毒作用；
2. 研究受试物亚慢性和慢性毒作用的靶器官；
3. 研究受试物亚慢性和慢性毒性剂量-反应(效应)关系，确定其观察到有害作用的最低剂量(LOAEL)和未观察到有害作用的剂量(NOAEI)，提出此受试物的安全限量参考值；
4. 研究受试物亚慢性和慢性毒性损害的可逆性；
5. 亚慢性毒性试验为慢性毒性试验的剂量设计及观察指标选择提供依据；
6. 确定不同动物物种对受试物亚慢性和慢性毒效应的差异，为将毒性研究结果外推到人提供依据。

二、亚慢性和慢性毒性试验方法

1. 实验动物选择和染毒期限

亚慢性和慢性毒性试验一般选择两种实验动物。一种是啮齿类，一种是非啮齿类，常用大鼠和狗。选择两种实验动物是为了降低外源化学物对不同物种动物的毒作用特点不同所造成的将实验结果外推到人的偏差。在亚慢性经皮毒性试验时，也可考虑用兔或豚鼠。

一般情况下，亚慢性和慢性试验选用雌雄两种性别，如某种药物临床上只用于一种性别，此时可选用单性别的动物。慢性毒性试验的目的是使实验动物寿命的大部分时间染毒该受试物，因此在生命的早期开始染毒是很重要的，美国FDA要求啮齿类动物在研究开始时应小于6周龄。

同样的染毒期限对不同的试验动物，其意义不同。一般地讲，慢性毒性试验对哺乳类应为两年的时间，对啮齿类相当于终生染毒，但对兔只相当于生命期的36%，狗为20%，见表6-6。

表6-6 动物研究期限相当于寿命期(%)和人染毒的时间

物种	研究期限(月)相当于寿命期(%)					研究期限(月)相当于人(月)				
	1	3	6	12	24	1	3	6	12	24
大鼠	4.1	12.0	25.0	49.0	99.0	34	101	202	404	808
兔	1.4	4.5	9.0	18.0	36.0	12	36	72	145	289
狗	0.82	2.5	4.9	9.8	20.0	6.5	20	40	81	162
猪	0.82	2.5	4.9	9.8	20.0	6.5	20	40	81	162
猴	0.55	1.6	3.3	6.6	13.0	4.5	13	27	61	107

慢性毒性实验的期限应依受试物的具体要求和实验动物的物种而定，工业毒理学要求6个月，环境毒理学和食品毒理学要求一年以上，OECD要求慢性毒性试验大鼠染毒期限至少

一年。如慢性毒性试验与致癌试验结合进行则染毒期限最好接近或等于动物的预期寿命。

在药物临床前毒性研究中，长期毒性试验的期限主要取决于临床拟用药的期限(见表6-7)。最近，各种规范对染毒期限的要求也在逐渐趋向于缩短，如ICH(1998)规定啮齿类临床前长期毒性试验为6个月，非啮齿类为9个月。但是，一般来说至少有两种器官(眼和心脏)和一种严重的疾病(癌)需要进行长期染毒才能有明显的毒效应。此外，还发现如给啮齿类动物正常饲料量的70%~80%，其寿命可延长35~40个月，故正常的生命周期有待进一步确定。

表6-7 临床前研究动物长期毒性试验的期限

临床用药时间	动物染毒期限
最多3次	2周
10天	1个月
1个月	3个月
未限制	1年(美国)，6个月(欧洲及日本)

在用非啮齿类(狗，猴等)进行慢性毒性试验时，染毒期限常不能持续整个生命期，仔细研究受试物的动力学和代谢状况可弥补染毒期限的不足(如试验终点不是致癌作用)。如果在稳态动力学建立之后继续较长时间的染毒，从临床表现上或由间断处死动物的病理变化未见毒性作用的增强，则可部分代替全寿命期试验，并使实验结果的可信性增加。

2. 染毒途径

外来化合物的染毒途径，应当尽量模拟人类接触受试化学物质的方式(途径)，并且亚慢性与慢性毒作用研究的染毒途径应当一致。亚慢性和慢性毒性试验常用经胃肠道、经呼吸道、经皮肤染毒三种途径，药物临床前毒性试验中，动物染毒途径应尽可能与人的用药途径一致。经胃肠道染毒毒物最好采用喂饲法，即将受试物与食物或饮水混匀，使实验动物自然摄入。如果受试化学物质有异味或易水解时，也可以用灌胃方式染毒。应注意对挥发性受试物及饲料粉尘的影响，尽量减少实验人员及动物受污染的危险性。当用狗或猴进行长期实验时，不常采用喂饲染毒，因浪费量太大，通常采用胶囊或插胃管染毒。

经呼吸道吸入染毒，每天吸入时期依实验要求而定，亚慢性毒性研究在工业毒理学可1~4小时不等，环境毒理学可为4~6小时。在慢性毒性研究中，工业毒理学要求每天吸入4~6小时，环境毒理学一般要求每天吸入8小时。凡需要在吸入期间喂食、喂水时，要注意防止受试化学物质污染食物、饮水及食具。

经皮染毒的去毛部位面积一般不大于动物体表总面积的10%~15%，大鼠约为20~50cm²，每次染毒4~6小时，应防止动物舔食。

而且，为保证受试物在动物体内浓度的稳定，每天应在相同的时间及实验室条件下染毒。每周至少染毒6~7天，有研究表明，相同毒物在相同剂量的情况下，每周5天染毒与7天染毒的毒性反应是不一致的。

按预定剂量水平，吸入染毒气体和蒸气以mg/m³表示其浓度($\text{mg} / \text{m}^3 = (\text{MW} \cdot \text{ppm}) / 22.4$)，掺入饲料或饮水以%或ppm(mg/kg, mg/L)表示其浓度。必须每周或每两周调整饲料中受试物的浓度以维持恒定的剂量水平，因为单位体重的饲料消耗量随动物年龄的增长而下降。如在啮齿类试验中，从离乳到成年过程中饲料中受试物浓度保持恒定不变，则在整个实验过程中的染毒剂量约减少至40%。这可影响毒性反应的严重程度，并可能作出有耐受性的错误判断。

3. 试验分组和剂量设计

在亚慢性和慢性毒性试验中，为了要得出明确的剂量-反应关系，一般至少应设3个剂量组和1个阴性(溶剂)对照组。高剂量组应能引起较为明显的毒性，中剂量组应该为观察到有害作用的最低剂量(LOAEL)，低剂量组应相当于未观察到有害作用剂量(NOAEL)。亚慢性毒

性试验高剂量的选择,可以参考两个数值,一种是以急性毒性的阈剂量为该受试物的亚慢性毒作用的最高剂量,另一种是取受试物LD₅₀的1/20~1/5为最高剂量。高、中、低3个剂量间组距以3~10倍为宜,最低不小于2倍。慢性毒性试验剂量选择,高剂量可以选择亚慢性毒效应的NOAEL或其1/5~1/2为慢性毒性研究的最高剂量;各剂量组间距以差2~5倍为宜,最低不小于2倍。慢性毒性试验剂量间距应小于亚慢性毒性试验。剂量选择的一般步骤是从急性(单剂量)毒性试验→14天毒性试验→90天毒性试验的程序,直接从急性毒性资料来确定慢性毒性试验的剂量经常有困难,可能高估或低估受试物的慢性毒性。如对剂量选择没有把握,则可在某项试验中多设几个剂量组,这要比重复整个试验费用低得多。同时,如有性别差异,不同性别可选择不同的剂量。

对于药物而言,可用人拟用剂量的倍数来设计试验剂量,亚慢性毒性试验大鼠可用人拟用剂量10、30和100倍,非啮齿类可用5、15、50倍;慢性毒性试验大鼠可用人拟用剂量5、15和50倍,非啮齿类可用3、9、30倍(Traina,1983)。ICH对于药品慢性毒性和致癌性研究的最高剂量已取得一致的意见,但对于农药、工业化学品、食品添加剂和其他非药用化学物试验剂量的选择还有争论。美国ILSI风险科学研究所由代表美国、加拿大、欧洲和日本的科学界、工业及政府的科学家组成关于啮齿类慢性毒性试验剂量选择工作组,该工作组(1997)鼓励不再唯一依照MTD原则(MTD主要由体重和组织病理学来确定),并提出选择最高剂量和较低剂量的如下5个原则。

①根据毒理学原理,慢性毒性试验剂量选择应使慢性毒性试验的敏感性增加到最大程度。在合理的剂量范围内,提高剂量可能增加检测毒效应的能力。②在选择剂量时,应考虑适当的试验设计、作用机制及其他有关的资料。③中、低剂量的选择不应该仅按最高剂量的某个固定的比例,而应考虑毒作用的机制和模式、毒动学、以及下述的其他因素。而且中、低剂量的选择应尽可能显示剂量—反应曲线的形状,并且考虑人体的暴露水平。④选择剂量时应考虑之前进行的各项研究所评价的终点如组织病理学、毒动学、细胞增殖和凋亡、生理功能、临床化学、血液学和尿分析、器官重量、体重等。⑤应考虑理化因素、生物利用度、在饲料或饮水中的适口性等。

所选动物亚慢性毒性试验一般大鼠6~8周龄(体重80~100g),每组大鼠不少于20只;狗8~12月龄,每组6~8只,雌雄各半。于慢性毒性试验中动物的年龄应低于亚慢性毒性试验,大鼠应刚离乳,体重在50~70克为宜,一般要求每组40只,雌雄各半。必须设置阴性对照组,必要时动物数可以再多些,以排除其他因素和自然死亡的干扰。以狗为实验动物时,每个剂量组应各8只或以上,雌雄各半。在1~2年的长期实验中,必须考虑某些意外事故,需增添额外的动物。如对照组大鼠在2年期间自然死亡可使动物数减少20%。Homburer(1983)主张对照组的动物数等于每个染毒组的动物数乘以染毒组组数的平方根,如每组40只大鼠,共4个染毒组,则对照组应有80只大鼠,即 $40 \times \sqrt{4}$ 只。

如果设计要求在染毒受试物期间处死一部分动物,进行某些指标动态观察(如病理组织学检查或某些脏器的生化检查),则在试验开始时应相应增加实验动物数。

4. 观察指标

外来化学物亚慢性毒作用研究对毒性效应检测流程图见图6-4。

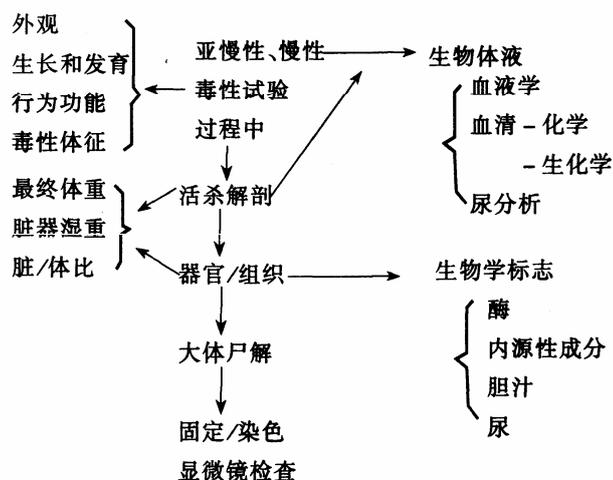


图6-4 亚慢性、慢性毒性试验检测各种毒性终点的流程图

(1) 一般性指标 在实验过程中，应仔细观察动物的外观(体表通道和毛色等)，社会行为(躁动、冷漠、探究活动)；刺激性(好斗等)及对周围环境、食物、水的兴趣，这些信息如单独一项无太多的意义，但结合起来就有可能揭示出未观察到毒性症状前的潜在毒性效应。

在亚慢性及慢性毒性研究中，动物体重是一个比较重要且比较敏感的指标，反映了受试物对实验动物的生长发育及一般状态的影响。与对照组处于相同的喂饲条件下，如果受试组动物体重增长比对照组低10%，就可以认为是由受试化学物所引起的毒效应。如果各剂量组体重增长改变有剂量-反应关系，就可以肯定这是一种综合毒性效应。一般在亚慢性毒性试验应每周测体重一次，对慢性毒性试验，最初13周每周测体重一次，以后如动物健康状况无明显改变可每2周或每月测体重一次。

对各剂量组和对照组动物同期体重的统计和比较可有多种方式，可以用体重直接统计，也可用体重的增长重量，或用体重百分增长率(以染毒开始时体重为100%)，进行统计。

除体重外，还应记录动物的饲料消耗，并计算食物利用率(实验动物每食入100克饲料所增长的体重克数)。比较各染毒组与对照组实验动物的食物利用率，有助于分析受试物对实验动物的生物学效应。食物利用率可用于鉴别啮齿类动物体重降低或增长减缓是由于受试物不适口，还是真正的毒作用。

(2) 实验室检查 在慢性毒性试验中，必须评价受试物对各器官系统的功能影响。血、尿等体液的实验室检查的目的是发现受试物所致的器官功能紊乱。最主要的是评价解毒和排泄器官(即肝和肾)，因为在这两个器官染毒受试物的浓度较高，另一个重要的靶器官是血液。

血液学检查包括红细胞计数、血红蛋白含量、白细胞计数及分类、血小板计数、凝血时间等。

血液生化检查主要为血清天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、尿素氮、肌酐、总蛋白、白蛋白、血糖、总胆固醇、总胆红素等。其中大部分血清酶类都没有组织特异性，但在肝细胞胞浆中水平较高。正常情况下，血清中只检测到低水平的这些酶(如AST, ALT)，在某些毒物的作用下，肝细胞膜的完整性受到破坏，脑浆中的这些酶进入血液，几小时内能升高5~10倍。血清酶类检测对于其他靶器官毒性的敏感性均不如肝脏。因为，一方面在其他靶器官中这些酶存在的水平较低，另一方面，毒物对肝脏的影响常掩盖其他靶器官的毒性效应。临床化学指标与器官系统功能关系如下。①心脏：肌酸激酶及其同工酶，乳酸脱氢酶(LDH)及其同工酶；②肝：丙氨酸氨基转移酶(ALT)，白蛋白，碱性磷酸酶(ALP)，天冬氨酸氨基转移酶(AST)， γ -谷氨酰转肽酶(GGT)，LDH，山

梨醇脱氢酶, 总蛋白; ③肾: 白蛋白, 氯, 肌酐(尿和血清), 葡萄糖, 钾, 蛋白(尿和血清), 钠, 尿素氮; ④胰: 淀粉酶, 葡萄糖, 脂酶, 钙; ⑤骨: ALP, 钙, 磷, 尿酸; ⑥其他: 胆固醇(饲料和肝), 甘油三酯(饲料和肝), 高密度脂蛋白胆固醇, 脂蛋白, 葡萄糖, 胆碱酯酶。单个参数的变化很少有生物学意义, 因为这些参数常常是相互有关的, 应注意研究预期的参数变化谱。

实际操作中不影响实验动物生理功能的最大取血量为其总血量的10%; 总血量约为50ml / kg, 故0.3kg的大鼠约有15.0ml血液, 一次取血量不应超过1.5ml。

尿液检查包括外观、pH值、蛋白、糖、潜血(半定量)和沉淀物镜检等, 可提供与毒物有关的中间代谢产物及靶器官毒性的证据。

用大鼠作实验动物, 亚慢性毒性试验一般在试验结束时进行实验室检查, 必要时可在染毒期间测定一次; 慢性毒性试验则在实验开始后每隔6个月各剂量组雌雄部分大鼠及结束时(全部)各检查一次。用狗作实验动物, 应在染毒前、染毒期间、染毒结束时进行实验室检查。必要时应留部分实验动物在恢复期后再进行实验室检查。如已了解受试物毒作用的靶器官, 可适当对该器官进行生理功能的测定, 但不作为常规试验。

(3) 处死解剖检查 试验结束, 活杀实验动物。采血进行上述实验室检查, 并系统解剖, 测定脏器重量, 进行肉眼和病理学检查。濒死的动物, 应及时解剖。

1)脏器湿重和脏器系数: 一般称取心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、睾丸、脑等脏器湿重, 并计算其脏器系数。脏器系数或称脏体比值, 指单位体重(通常以100克体重或克体重计)与某个脏器的比值, 如肝 / 体比, 就是(全肝湿重 / 体重) \times 100%。这个指标的意义在于实验动物随着年龄(体重)的增长, 在不同年龄期各脏器与体重之间重量比值均有一定的规律, 如果和对照组比较出现显著性差异, 则有可能是受试物毒作用的结果。脏器系数增加可能是由于充血、水肿、增生或肿瘤等; 脏器系数降低可能是由于坏死、萎缩等。如果受试物能明显阻碍实验动物体重增长, 而对脏器无明显毒性效应时, 也会出现脏器系数增加。故当实验动物体重明显受到影响时, 应同时比较各剂量组与对照组动物各脏器的绝对湿重, 以排除可能出现的假象。

2)病理学检查: 病理学检查是实验毒理学的基础。对各器官的肉眼和显微镜检查是为了得到受试物毒性效应的形态学证据。功能状态的改变应与其相应的形态学改变相联系, 以适当评价其毒理学意义。确定受试物的安全性, 最终的依据通常是靠病理组织学检查。

所有的试验动物, 包括试验过程中死亡的动物都应进行完整的系统解剖和仔细的肉眼观察。肉眼可见的损伤或可疑损伤部位都应采样固定, 作进一步组织学检查。对照组和高剂量组动物以及系统解剖时发现的异常组织均需作详细的组织学检查。其他剂量组一般仅在高剂量有异常发现时进行。检查脏器一般包括脑、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、睾丸、卵巢等。在慢性毒性试验中, 组织病理学检查包括的器官可多达30种以上。除规定的应检查的组织脏器, 有些情况下也可保留其他的组织或进行特殊染色, 必要时进行电镜观察、组织化学、定量形态学分析等。

应评价器官组织病理改变的性质和发生率。如果病理组织学损害程度进行半定量评价, 将易于判断损害是否由于受试物诱发的损害及是否随染毒剂量和时间增加而严重。从理论上讲, 所有的显微镜检查都应盲法进行, 即病理学家不知该组织切片来自哪个组织哪只动物。实际上要做到这一点较困难, 且经常会降低评价的质量。如了解有关的试验资料更有助于评价各种效应的相关性、严重性、时间性及特殊毒性可能的作用机制。而盲法分析可用于就某种特定的发现进行评价和探讨。

总之, 上述几类指标中临床观察可寻找早期临床体征, 对血液和尿标本的分析可评价器官系统的功能, 尸解和组织病理学检查是为了得到毒理学损害的形态学证据, 应综合起来评价受试物的毒性效应(表6-8)。

表6-8-1 可用于亚慢性和慢性毒性试验的一般观察、
临床实验室检查及病理学检查项目

器官和系统	一般观察	临床血液化验	病理学检查
肝	粘膜变色、水肿、腹水	谷草转氨酶、谷丙转氨酶、胆固醇、碱性磷酸酶、总蛋白、白蛋白、球蛋白	肝 ^b
泌尿系统	尿量、连续性、颜色	尿素氮、总蛋白、白蛋白、球蛋白	肾和膀胱 ^b
胃肠系统	腹泻、呕吐、排便、食欲	总蛋白、白蛋白、球蛋白、钠、钾	胃、胃肠道、胆囊(如果有)、唾液腺、胰
神经系统	姿势、活动、反应、行为		脑、脊髓、及坐骨神经
眼	外观、分泌物、突眼症检查		眼、视神经
呼吸系统	频率、咳嗽、鼻分泌物	总蛋白、白蛋白、球蛋白	一叶肺及主要支气管
生殖系统	外生殖器官的外观和触诊		睾丸和附睾或卵巢；子宫或前列腺和精囊 ^b
造血系统	粘膜变色、淡漠、无力	红细胞压积、血红蛋白、红细胞数、白细胞总数及其分类、血小板数、凝血酶原时间、激活的部分凝血酶原时间	脾、胸腺、肠系膜淋巴结、骨髓涂片及其切片
内分泌系统	皮肤、皮毛、体重、尿、粪便特征	糖、钠、钾、碱性磷酸酶、胆固醇	甲状腺、肾上腺、胰
骨骼系统	生长变形、跛行	钙、磷、碱性磷酸酶	骨骼、破骨程度
心血管系统	心率、脉搏特征、节律、水肿、腹水	谷草转氨酶	心 ^b 、主动脉、其他组织中动脉
皮肤	颜色、外观、气味、被毛	总蛋白、白蛋白、球蛋白	仅在皮肤研究时进行
肌肉	大小、无力、消瘦、活动减少	谷草转氨酶、肌酐磷酸激酶	仅在一般观察、临床化学或肉眼病变有指征时进行

a.全部动物应进行肉眼检查；表中所列的器官或组织应做组织病理学检查； b. 这些器官也应称重

表 6-8-2 常见化学毒物所致主要靶器官损伤

靶器官	毒物举例	病变类型	病理诊断
肝	CCl ₄ 、铅、黄磷、氯乙烯	变性、坏死、炎症、硬化、癌瘤	中毒性肝炎、肝硬化、肝细胞癌、急性肝坏死、亚急性肝坏死
肾	汞、铅	变性、坏死、炎症、萎缩、纤维化	中毒性肾病、急性肾小管坏死、肾固缩
脑	CO、铅	变性、坏死、出血、水肿、脱髓鞘、神经胶质增生	中毒性脑水肿、中毒性脑病
肺	氯气、纯氧、铍、白草枯	水肿、出血，肺泡炎、纤维化	中毒性肺水肿，化学性肺炎、弥漫性肺泡损伤、肺透明膜病
心血管	钡、CS ₂	变性、坏死、炎症、硬化	中毒性心肌病(炎)、动脉粥样硬化
血液及造血系统	铅、苯	溶血、贫血、白血病、粒细胞减少	中毒性血液病，
睾丸、卵巢	镉、甲基汞、DDT	性细胞损伤、发育障碍	中毒性不育症、流产、死胎、畸形
皮肤	镍、铬、铍、煤焦油、多氯联苯	皮疹、出血、炎症、坏死、溃疡	接触性剥脱性皮炎、痤疮、中毒性黑变病
其它	铅、汞、氟	铅沉着、汞沉着、氟牙病	铅线、氟骨症等

(4) 特异性指标(生物学标志): 所谓特异性指标是反映外源化学物对机体毒作用本质的特征性指标, 并常与其毒作用机制有关。实际上, 所谓特异性指标就是生物学标志(主要是效应标志)。由于生物学标志对研究外源化学物对人体的毒作用具有重要的意义, 因此, 亚慢性和慢性毒性试验在可能时应考虑安排这方面的研究。确定特异性的生物学标志难度较大, 一般可以从分析受试物的化学结构(特殊基团)或分析受试物急性或慢性毒性作用的特征发现线索。

5. 数据处理和结果分析

亚慢性毒性试验和慢性毒性试验的所有的定量数据, 应按组别(必要时还按性别)以均数±标准差表示, 并注明其单位(法定单位)。根据数据的性质及其统计学分布, 选择适当的统计学方法, 进行各剂量组与阴性对照组的比较, 以说明剂量-反应关系。

有些化学物在染毒早期可引起机体某些脏器出现代偿性现象或某些酶出现诱导性活力改变, 而呈一过性变化, 对此应注意分析是否为损害作用。

在结果分析时要综合考虑统计学意义和生物学意义, 特别是结合剂量-反应关系来考虑, 才可能得到客观可靠的结论。染毒组某些参数如RBC、WBC、血小板计数、尿量等, 与阴性对照组比较很可能有统计学意义, 但如在正常范围内, 则无实际生物学意义; 由于目前实验毒理学还没建立公认的正常参考值, 这里指的正常范围不是来自某一文献资料, 而是指具体实验室自己的历史性阴性对照资料。相反, 有时虽无统计学意义, 如网织红细胞数如有增高趋势, 则应重视受试物对红细胞系的作用或引起溶血的可能性, 做进一步检查, 不能因无统计学意义而忽略其可能的毒性。

亚慢性毒性试验和慢性毒性试验主要目的是建立剂量-反应关系和得到观察到有害作用的最低剂量(LOAEL)及未观察到有害作用的剂量(NOAEL)。亚慢性和慢性毒性试验由于历时较长, 影响因素较多, 要得到一个理想的结果并不容易。例如, 一个亚慢性或慢性毒性试验, 设计了高、中、低三个剂量组和一个阴性(溶剂)对照组, 表6-9列出了9种可能的结果, 各剂量组的结果表示为“—”、“+”和“++”, 分别是与阴性对照组比较, 经统计学检验, “—”为差别无显著性($P > 0.05$), “+”为差异有显著意义 ($P < 0.05$), “++”为差别有非常显著的意义($P < 0.01$)。

表6-9 亚慢性和慢性毒性实验可能得到的结果举例

剂量组	结 果								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
高剂量	++	++	+	+	—	—	—	—	—
中剂量	+	+	+	—	—	—	+	+	—
低剂量	+	—	—	—	—	+	—	+	+

在这9种结果中, 第2种结果是最满意的。在第2种结果中, 低剂量为NOAEL, 中剂量为LOAEL, 而且有剂量-反应关系。第3、4、5种结果都还可以接受。第3种结果, 低剂量为NOAEL, 中剂量为LOAEL, 但剂量-反应关系不如第2种结果明显。第4种结果, 中剂量为NOAEL, 高剂量为LOAEL, 没有进一步的剂量-反应关系结果, 对高剂量组的阳性结果应仔细核实。第5种结果, 对高剂量组的阴性结果经仔细核实后, 如果高剂量组已达染毒的极限剂量, 则此结果可以接受, 并报告NOAEL为高剂量; 否则应提高剂量, 重新试验。

第1种结果是不理想的。此结果中虽然有剂量-反应关系, 但无法确定NOAEL, 也就不能确定LOAEL。由于慢性毒性试验耗费巨大, 当低剂量组阳性结果的指标在慢性毒性严重程度分级(表6-10)中分级较低时, 也可认为低剂量组为LOAEL, 制定安全限值应利用较大的不确定系数; 否则应该降低剂量, 重新试验。

第6~9种结果也不很理想,因为没有剂量—反应关系,这些阳性结果可能与个别动物的易感性差别有关,不具有生物学意义,应该用本实验室历史性对照值来进行统计学检验,并仔细地分析和评价。必要时应提高剂量,重新试验。

但如果与对照组比较差别有显著性而又无生物学意义的参数过多(如90天大鼠亚慢性毒性试验这样的参数达总参数数目的15%以上),应该认为该实验的质量保证存在问题。实际上,受试物的每一种毒性效应都可以得到剂量-反应关系,LOAEL及NOAEL,应综合判断。如某受试物大鼠亚慢性毒性试验在中剂量可引起肝损害,高剂量有肾损害和严重肝损害。则对肝损害来说NOAEL是低剂量,LOAEL是中剂量;而对肾损害来说NOAEL是中剂量,LOAEL是高剂量。结论是该受试物大鼠亚慢性毒性试验的NOAEL是低剂量,LOAEL是中剂量,靶器官是肝和肾。

在利用NOAEL及LOAEL来制定安全限值时,也应考虑到LOAEL的指标严重性,表6-10为慢性毒性指标严重性的分级值。对存在阈剂量的毒作用,阈剂量应在NOAEL及LOAEL之间,得到LOAEL的指标分级较低,制定安全限值时可选择较小的不确定系数。

表6-10 慢性毒性指标严重性的分级 (deRosa等, 1985)

1. 酶诱导或其他生化改变,无病理改变及脏器重量改变。
2. 酶诱导及细胞增生,或细胞器其他改变,但是无明显效应。
3. 增生、肥大、或萎缩。但无器官重量改变。
4. 增生、肥大、或萎缩,伴有器官重量改变。
5. 可逆性细胞改变、浊肿、水滴状变或脂肪变性。
6. 坏死、间变、器官功能无明显改变。神经病变但无行为、感觉或其他生理改变。
7. 坏死、萎缩、肥大或间变,检测到器官功能改变;神经病变伴有可测到的行为、感觉与生理改变。
8. 坏死、萎缩、肥大或间变,有肯定的器官功能改变;神经病变伴有明显的行为、感觉和生理活动改变;生殖机能受损,有胚胎毒性证据。
9. 严重的病及器官功能改变;任何神经病变伴有行为、感觉或运动功能的损害;失去生殖能力,对母体作用后造成致畸。
10. 致死,缩短寿命,母体无任何中毒表现时即致畸。

6. 亚慢性、慢性毒性作用评价

对亚慢性毒性进行评价时,应包括三个步骤:①明确化学物质的毒效应。通过全面观察、准确检测和综合分析,对接触化学毒物的个体和群体出现与对照组相比有统计学差异的有害效应以及剂量—反应关系或剂量—效应关系作出判断,确定机体出现的各种有害效应;②根据在试验早期和最低剂量组出现有统计学意义的指标变化,确定毒效应的敏感指标,并依据指标出现变化的情况来确定阈剂量和或最大无作用剂量。③根据阈剂量和 / 或最大无作用剂量,对化学毒物的亚慢性毒性作出评价。

慢性毒性评价的原则、内容与亚慢性毒性评价基本相同。根据毒作用的敏感指标,确定慢性阈剂量和 / 或最大无作用剂量以及慢性毒作用带,依据表 6-11 进行评价。对于易挥发的液态化学物,经呼吸道进入机体时,应参考慢性吸入中毒可能指数(risk index of chronic inhalation poisoning, Ich)进行危险性评价。Ich 是该化学物在 20℃时的蒸气饱和浓度与慢性阈浓度的比值($Ich = C_{20^\circ\text{C}} / Limch$)。Ich 越大,产生慢性吸入中毒的危险性越大,评价标准见表 6-11。

表 6-11 化学物危险性分级标准

分 级	急性作用危险性			慢性作用危险性		
	Iac	Limac	Zac	Ich	Limac	Zch

低度危险	<3	1.0~	54~	0~	0.1~	<2.5
中等危险	3~	0.1~	18~	10~	0.01~	2.5~
高度危险	30	0.01~	6~	100~	0.001~	5.0~
极度危险	300~	0.001~	<6	1000~	<0.001	10.0~

总之，在慢性毒性评价过程中，必须对整个试验期间的全部观察和检测结果，包括恢复期的观察和检测结果，进行全面的综合分析，结合化学毒物的理化性质、化学结构，应用生物学和医学的基本理论进行科学的评价，为阐明化学毒物的慢性毒作用性质、特点、毒作用类型、主要靶器官及中毒机制提供参考。

第三节 蓄积毒性

一、化学物质的蓄积作用

外源化学物进入机体后，经过代谢转化排出体外，或直接排出体外。但是当其连续地、反复地进入机体，而且吸收速度超过代谢转化与排泄的速度时，化学物质在体内的量逐渐增加，称为化学物质的蓄积作用(accumulation)。

外源化学物的蓄积作用是发生慢性毒性的基础。慢性毒性可以是因外源化学物或其代谢产物的物质蓄积，但有的化学物质，经长期接触后在机体内测不出该化学物质的原形或其代谢产物，可却出现了慢性毒性作用时，称之为损伤蓄积(也有称为功能蓄积)。

二、蓄积作用的研究方法

蓄积作用的研究方法有多种，常用的方法有蓄积系数法和生物半减期法。

1. 蓄积系数法 蓄积系数法是一种检测生物效应的试验方法。这种方法简便，但是不易区分是物质蓄积，还是损伤蓄积。这种方法的基本原理是在一定期限之内，以低于致死剂量的受试物，每日给予实验动物，直至出现某种预计效应为止。计算达到此预计效应的累积剂量，求此累积剂量与一次接触该化学物质产生相同效应的剂量的比值，此比值就是蓄积系数(K值)。蓄积试验多用小鼠或大鼠为实验动物，一般以死亡为效应指标，K值计算公式如下：

$$K = LD_{50}(n) / LD_{50}(1)$$

式中 $LD_{50}(n)$ 表示给实验动物该受试物多次染毒，实验动物死亡一半时，受试物染毒剂量的总和。式中 $LD_{50}(1)$ 表示给实验动物该受试物一次染毒的 LD_{50} 剂量。蓄积系数 $K < 1$ 为高度蓄积， $1 \sim$ 为明显蓄积， $3 \sim$ 为中等蓄积， $5 \sim$ 为轻度蓄积。蓄积系数法的具体实验方案主要有两种。

(1) 固定剂量法：啮齿类动物分成两组，每组动物20只。一组为对照组，一组为染毒组。染毒组每天定量地、相同途径给予受试物质，染毒剂量可以选择 LD_{50} 剂量的 $1/20$ 至 $1/5$ 之间，每日观察累积染毒组动物的死亡数，直至累积发生一半实验动物死亡为止。计算累积总染毒剂量，求出K值，进行评价。如染毒剂量已累积达到5个 LD_{50} ，而实验动物仍未死亡一半，甚或没有死亡，就可终止试验，此时 $K > 5$ 。

(2) 定期递增剂量法：同上法，染毒组开始按 $0.1LD_{50}$ 剂量给予受试化学物质，以4天为一期，以后每期给予的受试化学物质的剂量按等比级数(1.5倍)逐期递增，见表6-12。此方法试验最长只需要28天，但是在染毒20天后也可以结束试验，因此时累计剂量已达 $5.3LD_{50}$ 。在试验期中，只要试验动物死亡数累积已达一半，便可随时终止试验，计算其累积剂量，求出K值，进行评价。

表6-12 定期递增剂量法染毒剂量表

接触天数	1~4天	5~8天	9~12天	13~16天	17~20天	21~24天	25~28天
------	------	------	-------	--------	--------	--------	--------

每天接触剂量(LD ₅₀)	0.1	0.15	0.22	0.34	0.50	0.75	1.12
四天接触总剂量(LD ₅₀)	0.4	0.6	0.9	1.4	2.0	3.0	4.5
累积接触总剂量(LD ₅₀)	0.4	1.0	1.9	3.3	5.3	8.3	12.8

由于死亡不是慢性毒性的主要效应指标,目前,已较少应用蓄积系数法,而是直接进行亚慢性和慢性毒性试验,以及毒物动力学研究。

2. 生物半衰期法 生物半衰期(biological halftime, $t_{1/2}$)法是用毒物动力学原理阐明外源化学物在机体内的蓄积作用特性。 $t_{1/2}$ 反映了外源化学物从机体消除的速度, $t_{1/2}$ 短,从机体消除快。如外源化学物吸收速度超过消除速度时,就引起化学物的蓄积。一般,在等间距、等剂量染毒的条件下,化学物在体内经5~6个生物半衰期即可达到蓄积极限,此时理论蓄积量为极限值的96.9~98.4%。此后继续染毒蓄积量也基本上不再增加。

蓄积极限量=每日吸收量 $\times t_{1/2} \times 1.44$ 。

(史永亮 张文斌 高双斌)