



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 16886.10—2005/ISO 10993-10:2002  
代替 GB/T 16886.10—2000

---

## 医疗器械生物学评价 第10部分： 刺激与迟发型超敏反应试验

Biological evaluation of medical devices—Part 10: Tests for irritation and  
delayed-type hypersensitivity

(ISO 10993-10:2002, IDT)

2005-03-23 发布

2005-12-01 实施

---

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布  
中国国家标准化管理委员会

## 目 次

前言 .....	III
引言 .....	V
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 总则与评价程序 .....	3
5 试验前的考虑 .....	3
6 刺激试验 .....	4
7 迟发型超敏反应试验 .....	11
8 解释试验结果的关键因素 .....	16
附录 A (规范性附录) 刺激和致敏试验用材料的制备 .....	17
A.1 总则 .....	17
A.2 直接接触材料 .....	17
A.3 试验材料浸提液 .....	17
A.4 溶剂 .....	17
A.5 无菌试验材料 .....	17
附录 B (资料性附录) 其他刺激试验 .....	18
B.1 总则 .....	18
B.2 皮内反应试验 .....	18
B.3 眼刺激试验 .....	20
B.4 口腔刺激试验 .....	23
B.5 阴茎刺激试验 .....	26
B.6 直肠刺激试验 .....	27
B.7 阴道刺激试验 .....	29
附录 C (资料性附录) 背景信息 .....	31
C.1 刺激试验背景信息 .....	31
C.2 致敏试验在迟发型超敏反应方面的背景信息 .....	31
参考文献 .....	34

## 前 言

GB/T 16886 的本部分等同采用国际标准 ISO 10993-10:2002《医疗器械生物学评价——第 10 部分:刺激与迟发型超敏反应试验》。

本部分经技术修订取代 GB/T 16886.10—2000,主要修订内容如下:

- 修改了“总则与评价程序”;
- 增加了“试验前的考虑”;
- 增加了“人体皮肤刺激试验”;
- 修改了“迟发型超敏反应试验”;
- 将“皮内反应试验”和“眼刺激试验”由原标准正文中改为放在附录 B 中,作为特定部位应用医疗器械的适用刺激试验;
- 将原标准中附录 A 和附录 B 的内容进行了综合修改,标题为“刺激和致敏试验用材料的制备”;
- 修改了“背景信息”;
- 取消了原标准附录 C。

GB/T 16886 的总题目是《医疗器械生物学评价》,由下列部分组成:

- 第 1 部分:评价与试验;
- 第 2 部分:动物保护要求;
- 第 3 部分:遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验;
- 第 4 部分:与血液相互作用试验选择;
- 第 5 部分:体外细胞毒性试验;
- 第 6 部分:植入后局部反应试验;
- 第 7 部分:环氧乙烷灭菌残留量;
- 第 8 部分:生物学试验参照材料的选择与定量指南;
- 第 9 部分:潜在降解产物的定性与定量框架;
- 第 10 部分:刺激与迟发型超敏反应试验;
- 第 11 部分:全身毒性试验;
- 第 12 部分:样品制备与参照样品;
- 第 13 部分:聚合物医疗器械的降解产物的定性与定量;
- 第 14 部分:陶瓷降解产物的定性与定量;
- 第 15 部分:金属与合金降解产物的定性与定量;
- 第 16 部分:降解产物和可溶出物的毒代动力学研究设计;
- 第 17 部分:可溶出物允许限量的确立;
- 第 18 部分:材料化学表征。

有关其他方面的生物学试验将有其他部分的标准。

本部分是诸多标准和准则的协调产物,其中包括 BS 5736、OECD 准则、美国药典和欧洲药典。本部分为试验选择和实施的基本指南文献,以对医疗器械和材料安全性有关的刺激和皮肤致敏反应做出评价。

附录 A 为规范性附录,附录 B 和附录 C 为资料性附录。

本部分由国家食品药品监督管理局提出。

本部分由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会归口。

本部分起草单位：国家食品药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心。

本部分主要起草人：由少华、钱承玉、朱雪涛、黄经春、王昕、王科镭。

## 引 言

本部分用于评价从医疗器械中释放出的化学物质可能引起的接触性危害,包括导致皮肤与黏膜刺激、眼刺激和迟发型接触超敏反应。

医疗器械中所含有的某些材料已进行过试验,其潜在的皮肤、黏膜刺激或致敏作用已被确认。其他一些未做过试验的材料及其化学成分在与生物组织接触时可能会产生不良作用。制造商有责任在投放市场前评价器械的潜在不良作用。

传统上,人体试验之前要先进行小动物试验,以有助于预测人体反应。最近,还增加了可供选择的体外试验以及人体试验。尽管在这方面已做了很大努力并取得了一些进展,但结果显示目前所设计的体外试验尚不能令人满意,因此还不能够取消体内试验。本部分鼓励在适当的时机将体外预试方法作为动物试验前的筛选试验。为了减少所用动物数量,本部分提出循序渐进的方法,在每一阶段都对试验结果进行分析和评价。人体试验之前一般要求先进行动物试验。

进行这些研究时应遵循实验室质量管理规范并遵守与动物保护有关的规则。建议对数据进行统计学分析,而且在适宜的情况下予以引用。

GB/T 16886 的本部分所包括的试验是安全产品开发的重要工具,由受过培训的人员进行试验并解释试验结果。

## 医疗器械生物学评价 第 10 部分： 刺激与迟发型超敏反应试验

### 1 范围

GB/T 16886 的本部分描述了医疗器械及其组成材料潜在刺激和迟发型超敏反应的评价步骤。

GB/T 16886 的本部分包括：

- a) 试验前的考虑；
- b) 试验步骤，以及
- c) 结果解释的关键因素。

附录 A 给出了与上述试验有关的特定材料制备说明。

附录 B 给出的补充试验明确要求适用于皮内注射的器械，以及在眼、口腔、直肠、阴茎、阴道部位使用的器械。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 16886 本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第 1 部分：评价与试验(GB/T 16886.1—2001, idt ISO 10993-1:1997)

GB/T 16886.2 医疗器械生物学评价 第 2 部分：动物保护要求(GB/T 16886.2—2000, idt ISO 10993-2:1992)

GB/T 16886.9 医疗器械生物学评价 第 9 部分：潜在降解产物的定性和定量框架(GB/T 16886.9—2001, idt ISO 10993-9:1999)

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第 12 部分：样品制备与参照样品(GB/T 16886.12—2004, idt ISO 10993-12:2002)

GB/T 16886.13 医疗器械生物学评价 第 13 部分：聚合物医疗器械的降解产物的定性与定量(GB/T 16886.13—2001, idt ISO 10993-13:1998)

GB/T 16886.14 医疗器械生物学评价 第 14 部分：陶瓷降解产物的定性与定量(GB/T 16886.14—2003, idt ISO 10993-14:2001)

GB/T 16886.15 医疗器械生物学评价 第 15 部分：金属与合金降解产物的定性与定量(GB/T 16886.15—2003, idt ISO 10993-15:2000)

ISO 10993-18 医疗器械生物学评价——第 18 部分：材料化学表征

ISO 14155-1:2002 用于人体的医疗器械的临床试验——第 1 部分：通用要求

ISO 14155-2:2003 用于人体的医疗器械的临床试验——第 2 部分：临床试验方案

### 3 术语和定义

GB/T 16886.1 确立的以及下列术语和定义适用于 GB/T 16886 的本部分。

3.1

**变应原 allergen**

**致敏原 sensitizer**

能引起特异性超敏反应的物质/材料,当再次接触同一种物质(材料)时产生变态反应。

3.2

**空白液 blank liquid**

制备试验样品的同一种溶剂,不加试验材料以相同的方式处理,用于测定溶剂的背景反应。

3.3

**激发 challenge/elicitation**

诱导阶段后的过程,在这一阶段检验个体再次接触诱导材料的免疫学反应。

3.4

**腐蚀 corrosion**

组织结构的缓慢破坏。

注:如某种强刺激物的作用。

3.5

**迟发型超敏反应 delayed-type hypersensitization**

个体接触一种变应原产生特异性 T 细胞介导的免疫学记忆感应,在再次接触该变应原后引起迟发型超敏反应。

3.6

**剂量 dose**

对试验系统的一次给样量。

3.7

**红斑 erythema**

皮肤或黏膜发红。

3.8

**焦痂 eschar**

皮肤结痂或变色的腐痂。

3.9

**诱导 induction**

个体对特定材料免疫学反应的一种变异状态生成的过程。

3.10

**刺激物 irritant**

引起刺激的物质。

3.11

**刺激 irritation**

一次、多次或持续与一种物质(材料)接触所引起的局部非特异性炎症反应。

3.12

**坏死 necrosis**

单细胞或多细胞死亡、组织或器官的一部分死亡所导致的不可逆损伤。

3.13

**阴性对照 negative control**

当按规定步骤试验时,在试验系统中出现可再现的适当的阴性、无反应或背景反应,证明试验步骤适宜性的材料或物质。

## 3.14

**水肿 oedema**

液体向组织内异常渗透引起的肿胀。

## 3.15

**阳性对照 positive control**

当按规定步骤试验时,在试验系统中出现可再现的适当的阳性或反应性应答,证明试验步骤适宜性的材料或物质。

## 3.16

**溶剂 solvent**

用于湿化、稀释、悬浮、浸提或溶解试验物质的材料或物质。

示例:化学制剂、介质、培养基等。

## 3.17

**试验材料 test material**

供生物学或化学试验用的材料、器械、器械的一部分或组件。

## 3.18

**试验样品 test sample**

用于生物学或化学试验的浸提液或试验材料的一部分。

## 3.19

**溃疡 ulceration**

表浅组织缺损引起的开放性病变。

## 4 总则与评价程序

用于检验刺激与致敏的试验方法设定为测定潜在的皮肤刺激与致敏作用,这些试验一般不预示其他类型的不良作用。

本部分规定了评价程序,应包括下列一项或多项:

- 按照 GB/T 16886.9、GB/T 16886.13、GB/T 16886.14、GB/T 16886.15 和 ISO 10993-18 的基本原则,对试验材料进行鉴别,即对试验样品进行化学表征和分析;
- 文献检索,包括对试验材料化学和物理性能的评价、任何产品组分的潜在刺激和致敏信息,以及化学物和材料的材料结构方面的信息;
- 体内试验之前先考虑体外试验,若新的体外法具有适用性并被认可时,可取代体内试验。目前体外试验尚未得到认可(单纯性筛选除外)用于检测刺激物或致敏物;
- 体内动物试验;

注:对在 a) 或 b) 阶段没有被确定为强刺激物或致敏物的材料进行急性体内动物研究。对单次接触未证实急性皮肤刺激的材料可再反复接触后做出进一步评价。

实验室应至少每 6 个月进行一次皮肤致敏阳性对照物质试验<sup>[7]</sup>,以确认试验系统并证实阳性反应。

- 无创性人体试验(临床试验)。

如材料经证实对动物无刺激、无致敏或无毒性,可考虑进行人体皮肤刺激研究。

## 5 试验前的考虑

## 5.1 总则

需要强调的是试验前的考虑是非常重要的,其结果可能是无需进行刺激和(或)致敏试验。

GB/T 16886.1—2001 第 5 章中给出的和下列条款的要求是适用的。



## 5.2 材料类型

### 5.2.1 基本考虑

应考虑在医疗器械制造和装配期间可能用做加工助剂(如润滑剂或脱模剂)的其他化学成分。原材料的新增化学成分和制造加工助剂、装配粘合剂/溶剂残留物以及灭菌残留物或灭菌过程所致的反应性产物可能存在于成品中,这些成分是否产生健康危害(风险)取决于成品的渗漏或降解性能。

### 5.2.2 陶瓷、金属和合金

这些材料在化学成分数量方面一般比聚合物和生物衍生材料简单。

### 5.2.3 聚合物

这类材料在化学成分方面比 5.2.1 所列物一般要复杂一些,可能有若干添加剂,而且整个聚合反应可能会有变化。

### 5.2.4 生物衍生材料

这类材料在其成分方面特别复杂,也常含有加工残留物,如交联剂和抗生素。生物材料样品之间的成分可能是不一致的。

本部分中的方法不是设计为检验生物衍生材料,因此不适用于该类材料,例如本部分中的试验未考虑交叉致敏作用。

## 5.3 化学成分方面的信息

### 5.3.1 总则

应确立材料化学成分方面的完整的定性数据,也应获取与生物安全性相关的信息及定量数据。如没有定量数据,应用文件形式说明并确认。

### 5.3.2 已有的数据资料

可能的情况下应从原材料供应商处索取化学成分方面的定性及定量信息。

聚合物常要求专利信息的使用权,应签署转让和使用这种机密信息的条款。

还应从产品制造的系列制造厂(包括半成品和零件制造厂)索取其他一些生产过程中的添加剂(如脱模剂)的定性信息。

在没有任何化学成分数据的情况下建议研究文献,以确定原材料和添加剂的大概特性,这样有助于选择相关材料最适宜的分析方法。

注:陶瓷、金属和合金成分可依据国际标准或美国试验材料协会(ASTM)标准,和(或)依据用户的规定,但为了获取完整的成分定性及定量资料,可能还要求原材料供应商或制造厂以及零件制造厂提供这些信息,以保证能鉴别加工助剂。能够获取这些数据的另一来源是主管部门掌控的材料文件。

## 5.4 材料鉴别

在产品制造过程中,如没有详细的成分信息、或仅有定性信息、或可能是正待开发的新材料或未知物,在这种情况下可能需要进行材料分析。

应在研究的基础上采用适合于材料的分析方法,全部分析技术应经过论证、确认并报告。如不知材料(化学溶液)的 pH 值,可能的情况下在体内或体外试验前应进行测定。浸提液的化学分析(定性和定量)可给出有用的信息,在这里仍要强调的是浸提液的化学分析得出的结论可能是无需再进行刺激和致敏试验,因为浸提液中化学成分的潜在刺激与致敏作用信息也许是已知的。

## 6 刺激试验

### 6.1 体外刺激试验

有两个体外试验,即大鼠皮肤经皮电阻抗(TER)试验和 EPISKIN 试验,已被国际间认可用于评价化学物皮肤腐蚀性的替代试验,但是尚无认可的评价皮肤刺激性的体外方法。

各国际和国家组织一直在进行皮肤刺激体外试验的建立和确认工作并研究替代方法,也有些团体正在研究试验方法中动物和人反应的量化指标,以能够应用无创技术更好地限定终点(见 C.1)。

## 6.2 体内试验设计和选择中应考虑的因素

医疗器械的刺激试验可用成品和(或)其浸提液进行。

影响刺激试验结果的因素包括:

- a) 器械用于斑贴试验时的特性;
- b) 试验材料的剂量;
- c) 试验材料的应用方法;
- d) 封闭的程度;
- e) 接触部位;
- f) 接触时间和接触天数;
- g) 评价试验所采用的技术。

附录 C 提供了其他背景信息。

尽管增加了灵活性使研究者能提高试验的敏感性,可以适应各种使用和人群接触条件,但试验步骤的一致性确保不同材料试验结果和不同实验室试验结果具有可比性的基本保证。

评价多次和(或)长期接触的器械和材料的要求已包括在试验步骤中,试验设计应高于预期的实际临床接触条件[时间和(或)浓度],在解释试验结果时应注意到该因素。

试验材料的 pH 值如小于等于 2 或大于等于 11.5,应认为是一种刺激物,不必进一步试验。但同时试验结果也显示,试验材料的酸碱度并非是导致严重损伤的惟一因素,试验材料的浓度、接触时间及其他理化性能等也都是至关重要的因素。

注:预期广泛应用于正常和损伤皮肤的产品一般不允许对皮肤有实质性危害;然而对有些产品,由于其使用所带来的受益或其预期的生物学活性,则无论有无潜在的刺激作用,也是可以接受的。

## 6.3 动物皮肤刺激试验

### 6.3.1 目的

采用相关动物模型对材料在试验条件下产生皮肤刺激反应的潜在性做出评价。

家兔为首选试验动物。

### 6.3.2 试验材料

固体或液体试验材料应按附录 A 规定进行制备。

为了证实试验的敏感性,每只动物最好设有阴性对照和阳性对照。每只动物体上分别有两个试验材料区域和两个对照材料区域,试验材料和对照材料的试验剂量和所用的浸提介质应相同。

### 6.3.3 动物与管理

应使用健康、初成年的白化兔,雌雄不限,同一品系,体重不低于 2 kg。

应使动物适应环境,并按 GB/T 16886.2 的规定饲养。

如预期有刺激反应,初试应考虑使用 1 只动物。如没有出现明显的阳性反应[红斑或水肿记分大于 2(见表 1)]时,应至少再使用 2 只动物进行试验。如预期无反应,初试可使用 3 只动物。在使用了至少 3 只动物后,如仍为疑似反应或不明确,应考虑进行复试。

### 6.3.4 试验步骤

#### 6.3.4.1 动物准备

动物的皮肤状况是试验的关键因素,只能使用皮肤健康无损伤的动物。一般在试验前 4 h ~ 24 h 将动物背部脊柱两侧被毛除去(约 10 cm × 15 cm 区域),作为试验和观察部位。为了便于观察和(或)再次试验,可能需反复除毛。如果脱毛剂经确认使用简便,可由专业人员使用脱毛剂除毛。如需反复接触,按照下列 6.3.4.2、6.3.4.3 或 6.3.4.4 步骤进行,时间最长为 21d。

#### 6.3.4.2 粉剂或液体样品的应用

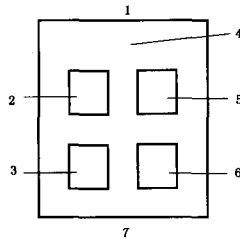
将 0.5 g 或 0.5 mL 的试验材料直接置于图 1 所示皮肤部位。固体和疏水性材料无需湿化处理,粉剂使用前宜用水或其他适宜的溶剂稍加湿化(见附录 A)。

用 2.5 cm×2.5 cm 透气性好的敷料(如吸收性纱布块)覆盖接触部位,然后用绷带(半封闭性或封闭性)固定敷贴片至少 4 h。接触期结束后取下敷贴片,用持久性墨水对接触部位进行标记,并用适当的方法除去残留试验材料,如用温水或其他适宜的无刺激性溶剂清洗并拭干。

6.3.4.3 浸提液和浸提介质的应用

将相应的浸提液滴到 2.5 cm×2.5 cm 大小的吸收性纱布块上,浸提液的用量以能浸透纱布块为宜,一般每块纱布滴 0.5 mL,按图 1 所示部位敷贴于动物背部两侧。按图 1 所示将滴有浸提介质的纱布块敷贴在对照接触部位。

用绷带(半封闭性或封闭性)固定敷贴片至少 4 h。接触期结束后取下敷贴片,用持久性墨水对接触部位进行标记,并用适当的方法除去残留试验材料,如用温水或其他适宜的无刺激性溶剂清洗并拭干。



- 1——头部;
- 2——试验部位;
- 3——对照部位;
- 4——去毛的背部区域;
- 5——对照部位;
- 6——试验部位;
- 7——尾部。

图 1 皮肤应用部位

6.3.4.4 固体样品应用

按图 1 所示,将试验材料样品直接接触兔脊柱两侧的皮肤。对照样品同法应用。检测固体物时(必要时可研成粉末),试验材料可用水或选择一种溶剂充分湿化以保证与皮肤良好的接触性(见附录 A)。如使用溶剂,应考虑溶剂本身对皮肤的刺激作用,这种影响应与试验材料所致的皮肤反应相区别。

用 2.5 cm×2.5 cm 的透气性好的敷料(如纱布块)覆盖材料接触部位,然后用绷带(半封闭性或封闭性)固定敷贴片至少 4 h。接触期结束后取下敷贴片,用持久性墨水对接触部位进行标记,并用适当的方法除去残留试验材料,如用温水或其他适宜的无刺激性溶剂清洗并拭干。

6.3.5 动物观察

6.3.5.1 总则

推荐在自然光线或全光谱灯光下观察皮肤反应。按表 1 给出的记分系统描述每一接触部位在每一规定时间内皮肤红斑和水肿反应情况并评分,记录结果以出具试验报告。

注:在某些情况下,采用组织学或无创性方法可能有助于对皮肤反应的评价。

6.3.5.2 单次接触试验

单次接触试验时,在除去敷贴片后 1 h、24 h、48 h 和 72 h 记录各接触部位情况。如存在持久性损伤有必要延长观察时间,以评价这种损伤的可逆性或不可逆性,但延长期不必超过 14 d。

### 6.3.5.3 多次接触试验

多次接触试验应仅在急性单次接触试验完成后进行(至少在观察 72 h 后)。

多次接触试验时,每次在除去敷贴片后 1 h 以及再次接触前记录接触部位情况。接触次数可不限。

末次接触后,除去敷贴片后 1 h、24 h、48 h 和 72 h 记录各接触部位情况。如有持久性损伤可能需要延长观察时间,以评价这种损伤的可逆性或不可逆性,但不必超过 14 d。

### 6.3.6 结果评价

单次接触试验按下列规定确定原发性刺激指数(PII)。

仅使用 24 h、48 h 和 72 h 的观察数据进行计算。试验之前或 72 h 后的恢复观察数据不用于计算。

将每只动物在每一规定时间试验材料引起的红斑与水肿的原发性刺激记分相加后再除以观察总数之和(每一试验部位的 1 个观察数据包括红斑和水肿两个记分)。当采用空白溶液或阴性对照时,计算出对照原发性刺激记分,将试验材料原发性刺激记分减去该记分,即得出原发性刺激记分。该值即为原发性刺激指数。

多次接触试验按下列规定计算累积刺激指数。

将每只动物在每一规定时间的红斑和水肿刺激记分相加后再除以观察总数,即为每只动物刺激记分。

全部动物刺激记分相加后再除以动物总数即得出累积刺激指数。

将累积刺激指数对照表 2 限定的刺激反应,报告相应的反应类型。

注:累积刺激指数类型是根据化学药品在家兔试验中得出的原发性刺激指数(PII),以及在人体试验中得出的原发性刺激反应两者结合而确定的。

记录每只动物的任何反应,包括表 1 范围内的最大原发性刺激记分、反应发生时间和最长反应时间。

表 2 用数字(记分)和文字(反应类型)说明了原发性或累积性刺激指数。在用不同剂量的浸提液试验时,以其给出的最高 PII 来确定反应类型。

表 1 皮肤反应记分系统

反 应	原发性刺激记分
红斑和焦痂形成	
无红斑	0
极轻微红斑(勉强可见)	1
清晰红斑	2
中度红斑	3
重度红斑(紫红色)至焦痂形成	4
水肿形成	
无水肿	0
极轻微水肿(勉强可见)	1
清晰水肿(肿起,不超出区域边缘)	2
中度水肿(肿起约 1 mm)	3
重度水肿(肿起超过 1 mm,并超出接触区)	4
刺激最高记分	8
注:记录并报告皮肤部位的其他异常情况。	

表 2 免刺激反应类型

平均记分	反应类型
0 ~ 0.4	极轻微
0.5 ~ 1.9	轻度
2 ~ 4.9	中度
5 ~ 8	重度

### 6.3.7 试验报告

试验报告应包括：

- a) 试验材料或器械的描述；
- b) 试验材料或器械的预期用途/应用；
- c) 制备试验样品或试验材料所用方法的详细描述；
- d) 试验动物的描述；
- e) 试验部位接触方法和绷带材料类型(半封闭或封闭式)；
- f) 试验部位标记方式和读数；
- g) 观察记录；
- h) 接触量和接触周期,多次接触时每次均记录；
- i) 结果评价。

### 6.4 人体皮肤刺激试验

#### 6.4.1 简介

迄今为止主要依赖用试验动物(见附录 C)来推测人体皮肤刺激,以鉴别造成的危害。然而,由动物外推至人存在许多问题。对人体接触程度高的化学物(例如化妆品和洗涤剂)进行风险性评价时通常采用人体皮肤斑贴试验。

人体研究能达到以下几种目的：

- a) 通过在人体而非实验动物检验化学物可直接鉴别出对人体的危害；
- b) 为人体接触程度高的化学物提供风险性评价；
- c) 便于用先前已获取的实验动物研究数据推测人体应用。

GB/T 16886 的本部分允许直接从人体获取皮肤刺激数据,以鉴别产生的危害。本部分的目的是,确定在急性接触某种材料后是否存在明显的皮肤刺激危害。

临床试验应按 ISO 14155-1 和 ISO 14155-2 规定进行。

注:C.1 给出了更多的刺激试验信息。

#### 6.4.2 初步考虑

应获取关于材料毒性方面和材料化学组分(与毒性相关的)的充分信息,包括经由皮肤吸收数据,以能预示人体研究不存在明显健康风险。

在下列情况下不应将材料试验于人体：

- a) 在体外或体内预测时,材料已显示出有刺激性；
- b) 在体外或体内预测时,材料已显示出有腐蚀性；
- c) 根据结构-活性关系和(或)物理化学特性(如强酸或强碱余量),可预测出材料对人体皮肤的潜在腐蚀性；
- d) 材料具有引起皮肤或呼吸道致敏反应的风险；
- e) 在试验条件下材料可产生急性毒性危害;和(或)
- f) 材料可产生遗传毒性、生殖毒性或致癌性危害。

志愿者选择指南见 6.4.5.1 和第 C.1 章。

### 6.4.3 原理

将供试材料单次剂量贴敷于志愿者皮肤上封闭。试验材料短期接触皮肤以使刺激反应保持在最低限度,但在某些情况下,较长的接触期可能也适用。

本试验通过测定志愿者中出现皮肤刺激反应的比例来进行评价,这些反应与阳性对照材料引起的反应具有相关性。

### 6.4.4 试验方法描述

#### 6.4.4.1 志愿者选择

本试验设计用于健康的志愿者。选择的志愿者应至少 18 岁,无孕并不在哺乳期。此外不应选择已知对试验材料过敏或有皮炎症状的人员作为志愿者。选择志愿者的过程应由皮肤病专家或其他有资格的人员进行监督。

#### 6.4.4.2 剂量制备

液体试验材料通常使用时不稀释。检验固体材料时,可用少量水(通常 0.2 mL)或在必要时用其他适宜的介质湿润试验材料,以保证试验材料与皮肤良好的接触性。应考虑固体材料的结构并应证实所用试验材料制备方法的合理性。使用湿润过的样品时应注意保证每一受试者接受试验材料的剂量相同。试验中每一受试者湿润用水量应相同并记录用水量。

使用介质时,应考虑到介质对试验材料引起的皮肤刺激反应的影响。当使用除水之外的介质作为固体材料的湿润剂时,应考虑给每一受试者设置空白液体(介质对照)贴敷。

#### 6.4.4.3 步骤

##### 6.4.4.3.1 志愿者人数

本试验应至少由 30 名志愿者组成,其中,男性或女性所占比例不能少于三分之一。

##### 6.4.4.3.2 试验材料应用

将试验材料贴敷于人体皮肤的适宜位置,如上臂外侧,然后用带有纱布块的封闭性包扎带固定。志愿者的应用部位应相同并应记录。敷贴片直径一般应至少为 1.8 cm,最好是 2.5 cm。采用适宜的无刺激性敷料及胶带固定敷贴片,使其在试验期间能与皮肤接触。

敷贴片应向皮肤单位面积内施加足够的试验材料剂量,一般认为约  $50 \text{ mg/cm}^2 \sim 100 \text{ mg/cm}^2$  为宜。在应用液体试验材料时,通常向纱布片上滴加 0.2 mL~0.4 mL,直至其湿润。试验固体材料时则将 0.2 g 试验材料湿润后加到纱布块上,或者将纱布块湿润使试验材料覆盖整个试验部位。

##### 6.4.4.3.3 接触时间

为了避免不可接受的强烈反应,应采用谨慎的方法进行试验。连续贴敷过程会产生阳性反应,但并非严重的刺激反应。可逐渐增加敷贴片接触时间,从 15 min 和 30 min 开始,直至 1 h、2 h、3 h 和 4 h。如有足够的迹象表明接触 1 h 不会引起强烈反应,则可省略 15 min 和(或)30 min 的接触时间段。在短期接触未产生皮肤刺激反应(至少评价至试验后 48 h)的情况下,可在另外一个新的皮肤部位进行长期贴敷,包括 24 h 在内的封闭性贴敷,以保证能充分评价迟发型刺激反应。

长期接触试验时要将试验材料贴敷在未试验过的皮肤部位。

接触期结束后应除去残余的试验材料,可采用水或其他不改变表皮当前反应或整体状况的适宜溶剂。

##### 6.4.4.3.4 短期接触

除了按 6.4.4.3.3 的描述逐渐增加应用时间外,如怀疑材料可能会导致严重的刺激反应,应减少接触时间,可在小规模志愿者组试验。根据得出的数据确定试验进程,随后再敷贴片应在 48 h、72 h 读数后进行。

##### 6.4.4.3.5 临床观察和皮肤反应等级

检查敷贴部位是否有刺激反应迹象。除去敷贴片后立即对反应分级,并分别在 1 h~2 h、24 h、48 h 和 72 h 时对反应分级。必要时要测定反应的可逆性,观察期可超过 72 h。此外,应准确描述试验前后

皮肤的状况(如色素沉着和水合程度)。按照表3对皮肤刺激反应分级并记录。

可使用无创性生物工程方法(见附录C)。

表3 人体皮肤刺激试验分级

反应描述	等级
无反应	0
微弱阳性反应(轻微红斑和(或)接触区域大面积干燥)	1
中度阳性反应(明显的红斑或干燥,可能超出接触区)	2
重度阳性反应(重度及扩散性红斑伴水肿和(或)焦痂形成)	3

有些志愿者在接触时间少于4h时即产生1级或1级以上的反应,则可推知如接触试验材料4h时将会出现更强的反应。志愿者一旦出现了1级或更严重的反应,就没有必要再进行试验,但可能还需继续进行观察,以对志愿者进行适当的护理。除了观察刺激反应外,还应对其他反应进行记录并充分描述。例如,在除去敷贴片后,应培训志愿者就敷贴接触发表意见(如感觉方面),并还应培训评价者注意即时反应(如荨麻疹)。这些观察并不一定表明有刺激反应,但如果注意到了这些现象就应写入到试验报告中。如果这些现象很明显,在试验中就应对此加以考虑,以保证志愿者得到适当的护理。

获得的判定数据是志愿者接触试验材料4h时发生或预期发生皮肤刺激反应的数量。个体发生反应(如果有)所需的时间不作为评价结果的一部分,仅用于使志愿者能得到适当的护理。

6.4.4.3.6 阳性对照物质选择说明

由于人体对刺激物的反应各异,所以试验应包括阳性对照,以测定试验组检测试验物质刺激反应的适用性。最好使用20%的十二烷基硫酸钠(SDS)作为阳性对照,其刺激作用已有定论(见第C.1章)。其他对照物经确认后也可使用。

可用常规阳性对照作为试验参照。皮肤刺激反应并非一种绝对现象,所有的材料都能引起皮肤刺激,只是取决于剂量多少和接触性质及程度大小的问题。因此,人体皮肤刺激试验一般要进行比较,并与已知的化学刺激性联系起来进行评价。

6.4.5 数据和报告

6.4.5.1 数据

应采用表格形式对包括阳性和阴性对照材料结果在内的数据进行总结,显示出除去敷贴片后24h、48h和72h时每个志愿者的刺激反应得分和观察到的任何其他反应。

6.4.5.2 数据评价(解释)

本试验的目的是测定材料在急性接触时是否具有明显的皮肤刺激潜在危害。因此,如果材料在受试者中引起皮肤刺激反应的频率等于或高于阳性对照,则认为该材料为明显的皮肤刺激物。另一方面,如材料在受试者中引起皮肤刺激的频率确实明显小于阳性对照,则不认为是明显的皮肤刺激物。值得注意的是,不应将志愿者护理过程中产生的临时数据与终点数据相混淆,终点数据即指受试者显示刺激反应的比率。同时还要结合试验材料的一般性刺激潜力,注意不要混淆个别志愿者在皮肤刺激敏感性方面的差异。

6.4.5.3 试验报告

试验报告应包括下列信息:

- a) 伦理方面的考虑和志愿者自愿的确认;
- b) 试验材料:
  - 物理性质和相关的理化特性;
  - 鉴别数据;
- c) 介质;

——鉴别并论证湿润固定试验材料时选用的介质；

d) 志愿者；

——应用试验材料的志愿者的人数；

——志愿者的年龄、性别分布情况；

e) 结果；

——在 0 h、1 h、2 h、24 h、48 h 和 72 h 时的反应率和在其他时间的反应得分；

——每一观察时间段内每一志愿者的刺激反应数据列表（在除去敷贴片后 24 h、48 h 和 72 h 时刺激反应率的总结）；

——对观察到的所有刺激反应的描述；

——对观察到的其他非刺激反应的描述；

——结果的统计学处理（与阳性对照的对比，如用 Fisher's 试验）；

——如果在人体试验之前进行过体外或体内动物试验，应对其进行描述并加以参考，包括详细步骤、试验和对照材料检验结果；

f) 结果讨论。

## 7 迟发型超敏反应试验

### 7.1 试验选择

用于测试迟发型超敏反应最常用的两种方法是豚鼠最大剂量试验（GPMT）和封闭式贴敷试验（Buehler 试验）。

最大剂量试验为最敏感的方法，首选用于单一化学物。有报告说明本法也适用于浸提液的评价，但其主要的价值还是在于已被充分证实适用于检验单一化学物。最近，国际间已接受鼠科动物局部淋巴结测定（LLNA）作为豚鼠试验<sup>[83]</sup>的惟一替代试验用于检验单一化学物。

注：附录 C 给出了说明和其他方法目录。

### 7.2 试验样品浓度选择

#### 7.2.1 总则

目前的试验准则推荐，在检验单一化学物的致敏潜力时仅用一种浓度。但是，试验结果在很大程度上是由试验剂量所决定的，因此试验如用于浸提液的评价，推荐对供试浸提液进行定性和定量分析。

#### 7.2.2 诱导

致敏率在很大程度上依赖于诱导剂量，诱导剂量应为中度刺激性。如达不到刺激限度，可选择所能达到的最高浓度，但是不应影响动物的健康。按具体试验描述的步骤在预试验的基础上选择诱导剂量，用通用肠外给药溶剂制备的未稀释的浸提液不需要进行预试验。

#### 7.2.3 激发

激发浓度也要在预试验的基础上选择，试验使用之前未接触过试验材料的动物。应采用刺激极限下的浓度，同时建议激发步骤采用一种以上浓度，以便于结果评价（见第 C.2 章）。

### 7.3 影响试验结果的其他重要因素

试验样品的生化和物理特性可能会影响试验的选择。最大剂量试验需做皮内注射，如试验样品不能皮内注射，则应采用其他替代方法。

不同的介质对试验材料的生物利用度会产生影响，任何一种介质不可能适合于所有的材料，因此宜选择溶解度和渗透性均最佳的溶剂。试验材料的浓度在不影响结果解释的前提下应尽可能选择最高浓度。大部分研究者推荐试验样品为溶液，因为分散剂易于形成沉淀，使得精确给药比较困难。用于皮内注射的介质有盐水、丙二醇和植物油。

不同实验室得出结果之间的差异可能出于多种原因。下列因素在试验步骤中是很重要的：试验环境条件、动物试验部位、除毛方法（剪、剃）或化学脱毛、敷贴片设计型式、试验材料剂量、封闭性、接触时



间和动物读数。动物在遗传因素和管理方面不同,其敏感性也会有差异。

要判定阳性试验结果,有必要将激发阶段试验动物出现阳性反应的数量与相应的对照动物进行比较,反应的严重程度有助于结果的判定。激发时如出现临界反应,最好进行再激发予以判定。组织病理学未显示出有助于试验结果的评价。

为保证试验步骤的重现性和敏感性,应定期用已知的接触性变应原进行试验,这类变应原有巯基苯并噻唑(mercaptobenzothiazole)、己基肉桂醛(hexyl cinnamic aldehyde)和对氨基苯甲酸乙酯(benzocaine)。

#### 7.4 迟发型超敏反应最大剂量试验

##### 7.4.1 目的

采用将单一化学物作用于豚鼠的最大剂量技术,对材料在试验条件下使豚鼠产生皮肤致敏反应的潜在性做出评价。

##### 7.4.2 试验样品制备

固体或液体试验材料样品应按附录 A 的规定进行制备。试验样品的浓度在不影响结果解释的情况下应尽可能的高(见 7.4.4.2)。

##### 7.4.3 动物与管理

应使用健康、初成年的白化豚鼠,雌雄不限,同一远交品系,试验开始时体重为 300g~500g。雌鼠应未产并无孕。

应使动物适应环境,并按 GB/T 16886.2 的规定饲养。为了确定适宜的试验浓度(见 7.4.4.2),最好用几只动物进行预试验。

粉剂或液体试验材料应至少使用 10 只动物,对照组至少使用 5 只动物。必要时另取动物用于预试验。

测试浸提液时,每种试验样品应至少使用 10 只动物,对照组至少使用 5 只动物。必要时另取动物用于预试验。

10 只试验动物和 5 只对照动物如全部呈阴性反应,则再进行试验也未必会出现阳性反应。但是,如出现任何疑似反应时,应进行再激发(见 7.4.6),如仍有疑似反应,则要重新进行试验,最少采用 20 只试验动物和 10 只对照动物。

##### 7.4.4 试验步骤

###### 7.4.4.1 准备

在试验开始之前除去动物试验部位的被毛。

每注射点皮内注射 0.1 mL。

对于局部应用,将适宜的滤纸或吸收性纱布块(4 cm<sup>2</sup>~8 cm<sup>2</sup>)在试验样品中浸透,贴敷于除毛皮肤上,再用封闭式包扎带缠绕动物躯干固定。

###### 7.4.4.2 预试验

预试验是为了确定 7.4.4.3 主试验中所用试验样品的浓度。

用通用溶剂制备的未稀释的浸提液不需要进行预试验。

为了对主试验期间可能发生的皮肤激发状况进行评价并对读数进行解释,应考虑对全部动物进行弗氏完全佐剂(FCA)注射的预处置。将试验样品的系列稀释物局部应用于动物腹部部位,至少采用 3 只动物。24 h 后除去封闭式包扎带和敷贴片,按表 4 给出的 Magnusson 和 Kligman 分级标准评价贴敷部位的红斑与水肿反应程度。

为主试验的局部诱导阶段所选择的最高浓度可导致轻度红斑,但不动物产生其他有害作用。

为主试验的激发阶段选择的最高浓度不产生红斑。

表 4 Magnusson 和 Kligman 分级

敷贴试验反应	等级
无明显改变	0
散发性或斑状红斑	1
中度融合性红斑	2
重度红斑和水肿	3

## 7.4.4.3 主试验

## 7.4.4.3.1 皮内诱导阶段

按图 2 所示(A、B 和 C),在每只动物去毛的肩胛骨内侧部位成对皮内注射 0.1 mL。

部位 A:注射弗氏完全佐剂与选定的溶剂以 50:50(体积比)比例混合的稳定性乳化剂。对于水溶性材料,溶剂选用生理盐水(符合中国药典要求)。

部位 B:注射试验样品(未经稀释的浸提液);对照组动物仅注射相应溶剂。

部位 C:试验样品(部位 B 中采用的浓度)以 50:50 的体积比例与弗氏完全佐剂和溶剂(50%)配制成的稳定性乳化剂混合后进行皮内注射;对照组注射空白液体与佐剂配制成的乳化剂。

## 7.4.4.3.2 局部诱导阶段

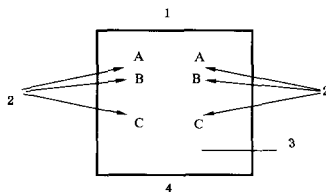
皮内诱导阶段后 7 d( $\pm 1$  d),按 7.4.4.3.1 部位 B 中选定的浓度,采用面积约 8 cm<sup>2</sup> 的敷贴片(滤纸或吸收性纱布块)局部贴敷于每只动物的肩胛骨内侧部位,覆盖诱导注射点。如按 7.4.4.3.1 的最大浓度未产生刺激反应,应在局部敷贴应用前 24 h $\pm$ 2 h,试验区用 10%十二烷基硫酸钠进行预处理,按摩导入皮肤。用封闭式包扎带固定敷贴片,并于 48 h $\pm$ 2 h 后除去包扎带和敷贴片。

最好新鲜制备浸提液,浸提液贮存如超过 24 h,浸提液在贮存条件下的稳定性宜进行验证。

对照组动物使用空白液同法操作。

## 7.4.4.3.3 激发阶段

局部诱导阶段后 14d( $\pm 1$ d),用试验样品激发全部试验动物和对照动物。按 7.4.4.3.1 部位 C 中选定的浓度,将适宜的敷贴片或载样器皿置于试验样品或介质中浸透,局部贴敷于诱导阶段未试验部位,如每只动物的上腹部。该浓度的稀释液可同法贴敷于其他未试验部位。用封闭式包扎带固定,并于 24 h $\pm$ 2 h 后除去包扎带和敷贴片。



1——头部;

2——0.1 mL 皮内注射点;

3——去毛的肩胛骨内侧部位;

4——尾部。

图 2 皮内注射点部位

## 7.4.5 动物观察

除去敷贴片后 24 h 和 48 h 观察试验组和对照组动物激发部位皮肤情况,特别推荐在自然或全光谱光线下观察皮肤反应。按表 4 给出的 Magnusson 和 Kligman 分级标准对每一激发部位和每一观察

时间皮肤红斑和水肿反应进行描述并分级。为了将结果评价偏差降至最低，特别推荐在不知试验处置信息的情况下进行读数。

#### 7.4.6 结果评价

按 Magnusson 和 Kligman 分级标准，对照组动物等级小于 1，而试验组中等级大于或等于 1 时一般提示致敏。如对照组动物等级大于或等于 1 时，试验组动物反应超过对照组中最严重的反应则认为致敏。如为疑似反应，推荐进行再激发以确认首次激发结果。试验结果显示为试验和对照动物中的阳性激发结果的发生率。

偶尔，试验组动物出现反应的动物数量多于对照组动物，但反应强度并不超过对照组，在此情况下，应在首次激发后 1 周~2 周进行再次激发，方法与首次激发相同，只是应用动物的另一腹侧部位。

推荐采用 FCA 处置过的一新的对照组。

#### 7.4.7 试验报告

试验报告应包括：

- a) 试验材料或器械描述；
- b) 试验样品或材料的预期用途/应用；
- c) 制备试验样品、试验材料或器械所用方法的详细描述；
- d) 试验动物描述；
- e) 试验部位接触方法；
- f) 试验部位标记和读数；
- g) 观察记录；
- h) 结果评价。

### 7.5 迟发型超敏反应封闭贴敷试验

#### 7.5.1 目的

对材料在试验条件下产生豚鼠皮肤致敏反应的潜在性做出评价。

#### 7.5.2 试验样品制备

材料如不能直接贴敷，应按附录 A 的规定制备极性和非极性浸提液。在试验样品形状和尺寸适宜的情况下，局部应用器械(如电极)可原样贴敷。

#### 7.5.3 动物与管理

应使用健康、初成年的白化豚鼠，雌雄不限，同一远交品系，试验开始时体重为 300 g~500 g。雌鼠应未产并未孕。

应使动物适应环境，并按 GB/T 16886.2 的规定饲养。为了确定理想的试验浓度(见 7.5.4.2)，最好用几只动物进行预试验。

粉剂或液体试验材料应至少使用 10 只动物，对照组至少使用 5 只动物。必要时另取动物用于预试验。

测试浸提液时，每种试验样品应至少使用 10 只动物，对照组至少使用 5 只动物。必要时另取动物用于预试验。

10 只试验动物和 5 只对照动物如全部呈阴性反应，则再进行试验也未必会出现阳性反应。但是，如出现任何疑似反应时，应进行再激发(见 7.5.6)，如仍有疑似反应，则要重新进行试验，最少采用 20 只试验动物和 10 只对照动物。

#### 7.5.4 试验步骤

##### 7.5.4.1 准备

在试验开始之前彻底剪除或脱除动物试验部位被毛。

将适当尺寸的敷贴片(滤纸或吸收性纱布)浸透试验材料或浸提液，局部贴敷于动物的除毛部位，

再用封闭性包扎带固定 6 h。特别推荐对每只动物实施相应的限制性方法以保证试验部位的封闭性，试验中如使用缠绕法固定时宜评价其适宜性。

#### 7.5.4.2 预试验

预试验是为了确定 7.5.4.3 主试验中所用试验样品的浓度。

预期局部使用的医疗器械和采用通用溶剂制备未经稀释的浸提液不需要进行预试验。

每种试验样品局部贴敷采用 4 种浓度，使用合适的敷贴片贴敷于至少 3 只动物的两腹侧部。6 h 后除去包扎带和敷贴片。除去敷贴片后 24 h 和 48 h，按表 4 给出的 Magnusson 和 Kligman 分级标准评价试验部位皮肤红斑和水肿反应程度。

选择：

- a) 最高浓度在主试验的诱导阶段仅出现轻微红斑，但不动物产生其他有害作用；
- b) 最高浓度在主试验的激发阶段不出现红斑。

#### 7.5.4.3 主试验

##### 7.5.4.3.1 诱导阶段

按 7.5.4.2 a) 选定的试验样品浓度，将合适的敷贴片浸透试验样品，局部贴敷于每只动物的左上背部。6 h 后除去固定器、封闭包扎带和敷贴片。1 周中连续 3d 重复该步骤，同法操作 3 周。对照动物仅使用空白液同法操作。

##### 7.5.4.3.2 激发阶段

最后一次诱导贴敷后 14 d ( $\pm 1$  d)，用试验样品对全部试验动物和对照动物进行激发。按 7.5.4.2 b) 选定的试验样品浓度，将合适的敷贴片浸透试验样品单独局部贴敷于每只动物去毛的未试部位。6 h 后除去固定器、封闭包扎带和敷贴片。

#### 7.5.5 动物观察

首次激发后或再次激发接触后  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ ：

- a) 用市售脱毛剂给动物脱毛，按生产企业说明书将脱毛剂涂到试验和周围部位；或
- b) 剃去激发部位及其周围部位的动物被毛。

用温水彻底清洗脱毛区，并用毛巾擦干动物后放回笼中。脱毛后至少 2 h，按表 4 给出的分级标准对试验部位评分，并在除去激发敷贴片后  $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  再进行评分。为了将结果评价偏差降至最低限度，特别推荐在不知试验处置信息的情况下进行读数。

#### 7.5.6 结果评价

表 4 给出的 Magnusson 和 Kligman 分级标准适用。

对照组动物等级小于 1，而试验组中等级大于或等于 1 时一般提示致敏。如对照组动物等级大于或等于 1 时，试验动物反应超过对照动物中最严重的反应则认为致敏。推荐进行再激发以确认首次激发结果。试验结果表现为试验和对照动物中的阳性激发结果的发生率。

偶尔，试验组中出现反应的动物数量多于对照组，但反应的强度不超过对照组。在此情况下，可能有必要进行再次激发以明确判定其反应。再次激发应在首次激发后 1 周~2 周进行，方法与首次激发相同，只是应贴敷于动物腹侧未试验部位。

推荐采用初次试验对照组。

#### 7.5.7 试验报告

试验报告应包括：

- a) 试验材料或器械的描述；
- b) 试验材料或器械的预期用途/应用；
- c) 制备试验样品和材料所用方法的详细描述；
- d) 试验动物描述；
- e) 试验部位接触方法；

- f) 试验部位如何标记和读数；
- g) 观察记录；
- h) 结果评价,包括统计学方法。

## 8 解释试验结果的关键因素

本部分中的试验是开发安全性产品的重要手段,这些试验应由受过培训的人员进行操作并解释。

由于试验步骤中使用的试验材料总量可能比实际应用量要大,因此用任何方法检验出迟发型接触超敏反应时不一定表明试验材料或器械不能使用。用确认过的步骤检验出不良反应表明需进行进一步分析,即允许预期人体接触的风险性评价。

按本部分试验步骤得出的预测性试验结果不能单独成立。阴性试验结果往往不能排除产品可能导致皮肤过敏反应的可能性,为了避免出现假阳性或假阴性结果,对任何检验法的阳性和阴性试验结果均宜进行严谨的核查。可通过与其他信息来源进行比较以对试验结果进行确认,例如:

- a) 行业和消费者抱怨资料；
- b) 包含相同组件器械方面的经验；
- c) 皮肤病诊所的诊断试验结果；
- d) 回顾性流行病学资料。

## 附录 A

## (规范性附录)

## 刺激和致敏试验用材料的制备

## A.1 总则

在进行试验以及解释刺激和致敏试验结果时,应考虑器械在人体应用时的接触性质、程度、频率、时间和条件等因素。对这些试验最关键的因素之一就是试验材料的制备。

## A.2 直接接触材料

## A.2.1 固体试验材料

有一定物理形态的固体材料(如片材和薄膜)应不加改变直接用于试验。可制成  $2.5\text{ cm} \times 2.5\text{ cm}$  的样品,厚度近似实际使用要求但不超过  $0.5\text{ cm}$ 。同法制备相应的阴性对照样品。阴性对照样品在物理性状上应与试验材料近似而且无刺激性,在没有发现更适宜的对照品的情况下,吸收性纱布可作为一种代用品。

固体也可研磨成粉状,但应谨慎操作以防止发生污染,或者用水或一种适宜的无刺激性溶剂充分湿润以保证与组织的良好接触性。陶瓷制品需要研磨成粉时应注意的是,陶瓷研磨成粉剂后,其物理化学特性可能发生了改变,具有潜在的生物学活性作用。

对于粉剂(如高吸收剂),应采用直接附着或用适当的溶剂调成糊状物后试验。对照采用相同的溶剂与经湿化、稀释或悬浮过的试验材料平行进行评价。

注:表面积和(或)微粒尺寸是生物学反应中的重要因素,如杀菌作用,这种作用在炎症和免疫应答中扮演一种重要的角色。

## A.2.2 液体试验材料

液体应不加稀释直接试验,如不切实际可用适当溶剂稀释后试验。对照采用相同的溶剂与稀释试验液平行进行评价。

## A.3 试验材料浸提液

固体试验材料也可制备成浸提液用于试验。如用浸提液进行试验,应按 GB/T 16886.12 的规定使用极性、非极性和(或)其他适宜的溶剂制备浸提液,还应给出浸提液方法适宜性的说明。

空白样品采用浸提溶剂,应与试验材料浸提液平行进行评价。

## A.4 溶剂

试验材料如必须进行浸提、稀释、悬浮或湿化处置,应使用适当的无刺激性溶剂。GB/T 16886.12 中列出了适用的溶剂。

## A.5 无菌试验材料

最终产品如出厂时为无菌状态,试验前则应采用相同程序对试验材料进行灭菌处理。用环氧乙烷灭菌的产品存在一技术问题,即环氧乙烷及其反应产物在本部分所描述的试验中会产生生物学反应。

当试验中观察到刺激反应时,为了能区别试验材料和环氧乙烷残留物所致的反应,应考虑对器械进行环氧乙烷灭菌前和灭菌后反应的评价。

**附录 B**  
**(资料性附录)**  
**其他刺激试验**

**B.1 总则**

下列特殊评价试验可认为是基本试验的补充试验,但不能作为替代试验。如进行这类试验,应给出试验方法选择说明。这些试验仅适用于预期应用于这些特殊部位的医疗器械。

**B.2 皮内反应试验**

**B.2.1 目的**

通过皮内注射材料浸提液,对材料产生刺激反应的潜在性做出评价。

**B.2.2 应排除的试验材料**

任何显示为皮肤、眼、粘膜组织刺激物的材料,或是  $\text{pH} \leq 2$  或  $\text{pH} \geq 11.5$  的材料,不应进行皮内试验。

**B.2.3 试验样品**

试验样品应按附录 A 制备成浸提液。每一动物试验部位成对设置,几种试验样品可与适宜的阴性对照或空白液一起应用。

**B.2.4 动物与管理**

应使用健康、初成年的白化兔,雌雄不限,体重不低于 2 kg。应使动物适应环境,并按 GB/T 16886.2 的规定饲养。试验材料初试应至少采用两只动物。初试如为疑似反应或不明确,应考虑进行复试。

**B.2.5 试验步骤**

试验前 4 h~18 h,彻底除去动物背部脊柱两侧被毛,以备注射浸提液。

在每只兔脊柱一侧的 5 个点皮内注射 0.2 mL 用极性溶剂制备的浸提液(见图 B.1)。应根据试验材料的黏性选用最小规格的注射针进行皮内注射。

同样在每只兔脊柱同一侧的后五个点皮内注射 0.2 mL 极性溶剂对照液(见图 B.1)。

在每只兔的脊柱另一侧注射用非极性溶剂制备的浸提液和非极性溶剂对照液,操作步骤同上(见图 B.1)。

如采用其他溶剂,使用该溶剂制备的浸提液和溶剂对照液重复上述步骤。

**B.2.6 动物观察**

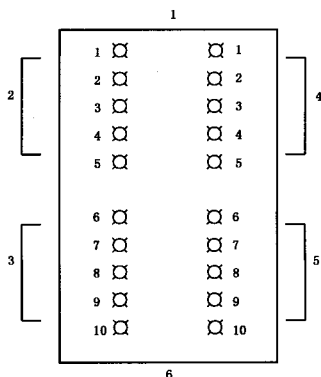
注射后即刻并在 24 h、48 h 和 72 h 观察记录各注射部位状况。

按表 B.1 给出的记分系统对每一观察期各注射部位的红斑和水肿的组织反应评分,并记录试验结果。

注:油类液体皮内注射常会引发炎症反应。

在 72 h 观察时,可静脉注射适宜的活体染料,如台盼蓝或伊文思蓝,以显示出刺激区域有助于反应评价。

如可行也可使用无创技术以有助于评价。



- 1——头端；  
 2——0.2 mL 极性浸提液注射点；  
 3——0.2 mL 极性溶剂对照液注射点；  
 4——0.2 mL 非极性浸提液注射点；  
 5——0.2 mL 非极性溶剂对照液注射点；  
 6——尾端。

图 B.1 注射点排列

### B.2.7 结果评价

在 72 h 评分后,分别将每一试验样品和溶剂对照的全部红斑与水肿记分相加,再除以  $12[2(\text{动物数}) \times 3(\text{观察期}) \times 2(\text{记分类型})]$  计算出每一试验样品和每一对应溶剂对照的综合平均记分。如试验样品和溶剂对照平均记分之差小于 1.0,则符合试验要求。在任何观察期,如试验样品一般反应疑似大于溶剂对照反应,应另取家兔重新进行试验,试验样品与溶剂对照平均记分之差小于 1.0 符合试验要求。

表 B.1 皮内反应记分系统

反 应	记 分
红斑和焦痂形成	
无红斑	0
极轻微红斑(勉强可见)	1
清晰红斑	2
中度红斑	3
重度红斑(紫红色)至焦痂形成	4



表 B.1(续)

反 应	记 分
水肿形成	
无水肿	0
极轻微水肿(勉强可见)	1
清晰水肿(肿起,不超出区域边缘)	2
中度水肿(肿起约 1 mm)	3
重度水肿(肿起超过 1 mm,并超出接触区)	4
刺激最高记分	8
注:记录并报告注射部位的其他异常情况。	

### B.2.8 试验报告

试验报告应包括:

- a) 试验材料或器械的描述;
- b) 试验材料或器械的预期用途/应用;
- c) 制备试验样品所用方法的详细描述;
- d) 试验动物描述;
- e) 注射方法;
- f) 注射点记分;
- g) 观察记录;
- h) 结果评价。

### B.3 眼刺激试验

#### B.3.1 总则

眼刺激试验只有在用其他方法不能得到安全性数据的情况下才考虑进行,并且仅适用于预期与眼或眼睑接触的材料。

注:体外试验系统正在开发中,一经确认可用于替代该体内法眼刺激试验。

#### B.3.2 目的

对材料在试验条件下产生眼刺激反应的潜在性做出评价。

#### B.3.3 应排除的试验材料

在皮肤试验中已证实有明显腐蚀性或有重度刺激性的材料和(或)最终产品不应再进行眼刺激试验。任何显示为皮肤刺激物或  $\text{pH} \leq 2$  或  $\text{pH} \geq 11.5$  的材料也不应再进行试验,这些材料被认定为眼刺激物。

#### B.3.4 试验材料

试验材料如是液体,将 0.1 mL 未稀释液直接滴入动物一只眼的下结膜囊内。

试验材料如是固体或颗粒状制品,应碾成细粉,混合后取 0.1 mL 体积容量(重量不超过 100 mg)滴入动物 1 只眼的下结膜囊内。

注:有的产品可能不能直接在眼中试验,机械损伤会导致试验无效。

如将试验材料装入泵中喷射,可像液体样喷射滴入 0.1 mL。

如将试验材料装入喷雾器中,可选择下列方法中的一种:

- a) 在距离张开的眼睛 10 cm 处喷射 1 s; 或

b) 喷入一冷容器内凝结为液体后应用。

如试验材料只能用于其浸提液进行试验,应按附录 B 规定制备浸提液,将 0.1 mL 的浸提液滴入动物 1 只眼的下结膜囊内。

在上述同等条件下不加试验材料,用极性和非极性溶剂制备空白液。

### B.3.5 动物与管理

应使用健康、初成年的白化兔,雌雄不限,同一品系,体重为 2 kg~3 kg。

应使动物适应环境,并按 GB/T 16886.2 的规定饲养。

初试应使用 1 只动物评价试验材料。如预期无反应,初试可采用 3 只动物。

如 1 只动物出现清晰的阳性反应(见表 B.2)时则不必再进行试验。

固体或液体材料如没有出现清晰反应时,应至少再使用两只动物进行试验。对于浸提液,每种浸提液也应至少再使用两只动物。

使用了至少 3 只动物后,如试验反应仍然疑似或不明确,应考虑进行复试。

### B.3.6 试验步骤

试验前 24 h 内检查每只家兔的双眼是否有异常现象,如发现异常应淘汰该兔。

检眼时可使用 2% 荧光素钠检查角膜损伤,也可使用检眼镜、裂隙灯或其他适宜的器械。

按 B.3.4 的规定滴入试验样品于 1 只眼内。

滴注后闭眼约 1 s。

检验浸提液时,每只动物的对侧眼作为对照滴入空白液。

如材料预期要反复接触人体,并且在急性试验中未发现有显著反应时,可进行多次接触试验。多次接触试验只能在急性接触试验完成后进行(至少在 72 h 后)。接触期应与试验材料/器械临床使用期相似。

### B.3.7 动物观察

对一次滴入试验材料的动物在滴注后约 1 h、24 h、48 h 和 72 h 检查每只动物的双眼。

如有持续性损伤存在,应延长观察时间,以确定损伤的进展性和可逆性,但延期最多为 21 d。对有严重损伤的动物延期观察则没有任何意义。

注:美国食品药品监督管理局(US FDA)导则中的接触镜检验要求 21 d 接触期,每天接触 8 h。这在导则中是一个例外情况。

按表 B.2 规定的眼损伤记分系统,对观察到的反应记分并记录。

对多次滴入试验材料的动物在每次滴注前和滴注后约 1 h 检查每只动物的双眼。

如末次滴注后有刺激现象,应延长观察时间。如有持续性角膜受累症状或其他眼刺激反应也应延长观察时间,以确定损伤的进展性和可逆性。

按表 B.2 规定的眼损伤分级系统,对观察到的反应记分并记录。

动物如出现下列症状之一时应立即从试验中淘汰并无痛处死:

- a) 极重度眼损伤(结膜眼痈或溃疡、角膜穿孔、前房内有血和脓液等);
- b) 有血污或脓液排出;
- c) 明显的角膜溃疡。

动物如显示表 B.2 中分级系统的最大反应时也应从试验中淘汰,这种反应有:

- 对光反射消失(虹膜反应记分 2)或角膜浑浊(记分 4)并在 24 h 内无可逆迹象;
- 或是结膜炎(球结膜水肿记分 4,并伴充血记分 3)并在 48 h 内无可逆迹象。

淘汰动物应无痛处死。

### B.3.8 结果评价

试验眼与对照眼之间的差异性应按表 B.2 中的记分系统进行判定与解释。

## a) 急性接触

如果有1只以上动物试验眼在任何观察阶段呈阳性反应(表B.2中打\*者),即认为该材料为眼刺激物,不必进一步试验。

如3只动物试验眼中仅有1只呈中度反应或是反应疑似,应另取动物进行复试。

复试中如动物试验眼在任何观察阶段半数以上呈阳性反应(表B.2中打\*者),则认为该试验材料为眼刺激物。

仅有1只动物出现严重反应已足以证实该材料为眼刺激物。

## b) 多次接触

如试验组中半数以上动物在任何观察阶段呈现阳性反应(表B.2中打\*号者),即认为该试验材料为眼刺激物。

## B.3.9 试验报告

试验报告应包括:

- a) 试验样品描述;
- b) 试验样品预期用途/应用;
- c) 制备试验样品所用方法的详细描述;
- d) 试验动物描述;
- e) 滴入方法;
- f) 眼记分;
- g) 观察记录;
- h) 结果评价。

表 B.2 眼损伤记分系统

反 应	记 分
1. 角膜	
浑浊程度(观察最致密混浊区):	
透明	0
云翳或弥散混浊区,虹膜清晰可见	1*
易识别的半透明区,虹膜清晰可见	2*
乳白色区,看不见虹膜,勉强可见瞳孔	3*
浑浊,看不见虹膜	4*
角膜受累范围:	
大于0,小于或等于1/4	0
大于1/4,小于1/2	1
大于1/2,小于3/4	2
大于3/4直至整个角膜区域	3
2. 虹膜	
正常	0
超出正常皱襞,充血水肿,角膜缘充血(其中一种或全部),仍有对光反应(反应迟钝为阳性)	1*
无对光反射,出血性严重结构破坏(其中一种或全部)	2*

表 B.2(续)

反 应	记 分
3. 结膜	
充血(累及睑结膜和球结膜, 不包括角膜和虹膜):	
血管正常	0
血管明显充血	1
弥散性充血, 呈深红色, 血管纹理不清	2 <sup>a</sup>
弥散性充血, 呈紫红色	3 <sup>a</sup>
4. 水肿	
无水肿	0
轻微水肿(包括瞬膜)	1
明显水肿伴部分睑外翻	2 <sup>a</sup>
眼睑水肿使眼呈半闭合状	3 <sup>a</sup>
眼睑水肿使眼呈半闭合乃至全闭合状	4 <sup>a</sup>
5. 分泌物	
无分泌物	0
超过正常分泌量(不包括正常动物眼内眵少量分泌物)	1
分泌物浸湿眼睑及眼睑邻近睫毛	2
分泌物浸湿眼睑、睫毛和眼周围区域	3
<sup>a</sup> 阳性结果。	

#### B.4 口腔刺激试验

##### B.4.1 总则

口腔刺激试验只有在用其他方法不能得到安全性数据的情况下才考虑进行, 并且仅适用于预期与口腔组织接触的材料。

##### B.4.2 目的

对材料在试验条件下产生口腔组织刺激反应的潜在性做出评价。

##### B.4.3 应排除的试验材料

任何已显示为皮肤或眼的刺激物, 或 pH 值  $\leq 2$  或 pH  $\geq 11.5$  的材料不应再进行试验, 可认定为潜在的口腔组织刺激物。

##### B.4.4 试验材料

按附录 A 规定制备试验材料。

##### B.4.5 动物与管理

应使用健康、初成年的金黄色地鼠, 同一品系, 雌雄不限。应使动物适应环境, 并按 GB/T 16886.2 的规定饲养。

除此以外, 必要时给动物套上 1 个 3 mm~4 mm 宽的适用项圈, 使动物能维持正常进食和呼吸, 且又能防止动物口腔内棉球移出。试验期间动物每天称重, 连续 7 d。在此期间, 检查每只动物的体重下降情况, 必要时可调整项圈。如动物体重持续下降, 应将其从试验中淘汰。

初试应至少使用 3 只动物评价试验材料。

注: 另取动物用相应的阴性对照材料或空白液进行试验可能适用。

初试反应如疑似或不明确, 应考虑进行复试。

**B.4.6 试验步骤**

除掉动物项圈，翻转颊囊用生理盐水冲洗后，检查有无异常。

对于固体试验材料，可将样品（直径不大于5 mm）放入颊囊内。

液体试验材料或浸提液样品则可用棉球浸透试验材料或浸提液，记录所用的体积，放入动物的一侧颊囊内。也可将适宜体积的样品直接灌注入颊囊。

另一侧颊囊不放样品作为对照。对照动物平行试验。

必要时重新给动物带上项圈放回笼中。

接触时间应尽可能与材料实际使用时间一致，但最少不能少于5 min。接触后除去项圈和棉球，用生理盐水冲洗颊囊，应注意不要污染另一侧颊囊。

对于急性接触，重复上述步骤每小时1次，共4 h。

多次接触试验时，应根据预期临床应用情况确定试验用量、接触次数、时间和间隔期。

**B.4.7 动物观察**

取出试验球后肉眼观察颊囊，并且在每次接触前（如需多次接触时）检查颊囊。

描述动物颊囊的一般状况，并按表 B.3 给出的记分系统，判定动物每一观察期颊囊表面红斑反应记分。记录结果以出具试验报告。

末次接触后24 h肉眼观察颊囊，无痛处死地鼠，取颊囊有代表性部位的组织样品放入适宜的固定液中固定后进行组织学评价。

表 B.3 口腔和阴茎反应记分系统

反 应	记 分
红斑和焦痂形成	
无红斑	0
极轻微红斑(勉强可见)	1
红斑清晰	2
中度红斑	3
重度红斑(紫红色)至焦痂形成	4
注：记录并报告组织的其他异常情况。	

**B.4.8 结果评价****B.4.8.1 肉眼观察评价**

比较空白对照侧颊囊与对侧颊囊，如有对照组，则还应与对照组动物的颊囊进行比较。

每一观察记分（见表 B.3）相加后再除以观察总数得出每只动物平均记分。

注1：这些观察可能有助于组织学评价。

注2：试验材料首次接触前的初始观察结果不包括在平均记分中。

**B.4.8.2 组织学评价**

应由病理学家用显微镜对口腔组织的刺激反应进行评价，可按表 B.4 规定的记分系统对每一组织进行评分。

试验组中所有动物的显微镜评价记分相加，再除以观察总数，得出试验组平均记分。对照组同法计算。最大记分为16。

空白对照颊囊的显微镜评价总分大于9时，表明有病理改变，对照动物如出现这种情况，则可能是试验操作时造成的损伤。如其他试验或对照动物出现同样的高分，无论是哪种情况，可能都有必要进行复试。

试验组平均记分减去对照组平均记分得出刺激指数（见表 B.5）。

对于多次接触试验,可将表 B.4 修改为适合于对有关慢性刺激组织反应的评价。

#### B.4.9 试验报告

试验报告应包括:

- a) 试验样品描述;
- b) 试验样品预期用途/应用;
- c) 制备试验样品所用方法的详细描述;
- d) 试验动物描述;
- e) 接触方法;
- f) 试验部位记分;
- g) 观察记录;
- h) 组织学评价;
- i) 结果评价。

表 B.4 口腔、阴茎、直肠和阴道组织反应显微镜记分系统

反 应	记 分
1. 上皮	
正常,完好无损	0
细胞变性或变扁平	1
组织变形	2
局部糜烂	3
广泛糜烂	4
2. 白细胞浸润(每个高倍视野)	
无	0
极少(少于25)	1
轻度(26~50)	2
中度(51~100)	3
重度(大于100)	4
3. 血管充血	
无	0
极少	1
轻度	2
中度	3
重度伴血管破裂	4
4. 水肿	
无	0
极少	1
轻度	2
中度	3
重度	4

表 B.5 刺激指数

刺激指数	
平均记分	反应程度
0	无
1~4	极轻
5~8	轻度
9~11	中度
12~16	重度

注1:组织的其他异常情况也应以记录并包括在反应的评价中。  
注2:表B.4显微镜记分系统适用于本附录所列全部试验,“刺激指数”已发展用于阴道刺激模型,也可用于其他一些试验。

**B.5 阴茎刺激试验****B.5.1 总则**

阴茎刺激试验只有在用其他方法不能得到安全性数据的情况下才考虑进行,并且仅适用于预期与阴茎组织接触的材料。

**B.5.2 目的**

对材料在试验条件下产生阴茎皮肤刺激反应的潜在性做出评价。

**B.5.3 应排除的试验材料**

任何已显示为皮肤或眼的刺激物,或  $\text{pH} \leq 2$  或  $\text{pH} \geq 11.5$  的材料不应再进行试验,可认定为潜在的阴茎刺激物。

**B.5.4 试验样品**

固体或液体试验样品应按附录 A 规定进行制备。

**B.5.5 动物与管理**

应使用健康、初成年的雄性白化兔或豚鼠。家兔体重不低于 2 kg,豚鼠体重为 300 g~500 g。

应使动物适应环境,并按 GB/T 16886.2 的规定饲养。

能供试验接触的阴茎长度应至少为 1 cm。

由于动物个体色素差异,首次试验前应先观察动物,按表 B.3 给出的记分系统对红斑进行评分。对出现严重变色或红斑记分大于等于 2 的动物不能用于试验。

初试应至少使用 3 只动物评价试验材料,另取 3 只动物作为对照组。

初试反应如疑似或不明确时,应考虑进行复试。

**B.5.6 试验步骤**

用辅助器具固定动物四肢,使动物保持仰卧姿势。

用食指和中指轻压外阴部使阴茎伸出。

阴茎伸出后,施用足够的试验样品(约 0.2 mL)以确保覆盖阴茎。

使阴茎缩回包皮中,并应采取防止动物舔试验部位,以避免继发性因素(如 Elizabethan 颈圈)干扰原发性刺激反应。

试验材料末次接触后,动物也可固定在一个设计合理的固定器中 1 h 后再放回笼中。

对于急性接触,重复上述步骤每小时 1 次,共 4 h。

长期多次接触试验时,应根据预期临床应用情况确定试验用量、接触次数、时间和间隔期。

**B.5.7 动物观察**

急性接触时,每次接触后 1 h(即下次接触前)注意观察阴茎一般状况。末次接触后 1 h、24 h 和

48 h观察并记录动物状况。

长期多次接触时，在首次接触后 1 h 和下次接触之前观察记录阴茎状况。

按表 B.3 规定的记分系统对动物每一间隔期皮肤表面红斑反应记分，并记录试验结果。

动物在试验前如有皮肤发红现象，应从试验样品红斑记分中减去试验前的红斑记分，以确定由试验样品引起的红斑反应。每一观察记分最高为 4 分。

### B.5.8 结果评价

#### B.5.8.1 肉眼观察评价

将未试验阴茎和包皮与对照动物阴茎进行比较。

将每次观察记分(表 B.3)相加后再除以观察次数得出每只动物的平均记分。

注 1: 这些观察可能有助于组织学评价。

注 2: 试验材料首次应用前的初始观察结果不包括在平均记分中。

48 h 观察后立即将动物无痛处死。切下阴茎和包皮末端放入适宜的固定剂中固定后进行组织学评价。

#### B.5.8.2 组织学评价

应由病理学家对阴茎皮肤的刺激反应进行评价，可按表 B.4 规定的记分系统对每一组织进行评分。

试验组动物的显微镜评价记分相加后除以观察总数即得出试验组平均记分。最大记分为 16。

对照组同法计算。

对照物中出现显微镜评价总记分大于 9 时，表明可能有操作损伤。如其他试验或对照动物显示同样的高分时，可能有必要进行复试。

试验组平均记分减去对照组平均记分即得出刺激指数(见表 B.5)。

对于长期多次接触试验，可将表 B.4 修改为适合于对有关慢性刺激组织反应的评价。

### B.5.9 结果表述

试验报告应包括：

- a) 试验样品描述；
- b) 试验样品预期用途/应用；
- c) 制备样品所用方法的详细描述；
- d) 试验动物描述；
- e) 接触方法；
- f) 试验部位记分；
- g) 观察记录；
- h) 组织学评价；
- i) 结果评价。

## B.6 直肠刺激试验

### B.6.1 总则

直肠刺激试验只有在用其他方法不能得到安全性数据的情况下才考虑进行，并且仅适用于预期与直肠组织接触的材料。

### B.6.2 目的

对材料在试验条件下产生直肠组织刺激反应的潜在性做出评价。

### B.6.3 应排除的试验材料

任何已显示为皮肤或眼的刺激物，或  $\text{pH} \leq 2$  或  $\text{pH} \geq 11.5$  的材料不应再进行试验，可认定为潜在的直肠刺激物。

### B.6.4 试验材料

固体或液体试验材料应按附录 A 规定进行制备。



### B.6.5 动物与管理

应使用健康、初成年的白化兔，雌雄不限，同一品系，体重不低于 2 kg。如使用其他种属应经过认可。

应使动物适应环境，并按 GB/T 16886.2 的规定饲养。

初试应至少使用 3 只动物评价试验材料，另取 3 只动物作为对照组。

初试反应如疑似或不明确时，应考虑进行复试。

每次试验操作前应检查动物直肠排便、水肿和(或)其他感染、刺激和(或)损伤情况。

### B.6.6 试验步骤

将一短软管(6 cm)或一钝头插管与一容量大于 1 mL 的注射器连接，注射器和导管注满后可使动物能接受 1 mL 试验样品。应为每只动物分别准备一套注射器和连接导管。

将动物置于固定器中固定，以便于接触会阴部位。或用固定器具将动物束缚住后再固定其后肢，以暴露出会阴部位。

导管插入前可用对照样品或适当的润滑剂湿润处理。

提起动物尾巴暴露出会阴，然后将湿润过的导管轻柔的插入直肠，用注射器注入 1 mL 试验液。抽出导管并以适当的方法处置掉。

由于动物个体直肠容积的差异性，试验液注入时或注入后可能会有溢出，可用软棉纸轻拭去溢出的液体。

每次间隔 24 h 连续重复上述步骤，连续 5 d。

对于长期多次接触试验，应根据预期临床接触时间确定接触次数、时间和间隔期。

### B.6.7 动物观察

初次接触后 24 h 和每次试验操作前注意记录会阴溢液、红斑和刺激状况。

对于出现过度溢液、肿胀或难以给药的动物，应无痛处死后做组织学检查(见 B.6.8.1)。

### B.6.8 结果评价

#### B.6.8.1 肉眼观察评价

末次接触后 24 h，无痛处死动物，完整切下直肠后纵向切开，检查上皮组织层的刺激、损伤以及坏死情况。

将直肠和大肠的末端放入适当的固定剂中固定后进行组织学评价。

将试验兔的直肠组织与对照兔直肠组织进行比较。

记录并描述肉眼观察下每只动物直肠组织的状况，注意试验与对照部位之间的差别。

注：这些观察可能有助于组织学评价。

#### B.6.8.2 组织学评价

应由病理学家对直肠组织的刺激反应进行评价，可按表 B.4 规定的记分系统对每一组织进行评分。

试验组动物显微镜评价记分相加后再除以观察总数即得出试验组平均记分。最大记分为 16。对照组同法计算。

对照组动物中出现显微镜评价总分大于 9 时，表明试验操作中可能造成损伤。如其他试验或对照动物出现同样的高分时，可能有必要进行复试。

试验组平均记分减去对照组平均记分即得出刺激指数(见表 B.5)。

对于长期多次接触试验，可将表 B.4 修改为适合于对有关慢性刺激组织反应的评价。

### B.6.9 试验报告

试验报告应包括：

- a) 试验样品描述；
- b) 试验样品预期用途/应用；

- c) 制备样品所用方法的详细描述;
- d) 试验动物描述;
- e) 接触方法;
- f) 试验部位记分;
- g) 观察记录;
- h) 组织学评价;
- i) 结果评价。

## B.7 阴道刺激试验

### B.7.1 总则

阴道刺激试验只有在用其他方法不能得到安全性数据的情况下才考虑进行,并且仅适用于预期与阴道组织接触的材料。

### B.7.2 目的

对材料在试验条件下产生阴道组织刺激反应的潜在性做出评价。

### B.7.3 应排除的试验材料

任何已显示为皮肤或眼的刺激物,或  $\text{pH} \leq 2$  或  $\text{pH} \geq 11.5$  的材料不应再进行试验,可认定为潜在的阴道组织刺激物。

### B.7.4 试验样品

固体或液体试验材料应按附录 A 规定进行制备。

### B.7.5 动物与管理

应使用健康、初成年的雌性白化兔,同一品系,体重不低于 2 kg。如使用其他种属应经过认可。

应使动物适应环境,并按 GB/T 16886.2 的规定饲养。

初试应至少使用 3 只动物评价试验材料,另取 3 只动物作为对照组。

初试反应如疑似或不明确时,应考虑进行复试。

每次试验操作前应检查动物阴道排液、水肿和(或)其他感染、刺激和(或)损伤情况。在动物发情期阶段也应检查阴道,以避免由于阴道的生理变化而做出假阳性反应判定。

### B.7.6 试验步骤

将一短软管(6 cm)或一钝头插管与一容量大于 1 mL 的注射器连接,注射器和导管注满后可使动物能接受 1 mL 试验样品。应为每只动物分别准备一套注射器和连接导管。

将动物置于固定器中固定,以便于接触阴道。或用固定器具将动物束缚住后再固定其后肢,以暴露出阴道。

导管可用对照液或适当的润滑剂湿润处理。

提起动物尾巴暴露出阴道口,然后将湿润过的导管轻柔地插入阴道,用注射器注入 1 mL 试验样品。抽出导管并以适当的方法处置掉。

由于动物个体阴道容积的差异性,试验液注入时或注入后可能会有溢出,可用软棉纸轻拭去溢出的液体。

每次间隔 24 h 连续重复上述步骤,至少连续 5d。

对于长期多次接触试验,应根据预期临床应用情况确定试验用量、接触次数、时间和间隔期。

### B.7.7 动物观察

初次接触后 24 h 和每次试验操作前注意记录阴道口和会阴溢液、红斑和水肿状况。

对于出现过度溢液、红斑或难以给药的动物,应无痛处死后做组织学检查(见 B.6.8.1)。

### B.7.8 结果评价

#### B.7.8.1 肉眼观察评价

末次接触后 24 h,无痛处死动物,完整切下阴道后纵向切开,检查上皮组织层的刺激、损伤以及坏

死情况。

将取下的阴道组织放入适当的固定剂中固定后进行组织学评价。每块阴道组织应取其两端和中央三部分。

将试验动物与对照动物的阴道部位进行比较。

记录并描述肉眼观察下每只动物阴道组织的状况，注意试验组与对照组之间的差别。

注：这些观察可能有助于组织学评价。

#### B.7.8.2 组织学评价

应由病理学家对阴道组织的刺激反应进行评价，可按表 B.4 规定的记分系统对每一组织进行评分。

试验组动物显微镜评价记分相加后再除以观察总数即得出试验组平均记分。最大记分为 16。

对照组同法计算。

对照组动物中出现显微镜评价总分大于 9 时，表明试验操作中可能造成损伤。如其他试验或对照动物出现同样的高分时，可能有必要进行复试。

试验组平均记分减去对照组平均记分即得出刺激指数(见表 B.5)。

对于长期多次接触试验，可将表 B.4 修改为适合于对有关慢性刺激组织反应的评价。

#### B.7.9 试验报告

试验报告应包括：

- a) 试验样品描述；
- b) 试验样品预期用途/应用；
- c) 制备样品所用方法的详细描述；
- d) 试验动物描述；
- e) 接触方法；
- f) 试验部位记分；
- g) 观察记录；
- h) 组织学评价；
- i) 结果评价。

## 附录 C

### (资料性附录)

## 背景信息

### C.1 刺激试验背景信息

在小动物体上进行的皮肤刺激试验有助于鉴别出人体皮肤和(或)黏膜组织的潜在刺激物。原发性刺激物是一种能导致皮肤炎症病变的材料,即一种以炎症为特征的直接损害反应,或是重度刺激、皮肤水泡和(或)坏死症状。

在“化学物质毒效注册”(RTECS)中,大量使用家兔的皮肤刺激试验资料证实,家兔为首选试验动物。在超过 2000 例的 RTECS 试验结果报告中,有 85% 是使用家兔,7.5% 应用于人,4% 使用小鼠,3% 使用豚鼠。因此在公开文献中,大多数有效数据都是由家兔试验所得。试验部位无需擦伤,因为有迹象表明擦伤部位与未擦伤部位之间的反应性是相同的。

皮肤刺激试验结果会由于许多与试验相关因素的变化而发生改变,诸如宿主、试验剂量、敷贴片尺寸、封闭程度、接触时间、介质、读数时间和读数质量等因素。因此,在人体皮肤刺激试验中包括已知的阳性和阴性对照材料是很重要的,这样可将试验材料与对照材料进行比较得出相应的结果。纯度  $\geq 99\%$  的十二烷基硫酸钠(SDS)是首选阳性对照材料,SDS 是临床研究中应用最广泛的对照刺激物<sup>[2][4][21]</sup>,容易获取到并且无其他不良作用。壬酸与 SDS 作用方式不同,也可用作阳性对照<sup>[18][19]</sup>。

SDS 接触可用于测定志愿者并作为一个参照点。按照欧盟(EU)准则(88/379/EEC 委员会指令),SDS 被分类为皮肤刺激物,但是并未明确 SDS 是否达到或接近化学物临界水平即被看作皮肤刺激物。这样比起使用纯净材料更适宜的方式是采用 SDS 的最低水平作为一参照点,目前至少有一个区域性组织(欧盟)将 20%(质量浓度)的 SDS 水溶液看作明显的急性皮肤刺激物<sup>[31]</sup>。

由于体外方法的发展和更多地应用于志愿者,实验动物用于皮肤刺激试验正在减少<sup>[10][14]</sup>。生物工程或无创性客观测定方法被用来定量检验刺激反应,因此对过于主观的目视读数记分的依赖性有所减少<sup>[12][16][17]</sup>。不过 Draize 白化兔皮肤刺激试验已具有 10 多年的经验,该方法见参考文献[8]。Draize 皮肤刺激试验是在白化兔体上进行的斑贴试验。试验材料置于纱布敷贴于 3 只已除毛家兔的背部,用胶带固定敷贴物并用半透气性包扎带缠绕动物整个躯体 4 h。4 h 后除去敷贴物并清洁试验部位,对出现的红斑和水肿反应进行评分。同样对 24 h、48 h 和 72 h 的反应进行评分。

兔眼刺激试验也已发展用于预测人眼的刺激性<sup>[27]</sup>。已发表的 Draize 记分系统<sup>[26]</sup>有助于眼刺激反应评价,而图示指南在眼损伤的评价中可起到辅助作用。

用于检验眼刺激作用的体外替代方法尚在发展中,但仍未得到确认和国际间的认可<sup>[21]</sup>。

外推性人体皮肤刺激数据主要来源于研究机构,如见于已出版的《食品与化妆品毒理学》中的有关香料油和其他芳香族化合物芳香材料的专题文献。OECD 指南中的志愿者急性皮肤刺激研究给出了其他背景信息。制定 OECD 指南的化学物组已达成一致意见,有必要针对志愿者局部皮肤反应制定一个 OECD 指南。

### C.2 致敏试验在迟发型超敏反应方面的背景信息

一次或多次接触表皮后,在免疫系统的引发和诱导下,人体会出现致敏反应。关键是半抗原(化学物)必须存在于皮肤并能向里渗透,然后与皮肤蛋白质结合后才形成免疫源性复合物。存在于表皮/真皮交界处朗罕氏细胞将抗原传递给特异性淋巴细胞,而后致敏的淋巴细胞引发免疫反应。这些淋巴细胞中有一小部分为长寿命的记忆细胞,它们在激发阶段作为原始活性因子,这样以后再次接触同一抗原时,致敏的淋巴细胞释放淋巴因子,吸引其他炎症细胞至反应局部,从而导致一系列有害反应。

1895年, Jadassohn 采用斑贴试验揭示了一乘接触过敏症临床病例。这一创新的方法为以后的诊断和预测人及动物接触过敏反应试验提供了科学基础。Landsteiner 和 Chase 等人推荐使用豚鼠测试迟发型超敏反应, 评价化学物潜在致敏性的预期性/预言性试验的发展即是沿续了他们开创性的实践<sup>[48]</sup>。

Magnusson 和 Kligman 等人探索研究了很多不同的豚鼠试验方法, 提出的一种试验方法是豚鼠最大剂量法(GPMT), 首先进行皮内注射[用或不用弗氏佐剂(FCA)], 然后在同一部位局部应用试验材料。最初的方法要求如试验材料是非刺激性的, 应对试验部位预处理。根据该方法的定义, 可检验出微弱致敏物, 因为“微弱”一词包括了阳性反应物的零反应在内。这是一灵敏的试验并已被广泛使用。弗氏完全佐剂的应用提高了试验方法的敏感性, 但也有争论称在某些情况下, 这种应用可能会导致过高估计化合物的致敏潜力。

Buehler<sup>[41]</sup>在1965年提出封闭斑贴法为首选接触方法, 该法产生封闭性, 使接触加严来模拟人体使用过程(人体重复损害斑贴试验: HRIPT)。有人提出封闭性斑贴试验具有敏感性, 能准确地预测出中度至重度致敏物, 这样使 HRIPT 试验中检验有害反应的受试人得以避免接触该类物质。现有的数据证实封闭方法优于皮内注射和开放式局部应用方法。这种方法没有使用佐剂刺激免疫系统, 目前已作为一项被认可的技术, 具有足够的敏感性, 能检测出大部分微弱致敏物, 而且在风险性评价过程中显示出充分的灵活性。但是, 封闭式贴敷试验(Buehler 试验)的敏感性比 GPMT 低<sup>[46]</sup>。

这两种试验在安全性评价中使用率最高, 美国常用封闭性贴敷试验, 欧洲则使用 GPMT。在当前的 OECD 和 EU 试验指南中这两种试验也是优选的方法。豚鼠致敏试验结果取决于许多动物相关因素和有关实验室间试验结果差异性解释的技术因素, 如动物品系、性别、年龄、试验环境条件、动物试验部位除毛(剪毛或剃毛)或化学脱毛方法、敷贴片设计型式、试验材料剂量、封闭程度、接触时间和组织反应读数。正在使用和研究的还有其他许多试验, 而所有这些试验都有其支持者。目前已有几种方法被认可开始制定规则, 研究者应以适当的文件形式提出试验方法并加以验证。在所有的试验中, 均应按按照原始参考资料完成试验步骤。表 C.1 中列出了所提出的其他一些试验。

最近出版的 ECETOC 专著中给出了一种最新的皮肤致敏试验<sup>[44]</sup>。

**表 C.1 其他迟发型接触致敏试验**

- |   |  |
|---|--|
| 1 | 弗氏完全佐剂试验 (Freund's complete adjuvant test)               |
| 2 | Split 佐剂试验 (Split adjuvant test)                         |
| 3 | 开放式表皮试验 (Open epicutaneous test)                         |
| 4 | Mauer 最优化试验 (Mauer optimization test)                    |
| 5 | 豚鼠脚垫试验 (Footpad test in guinea-pig)                      |
| 6 | 累积接触增强试验 (Cumulative contact enhancement test)           |
| 7 | 皮肤划痕(佐剂和贴片)试验 [Scratched skin (adjuvant and patch) test] |
| 8 | 鼠耳肿胀试验 (Mouse ear swelling test)                         |
| 9 | 局部淋巴结测定 (Local lymph node assay)                         |

值得注意的是表 C.1 中的最后一项试验, 即鼠科动物局部淋巴结测定(LLNA)。局部淋巴结测定(LLNA)已被经济与合作发展组织(OECD)接受作为当前豚鼠试验的惟一替代方法, 该法对动物保护方面有所改善<sup>[83]</sup>。

LLNA 的科学原理是, 通过局部接触试验样品后排出鼠耳淋巴结液体, 测定 3H 甲基胸腺嘧啶核苷在淋巴细胞内的结合性来检验致敏反应。该试验不包括激发阶段, 试验所关注的终点是刺激指数(SI), 给出试验动物淋巴结内胸腺嘧啶核苷结合性与对照动物淋巴结内结合性的比率。刺激指数大于 3(SI>3)时为阳性结果。通过实验室内部和实验室相互评价, 已经证实了 LLNA 在剂量水平关系方面具有重现性<sup>[60][76][78][72][59][65][62]</sup>。但是也有报告称 LLNA 很难区分刺激性与变应原性物质<sup>[72][62][79]</sup>,

因此对刺激物可能给出假阳性结果,而对同时具有刺激性和变应原性的材料则可能会过高估计了其变态反应原性<sup>[59]</sup>。然而,LLNA与豚鼠试验相比仍具有优势,如试验周期较短、终点更为客观、所用试验材料较少,并且免除了弗氏完全佐剂注射。细胞活性标记物分析和流式细胞仪的应用有可能改进试验步骤<sup>[68][69]</sup>,但这些能否适合于补充进LLNA标准方法作为常规毒理学应用还尚未确定。从另外一方面来说,LLNA要求对试验介质进行更加局限性的选择,大部分研究者使用一种丙酮和橄榄油的混合剂。最近的研究显示在使用不同的介质时,其结果也有所不同<sup>[77]</sup>。此外,LLNA不能研究激发阶段或交叉反应模型,因为动物在诱导处置之后、淋巴结切下之前已被处死。

淋巴结测定(PLNA)是另外一种淋巴结检验法,该法采用脚垫皮下应用<sup>[68][69][81]</sup>。除了直接测定淋巴结活性作用外,指示抗原可用于进一步阐明化学物在试验条件下产生的免疫调节作用。

风险性评价过程不应仅依赖于单一模式或方法,而应进行多方面考虑,为使用者提供最大的安全性保证。一般来说,评价必须包括动物和人体试验模式,在选择模式和方法中宜具有一定的灵活性,但其理由需形成文件和(或)经过确认。

在进行适当的豚鼠阴性试验时,如试验浓度比实际应用情况更具安全因素,试验结果一般是是可以确定的。但是,应避免在没有对最终产品使用应有的考虑的情况下,仅基于反应发生率和(或)严重性对试验材料分级。

主要从以下四种因素来确定产品的致敏率和严重性风险:化学变应原的致敏潜力、化学变应原在产品中的总量、生物利用率和接触程度。以引发致敏反应所需的最低诱导浓度来限定化学物的致敏潜力,其诱导浓度越低说明致敏剂的致敏潜力越大<sup>[60][40]</sup>。当产品中变应原的残留水平超过其最低诱导浓度(由GPMT中得出)时,会发现使用者中有明显的过敏接触性皮炎发病率。

另外,混合剂和产品的预测性检验很少被确认,并且可在产品成分检验后再进行,试验设计和结果解释相应地是不确定的。但有几个例子证实了预测的可能性。在采用引发人体接触性皮炎的毛线衫制备的丙酮浸提液进行的动物试验中,变应原(phosgene chlorophenylhydrazones)已被证实<sup>[48]</sup>。另一个例子是,用引发人体接触性皮炎的橡胶长筒靴制备的丙酮/氯仿浸提液进行的动物试验最终发现,巯基苯并噻唑(mercaptobenzothiazole)和二硫化二苯并噻唑(dibenzothiazylsulfide)是诱发变应原<sup>[47]</sup>。试验中使用有机溶剂的重要性已得到明确的证实。在用盐水浸提液无反应的情况下,有机溶剂浸提液引发了豚鼠的超敏反应。

日本医用材料和器械基本生物学试验导则(1995)采用有机溶剂制备样品步骤,通过溶剂蒸发方法得到残留物,在风险性评价步骤中对材料残留物百分率与仍能引发动物迟发型超敏反应的残留物(混合剂)的最小稀释百分率进行比较。

皮肤致敏试验的体外方法目前仍未得到确认作为常规试验<sup>[18]</sup>。

参 考 文 献

皮肤、眼刺激试验以及皮肤致敏试验综合性参考文献

- [1] ISO 10993-6 医疗器械生物学评价 第6部分:植入后局部反应试验
- [2] AGNER T. Noninvasive measuring methods for the investigation of irritant patch test reactions. A study of patients with hand eczema, atopic dermatitis and controls. *Acta Derm. Venereol. Suppl. Stockh.*, 173, pp.1-26, 1992
- [3] World Medical Association. Declaration of Helsinki. *Recommendation guiding physicians in biomedical research involving human subjects*. Adopted by the 18<sup>th</sup> World Medical Assembly, Helsinki June 1964, amended by the 29<sup>th</sup> World Medical Assembly, Tokyo, October 1975, the 35<sup>th</sup> World Medical Assembly, Venice, October 1983 and 41<sup>st</sup> World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. Proc. XXVIth Conf., Geneva, 1993
- [4] LEE C. H. and MAIBACH H. I. The sodium lauryl sulfate model: an overview. *Contact Dermatitis*, 33, pp.1-7, 1995
- [5] MARZULLI F. N. and MAIBACH H. I. (eds.) *Dermatotoxicology*, 5<sup>th</sup> edn., Hemisphere Publ. Corp., 1996
- [6] Organization for Economic Cooperation and Development(OECD) *Guideline for the testing of chemicals. Acute dermal irritation study in human volunteers*. Draft document, Nov. 1997
- [7] Organization for Economic Cooperation and Development(OECD) *Guidelines for the testing of chemicals No. 406, Skin sensitization*, OECD Publications, 1992
- [8] Organization for Economic Cooperation and Development(OECD) *Guidelines for the testing of chemicals No. 404, Acute skin irritation/corrosion*, OECD Publications, 1992
- [9] Organization for Economic Cooperation and Development(OECD) *Guidelines for the testing of chemicals No. 405, Acute eye irritation/corrosion*, OECD Publications, 1992
- [10] PONEC M. *In vitro* models to predict skin irritation. In: *The Irritant Contact Dermatitis Syndrome*. Van der Valk P. G. M. and Maibach H. I. (eds). Boca Raton, CRC Press, pp.335-341, 1996
- [11] RUSSEL W. M. S. and BURCH R. L. *The principles of humane experimental technique*, 238 pp., London, Methuen, 1959
- [12] SERUP J. and JEMEC G. B. E. *Handbook of non-invasive methods and the skin*. CRC Press, 1995
- [13] SILVA O. de., BASKETTER D. A., BARRATT M. D. et al. *Alternative methods for skin sensitization testing*. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 19. ATLA, 24, pp.683-705, 1996
- [14] SIMION F. A. *In vivo* models to predict skin irritation. In: *The Irritant Contact Dermatitis Syndrome*. Van der Valk P. G. M. and Maibach H. I. (eds). Boca Raton, CRC Press, pp.329-334, 1996
- [15] SVENDSEN O., GARTHOFF B., SPIELMANN H. et al. Alternatives to the animal testing of medical devices. *ALTA*, 24, pp.659-670, 1996
- [16] WAHLBERG J. E. Assessment of skin irritancy: measurement of skin fold thickness. *Contact Dermatitis*, 9, pp.21-26, 1983

- [17] WAHLBERG J. E. and WAHLBERG E. N. Quantification of skin blood flow at patch test sites. *Contact Dermatitis*, 17, pp.229-233,1987
- [18] WAHLBERG J. E. and WAILBACH H. I. Nonanoic acid irritation—A positive control at routine patch testing? *Contact dermatitis*, 6, pp.128-130,1980
- [19] WAHLBERG J. E., WRANGSJO K. and HIETASOLA A. Skin irritancy from nonanoic acid. *Contact dermatitis*, 13, pp.266-269,1985
- [20] WEIL S. C. and SCALA R. A. Study of intra-and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 12, pp.276-360,1971

#### 皮肤和眼刺激试验参考文献

- [21] BALLS M., BERG N. and BRUNER L. H. *et al.* Eye irritation testing; the way forward. *ATLA*, 27, pp.53-78,1999
- [22] BASKETTER D. A., WHITTLE E., GRIFFITHS H. A. *et al.* The identification and classification of skin irritation hazard by a human patch test. *Food Chem. Toxicol.*, 32, pp.769-775,1994
- [23] BOTHAM P. A., EARL L. K., FENTEM J. H. *et al.* Alternative methods for skin irritation testing; the current status. *ALTA*, 26, pp.195-212,1998
- [24] BRUNER L. H., KAIN D. J., ROBERTS D. A. *et al.* Evaluation of seven in vitro alternatives for ocular testing. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 17, pp.136-149,1991
- [25] DRAIZE J. H. *Dermal Toxicity*. Association of food and drug officials of the U. S. FDA, Washington, D. C. pp.46-59,1955
- [26] DRAIZE J. H. *Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs, and cosmetics*, Austin, Texas. Association of food and drug officials of the United States, Texas State Department of Health, Texas, 1959
- [27] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre. *Eye irritation testing*, Monograph 11, Brussels, Belgium, 1988
- [28] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre. *Skin irritation*, Monograph 15, Brussels, Belgium, 1990
- [29] GERNER L., GRAETSCHER G., KAHL J. *et al.* Development of a decision support system for the introduction of alternative methods into local irritancy/corrosivity testing strategies. Development of a relational database. *ALTA*, 26, pp.11-28, 2000
- [30] STEINBERG M., AKERS W. A., WEEKS M. *et al.* *A comparison of test techniques based on rabbit and human skin responses to irritants with recommendations, regarding the evaluation of mildly or moderately irritating compounds*. Animal Models in Dermatology. Maibach H. I. (ed.), N. Y., Churchill Livingstone, pp.1-11, 1975
- [31] YORK M., GRIFFITHS H. A., WHITTLE E. *et al.* Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential. *Contact Dermatitis*, 34, pp.204-212,1996

#### 口腔刺激试验参考文献

- [32] NILSSON R., FALLAN J. O., LARSSON K. S. *et al.* Electrical impedance—A new parameter for oral mucosal irritation tests. *J. Mater. Science; Materials in Medicine*, 3, p. 278,1992
- [33] ROY M. and WHITE H. I. Establishment of an improved technique for hamster mucous mem-



brane irritation testing. *J. Dent. Res.*, 11, pp.365-1375, 1986

**阴道刺激试验参考文献**

- [34] CHVAPIL M., CHVAPIL T. A., OWEN J. A. *et al.* Reaction of vaginal tissue of rabbits to inserted sponges made of various materials. *J. Biomed. Mater. Res.*, 13, pp.1-13, 1979
- [35] ECKSTEIN P., JACKSON M. C., MILLMAN N. *et al.* Comparisons of vaginal tolerance tests of spermicidal preparations in rabbits and monkeys. *J. Reprod. Fertil.*, 20, pp.85-93, 1969
- [36] KAMINSKY M. and WILLIGAN D. A. pH and the potential irritancy of douche formulations to the vaginal mucosa of the albino rabbit and rat. *Food Chem. Toxicol.*, 20, pp.193-196, 1982
- [37] MULLER P., RAABE G., HOROLD J. *et al.* Action of chronic peracetic acid(wofasteril)-administration on the rabbit oral mucosa, vaginal mucosa and skin. *Exp. Pathol.*, 34, pp.223-228, 1988

**皮肤致敏试验参考文献**

- [38] ANDERSEN K. E. and MAIBACH H. I. Contact allergy predictive tests in guinea pigs. *Curr. Probl. Dermatol.*, 14, 1985
- [39] ANDERSEN K. E. and MAIBACH H. I. Guinea pig sensitization assays. An overview. *Curr. Probl. Dermatol.*, 14, pp.263-290, 1985
- [40] ANDERSEN K. E., VØLUND A. and FRANKILD S. The guinea pig maximization test with a multiple dose design. *Acta Derm. Venereol.*, 75, pp.463-469, 1995
- [41] BUEHLER E. V. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch. Dermatol.*, 91, pp.171-175, 1965
- [42] BUEHLER E. V. A rationale for the selection of occlusion to induce and elicit delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. A prospective test. *Curr. Probl. Dermatol.*, 14, pp.39-58, 1985
- [43] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre. *Skin sensitization testing*, Monograph 14, Brussels, Belgium, 1990
- [44] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre. *Skin sensitization testing for the purpose of hazard identification and risk assessment*. Monograph 29, Brussels, Belgium, 2000
- [45] FRANKILD S., BASKETTER D. A. and ANDERSEN K. E. The value and limitations of re-challenge in the guinea pig maximization test. *Contact Dermatitis*, 35, pp.135-140, 1996
- [46] FRANKILD S., VØLUND A., WAHLBERG J. E. *et al.* Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy. *Acta Derm. Venereol.*, 80, pp.256-262, 2000
- [47] KANIWA M. A., MOMMA J., IKARASHI Y. *et al.* A method for identifying causative chemicals of allergic contact dermatitis using a combination of chemical analysis and patch testing in patients and animal groups; application to a case of rubber boot dermatitis. *Contact Dermatitis*, 27, pp.166-173, 1992
- [48] KOJIMA S., MOMMA J. and KANIWA M. A. Phosgene (chlorophenyl) hydrazones, strong sensitizers found in yellow sweaters bleached with sodium hypochlorite, defined as causative allergens for contact dermatitis by an experimental screening method in animals [published erratum appears in *Contact Dermatitis*, 23, p. 383]. *Contact Dermatitis*, 23, pp.129-141, 1990
- [49] LANDSTEINER K. and CHASE M. W. Studies on the sensitization of animals with simple

- chemical compounds. *J. Exp. Med.*, 69, p.767, 1939
- [50] MAGNUSSON B. and KLIGMAN A. M. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.*, 52, pp.268-276, 1969
- [51] NAKAMURA A., MOMMA J., SEKIGNCHI H. *et al.* A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test. *Contact Dermatitis*, 31, pp.72-85, 1994
- [52] NEWMANN E. A., BUEHLER E. V. and PARKER R. D. Delayed contact hypersensitivity in the vagina and skin of the guinea pig. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3, pp.521-527, 1983
- [53] POLIKANDRITOU M. Enhancement of the sensitivity of the Buehler method by use of the Hill Top chamber. *Soc. Cosmetic Chem.*, 36, pp.151-168, 1996
- [54] RITZ H. L. and BUEHLER E. V. Planning, conduct and interpretation of guinea pig sensitization patch tests. In DRILL V. and LAZAR P. (eds.) *Current concepts in cutaneous toxicity*, Academic Press, New York pp.25-40, 1979
- [55] ROBERTS D. W. Structure-activity relationships for skin sensitization potential of diacrylates and dimethacrylates. *Contact Dermatitis*, 17, pp.281-289, 1987
- [56] ROBINSON M. K., STOTTS J., DANNEMAN P. J. *et al.* A risk assessment process for allergic contact sensitization. *Food. Chem. Toxicol.*, 27, pp.479-489, 1989
- [57] ROBINSON M. K., NUSAIR T. L., FLETCHER E. R. *et al.* A review of the Buehler guinea pig skin sensitization test and its use in a risk assessment process for human skin sensitization. *Toxicology*, 61, pp.91-107, 1990

#### 局部淋巴结测定(LLNA)参考文献

- [58] ALBERS R., BROEDERS A., VAN DER PUJL A. *et al.* The use of reporter antigens in the popliteal lymph node assay to assess immunomodulation by chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143, pp.102-109, 1997
- [59] BASKETTER D. A., LEA L. J., COOPER K. *et al.* Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: a statistical evaluation. *Food. Chem. Toxicol.*, 37, pp.1167-1174, 1999
- [60] BASKETTER D. A., ROBERTS D. W., CRONIN M. *et al.* The value of the local lymph node assay in quantitative structure-activity investigations. *Contact Dermatitis*, 27, pp.137-142, 1992
- [61] BASKETTER D. A. and SCHOLEE E. W. Comparison of the local lymph node assay with the guinea pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Food. Chem. Toxicol.*, 30, pp.65-69, 1992
- [62] BASKETTER D. A., SCHOLEE E. W. and KIMBER I. The performance of the local lymph node assay with chemicals identified as contact allergens in the human maximization test. *Food. Chem. Toxicol.*, 32, pp.543-547, 1994
- [63] DE BAKKER J. M., KAMMÜLLER M. E., MULLER E. S. M. *et al.* Kinetics and morphology of chemically induced popliteal lymph node reactions compared with antigen-mitogen, and graft-versus-host-reaction-induced-responses. *Virchows Archiv. B Cell Pathol.*, 58, pp.279-287, 1990
- [64] DEAN J., TWERDOK L. E., ANDERSEN K. E. *et al.* *The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds.*

NIH publication No. 99-494, Research Triangle Park, 1999, available at <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/lnadocs/lnarep.pdf>

- [65] DEARMAN R. J. , BASKETTER D. A. and KIMBER I. Local lymph node assay; use in hazard and risk assessment. *J. Appl. Toxicol.* , 19, pp.299-306, 1999
- [66] DESCOTES J. , PATRIARCA C. , VIAL T. *et al.* The popliteal lymph node assay in 1996. *Toxicol.* , 119, pp.45-49, 1997
- [67] EDWARDS D. A. , SORANOO T. M. , AMORUSO M. A. *et al.* Screening petrochemicals for contact hypersensitivity potential; a comparison of the murine local lymph node assay with guinea pig and human test data. *Fundam. Appl. Toxicol.* , 23, pp.179-187, 1994
- [68] GERBERICK G. F. . GRUSE L. W. and RYAN C. A. Local lymph node assay: differentiating allergic and irritant responses using flow cytometry. *Methods.* 19, pp.48-55, 1999(a)
- [69] GERBERICK G. F. , GRUSE L. W. , MILLER C. M. *et al.* Selective modulation of B-cell activation markers CD86 and I-AK on murine draining lymph node cells following allergen or irritant treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 159, pp.142-151, 1999(b)
- [70] IKARASHI Y. , OHNO K. , MOMMA J. *et al.* Assessment of contact sensitivity of two thiourea rubber accelerators; comparison of two mouse lymph node assays with the guinea pig maximization test. *Food Chem. Toxicol.* , 32, pp.1067-1072, 1994
- [71] IKARASHI Y. , TSUCHIYA T. and NAKAMURA A. Detection of contact sensitivity of metal salts using the murine local lymph node assay. *Toxicol. Lett.* , 62, pp.53-61, 1992
- [72] IKARASHI Y. , TSUCHIYA T. and NAKAMURA A. A sensitive mouse lymph node assay with two application phases for detection of contact allergens. *Arch. Toxicol.* , 67, pp.629-636, 1993
- [73] IKARASHI Y. , TSUCHIYA T. and NAKAMURA A. Application of sensitive mouse lymph node assay for detection of contact sensitization capacity of dyes. *J. Appl. Toxicol.* , 16, pp.349-354, 1996
- [74] IKARASHI Y. , TSUKAMOTO Y. , TSUCHIYA T. *et al.* Influence of irritants on lymph node cell proliferation and the detection of contact sensitivity to metal salts in the murine local lymph node assay. *Contact Dermatitis* , 29, pp.128-132, 1993
- [75] KIMBER I. and BASKETTER D. A. *The murine local lymph node assay: a commentary on collaborative studies and new directions.* *Food Chem. Toxicol.* , 30, pp.165-169, 1992
- [76] KIMBER I. , HILTON J. , DEARMAN R. J. *et al.* An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicol.* , 103, pp.63-73, 1995
- [77] LEA L. J. , WARBRICK E. V. , DEARMAN R. J. *et al.* The impact of vehicle on assessment of relative skin sensitization potency or 1,4-dihydroquinone in the local lymph node assay. *Am. J. Contact Dermatitis* , 10, pp.213-218. 1999
- [78] LOVELESS S. E. , LADICS G. S. , GERBERICK G. F. *et al.* Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicol.* , 108, pp.141-152. 1996
- [79] MONTELIUS J. , WAHLKVIST H. , BOMAN A. *et al.* Experience with the murine local lymph node assay; inability to discriminate between allergens and irritants. *Acta Derm. Venereol.* , 74, pp.22-27, 1994

- [80] ROBERTS D. W. Structure-activity relationships of skin sensitization potential of diacrylates and dimethacrylates. *Contact Dermatitis*, 17, pp.281-289, 1987
- [81] VIAL T. , CARLEER J. , LEGRAIN B. *et al.* The popliteal lymph node assay: results of a preliminary interlaboratory validation study. *Toxicol.* , 122, pp.213-218, 1997
- [82] WARBRICK E. V. , DEARMAN R. J. , LEA L. J. *et al.* Local lymph node assay responses to paraphenylenediamine; intra- and inter-laboratory evaluations. *J. Appl. Toxicol.* , 19, pp.225-260, 1999
- [83] Organization for Economic Cooperation and Development, Guideline for the testing of chemicals No. 429, Skin sensitisation: Local lymph node assay, OECD Publications, 2002
-