



229

中华人民共和国国家标准

GB/T 16886.10—2017/ISO 10993-10:2010
代替 GB/T 16886.10—2005

医疗器械生物学评价 第 10 部分：刺激与皮肤致敏试验

Biological evaluation of medical devices—
Part 10: Tests for irritation and skin sensitization

(ISO 10993-10:2010, IDT)

2017-12-29 发布

2018-07-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

GB/T 16886《医疗器械生物学评价》，由下列部分组成：

- 第 1 部分：风险管理过程中的评价与试验；
- 第 2 部分：动物福利要求；
- 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 9 部分：潜在降解产物的定性与定量框架；
- 第 10 部分：刺激与皮肤致敏试验；
- 第 11 部分：全身毒性试验；
- 第 12 部分：样品制备与参照材料；
- 第 13 部分：聚合物医疗器械降解产物的定性与定量；
- 第 14 部分：陶瓷降解产物定性与定量；
- 第 15 部分：金属与合金降解产物定性与定量；
- 第 16 部分：降解产物与可沥滤物毒代动力学研究设计；
- 第 17 部分：可沥滤物允许限量的建立；
- 第 18 部分：材料化学表征；
- 第 19 部分：材料物理化学、形态学和表面特性表征；
- 第 20 部分：医疗器械免疫毒理学试验原则和方法。

本部分为 GB/T 16886 的第 10 部分。

有关其他方面的生物试验将有其他部分的标准。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替 GB/T 16886.10—2005《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》，与 GB/T 16886.10—2005 相比，主要技术变化如下：

- 修改了标准名称；
- 修改了术语和定义(第 3 章,2005 年版的第 3 章)；
- 取消了“材料鉴别”(见 2005 年版的 5.4)；
- 皮内反应试验由附录调整到正文中(见 6.4,2005 年版的附录 B)；
- 人体皮肤刺激试验方法由正文调整到附录(见附录 C,2005 年版的 6.4)；
- 皮肤致敏试验增加小鼠局部淋巴结检验法(见 7.2)；
- 增加了体外皮肤刺激试验(见附录 D)；
- 增加了聚合物试验材料浸提液制备方法(见附录 E)。

本部分使用翻译法等同采用 ISO 10993-10:2010《医疗器械生物学评价 第 10 部分：刺激与皮肤致敏试验》。

与本部分中规范性引用的国际文件有一致性对应关系的我国文件如下：

GB/T 16886.2—2011 医疗器械生物学评价 第 2 部分：动物福利要求(ISO 10993-2:2006,IDT)

GB/T 16886.9—2017 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 16886.10—2017/ISO 10993-10:2010

(ISO 10993-9:2009, IDT)

GB/T 16886.12—2017 医疗器械生物学评价 第12部分:样品制备与参照材料(ISO 10993-12:2012, IDT)

GB/T 16886.13—2017 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(ISO 10993-13:2010, IDT)

GB/T 16886.14—2003 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(ISO 10993-14:2001, IDT)

GB/T 16886.15—2003 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(ISO 10993-15:2000, IDT)

GB/T 16886.18—2011 医疗器械生物学评价 第18部分:材料化学表征(ISO 10993-18:2005, IDT)

本部分由国家食品药品监督管理总局提出。

本部分由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会(SAC/TC 248)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;深圳市医疗器械检测中心。

本部分主要起草人:王昕、曹苹、范春光、刘尧、徐伟区。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB/T 16886.10—2000;

——GB/T 16886.10—2005。

引言

GB/T 16886 的本部分用于评定从医疗器械中释放出的化学物可能引起的接触性危害,包括导致皮肤与黏膜刺激、眼刺激或皮肤致敏反应。

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人体组织接触时可能会产生不良作用。因此,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,还增加了作为辅助或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。适宜时,本部分鼓励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,本部分提出逐步评价方法,在每一阶段都对试验结果进行评审和分析。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良好实验室质量管理规范并遵守与动物福利有关的规则。建议在适宜的情况下对数据进行统计分析。

本部分由经过培训有经验、有适当资格的专业人员使用,能够解释标准要求并能考虑与器械全部相关因素,包括器械的预期用途、由科学文献的评审和先前临床经验给出的该医疗器械的当前知识,来判定每一医疗器械的评价结果。

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。

本部分以诸多标准和导则为基础,包括 OECD 导则、美国药典和欧洲药典。本部分可作为基础文件,用于选择和实施能评价与医用材料和器械安全性相关的刺激和皮肤致敏反应的试验。

医疗器械生物学评价

第 10 部分:刺激与皮肤致敏试验

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皮肤致敏的评价步骤。

本部分包括:

- a) 刺激试验前的考虑,包括皮肤接触方面的生物模拟实验和体外方法;
- b) 详细的体内(刺激和致敏)试验步骤;
- 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 给出了适用于医疗器械的除皮肤部位之外的几种特殊刺激试验。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 16886.1—2011 医疗器械生物学评价 第 1 部分:风险管理过程中的评价与试验(ISO 10993-1:2009,IDT)

ISO 10993-2 医疗器械生物学评价 第 2 部分:动物福利要求(Biological evaluation of medical devices—Part 2:Animal welfare requirements)

ISO 10993-9 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(Biological evaluation of medical devices—Part 9:Framework for identification and quantification of potential degradation products)

ISO 10993-12 医疗器械生物学评价 第 12 部分:样品制备与参照样品(Biological evaluation of medical devices—Part 12:Sample preparation and reference materials)

ISO 10993-13 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定量(Biological evaluation of medical devices—Part 13:Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices)

ISO 10993-14 医疗器械生物学评价 第 14 部分:陶瓷降解产物的定性定量(Biological evaluation of medical devices—Part 14:Identification and quantification of degradation products from ceramics)

ISO 10993-15 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定量(Biological evaluation of medical devices—Part 15:Identification and quantification of degradation products from metals and alloys)

ISO 10993-18 医疗器械生物学评价 第 18 部分:材料化学表征(Biological evaluation of medical devices—Part 18:Chemical characterization of materials)

ISO 14155-1 用于人体的医疗器械临床研究 第 1 部分:通用要求(Clinical Investigation of Medical Devices for Human Subjects—Part 1:General Requirement)

ISO 14155-2 用于人体的医疗器械临床研究 第 2 部分:临床研究方案(Clinical investigation of

3 术语和定义

GB/T 16886.1—2011 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

变应原 allergen

致敏原 sensitizer

在反复接触后能引起某一类特异性超敏反应的物质或材料。

3.2

空白 blank

不加试验材料的浸提介质,置于与试验材料相同的容器中,并经受与试验材料相同的浸提条件。

注:空白对照的目的是评价浸提容器、浸提介质和浸提过程可能的干扰作用。

3.3

激发 challenge

诱发 elicitation

诱导阶段后的过程,在这一阶段检验个体后续接触诱导材料的免疫学反应。

3.4

剂量 dose

用量 dosage

按单位重量或表面积表示的试验样品的给予量(如质量、体积)。

注:这两个术语通常可交换使用(用量较为常用)。

3.5

红斑 erythema

皮肤或黏膜发红。

3.6

焦痂 eschar

皮肤结痂或变色的蜕皮。

3.7

浸提液 extract

某一试验材料或对照材料在控制条件下与溶剂接触后获取到的液体或悬浮液。

3.8

诱导 induction

导致个体对某一特定材料重新形成免疫学活性增强状态的过程。

3.9

刺激物 irritant

引起刺激的物质。

3.10

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。

注:皮肤刺激是一种可逆反应,主要以皮肤局部红斑(发红)为特征。

3.11

坏死 necrosis

由于损伤或疾病造成的不可逆改变直接导致细胞死亡。

注：宜注意组织修复会导致完全性功能恢复或瘢痕形成。

3.12

阴性对照 negative control

当按规定步骤试验时，在试验系统中证明试验步骤适宜性的出现可再现的适当的阴性、无反应或最小反应的经充分表征的材料或物质。

注：实际操作中，阴性对照包括空白、介质/溶剂和参照材料。

3.13

水肿 oedema

液体向组织内异常渗透引起的肿胀。

3.14

阳性对照 positive control

当按规定试验方法评价时，在试验系统中证明试验步骤适宜性的出现可再现的适当的阳性或反应性应答的经充分表征的材料或物质。

3.15

皮肤腐蚀 skin corrosion

应用某一试验样品后皮肤的不可逆性损伤结果，表现为从表皮至真皮的明显坏死。

示例：混合物/化学物/试验样品作用所导致的皮肤溃疡（见 3.19）。

3.16

皮肤致敏 skin sensitization

变应性接触性皮炎

免疫介导的对某种物质的皮肤反应。

注：这种反应在人体上以瘙痒、红斑、水肿、丘疹、大（小）水泡、或此类综合症状为特征，其他种属表现可能不同，仅出现红斑和水肿。

3.17

试验材料 test material

取样供生物学或化学试验用的材料、器械、器械的一部分或其组件。

3.18

试验样品 test sample

供生物学或化学试验或评价用的材料、器械、器械的一部分、组件、浸提液或浸提液的一部分。

3.19

溃疡 ulceration

表现为表浅组织缺损的开放性溃烂。

3.20

介质 vehicle

用于湿化、稀释、悬浮、浸提或溶解试验物质/材料的液体。

4 基本原则—逐步评价法

现有的检验刺激与致敏的试验方法特别设定为测定潜在的皮肤刺激和黏膜刺激以及皮肤致敏作用，这些试验一般不预示其他类型的不良作用。对于植入医疗器械或外部接入医疗器械，皮内注射试验更为接近实际应用，因此用于检验刺激作用，应按照 6.4 的描述进行皮内试验。

本部分要求逐步评价法，应包括下列一项或多项内容：

a) 按照 ISO 10993-9、ISO 10993-13、ISO 10993-14、ISO 10993-15 和 ISO 10993-18 的基本原则，

对试验材料进行表征,涉及对试验样品进行化学表征和分析;

- b) 文献检索,包括对试验材料化学和物理性能的评价、任何产品组分以及相关结构的化学物和材料的潜在刺激和致敏信息;
- c) 按照 ISO 10993-2,应考虑体外试验优先于体内试验,若新的体外法经科学认可并具有合理性和实用性时,可取代体内试验。已有体外替代方法用于化学物皮肤刺激和腐蚀的评价,目前尚没有经国际确认并接受的检验致敏物的体外试验;
- d) 体内动物试验:为了确保试验的再现性和敏感性,检测实验室应在每次刺激与致敏试验中包括阳性对照物试验,以验证试验系统并证实阳性反应。然而,对于豚鼠致敏试验,当试验系统一致性在 6 个月或更长持续时间得以证实时,则每次试验中无需包括阳性对照,但每隔一定时间(不应超过 6 个月)要进行阳性对照试验;

注 1: 目前对致敏作用只能通过体内试验进行测定,可采用小鼠局部淋巴结试验(LLNA)、豚鼠封闭贴敷试验或豚鼠最大剂量试验(GPMT)。LLNA 为目前测定单一化学物潜在致敏作用的首选方法,见参考文献[69]、[88]、[90]。

注 2: 试验材料不能表征或采用在 a)、b)和 c)阶段获取的信息不能进行风险评定时,体内动物试验适用。

注 3: 对于豚鼠致敏试验,每 6 个月一般要采用 10 只动物用于阳性对照。在比每 6 个月更频繁的时间内进行阳性对照物质试验时,可采用较少的豚鼠,宜至少采用 5 只试验动物用于阳性物质和 5 只对照动物。

- e) 非侵入性人体试验/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。

在获知 a)~d)中的其他评价结果之前,按照 ISO 14155-1 和 ISO 14155-2 和伦理准则不应进行临床试验。

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,其可以得出无需进行刺激和/或致敏试验的结论。

GB/T 16886.1—2011 的第 5 章中给出的和下列条款的要求是适用的。

非无菌样品只应通过局部试验进行研究,因为试验样品微生物污染的可能性会干扰最终试验解释。对不能保证无菌但仍认为是无污染的试验样品,皮内试验可能要进行论证。

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。除了原材料和制造加工助剂的化学成分外,装配黏合剂/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终产品中,这些成分是否产生健康危害(风险)取决于终产品的渗漏或降解性能,应考虑这些成分潜在的刺激/致敏活性。

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一般要比 5.2.2 中复杂一些,可能有若干反应性产物/杂质/添加剂,而且聚合反应的完全程度可能会有不同。

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为检验生物衍生材料而设计,因此不足以检验该类材料,例如本部分中的试验未考虑跨物种致敏作用。

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,说明应形成文件并进行论证。

5.3.2 现有的数据来源

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与定量信息。

聚合物常要求专利信息的使用权,宜签署转让和使用这种机密信息的条款。

还应从产品制造的制造链的适宜成员中(包括半成品和零件制造商)索取其他任何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。

应按照 ISO 10993-18 测定最终产品的化学成分。

注:可依据 ISO 或美国试验材料协会(ASTM)标准和/或用户的要求规定陶瓷、金属和合金的成分,但为了获取完整的成分定性与定量资料,可能还需要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,以保证还能鉴别加工助剂。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。

6 刺激试验

6.1 体外刺激试验

体外试验,即大鼠皮肤经皮电阻抗(TER)试验和人体皮肤模型试验,已被国际间确认并接受为评价化学物皮肤腐蚀性的替代试验(OECD 导则 430^[9]和 431^[10])方法。在研究替代方法的同时,各国际和各国家组织一直在进行体外皮肤刺激试验的建立和确认工作,有些团体正在研究试验方法中动物和人体反应的量化指标,以能够应用无创技术更好地限定终点(见 F.1)。

注:欧洲替代方法验证中心咨询委员会(ESAC)2007 年对用于化学物皮肤刺激测定的一种体外人体皮肤模型的确认过程进行了评价,见参考文献[101]。附录 D 描述了应用体外人体模型评定化学物引起皮肤刺激的潜能。

目前体外皮肤刺激试验仅确认用于纯化学物,不适用于医疗器械浸提液。为了应用这些方法检验医疗器械的刺激潜能,有必要对这种特定应用进一步确认。

6.2 体内刺激试验—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终产品和/或浸提液进行。

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) 应用部位；
- f) 接触周期和接触次数；
- g) 评价试验所采用的技术。

附录 F 提供了其他背景信息。

下列详细的试验方案的灵活性有时可使研究者提高试验的敏感性,以适应各种使用和人群接触条件,但试验步骤的一致性有助于不同材料和不同实验室的试验结果具有可比性。

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。

试验样品的 pH 如 ≤ 2.0 或 ≥ 11.5 ,应认为是一种刺激物,不必进一步试验。然而,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能力的唯一因素,试验材料的浓度、接触时间以及许多其他理化性能也都是重要的因素。

特殊情况下需要进一步的风险表征/评定,可能需要检验材料的刺激性或材料的 pH 在上述范围之外,这种情况应论证并形成文件。

6.3 动物刺激试验

6.3.1 原理

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能做出评定。

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。

应证明试验的敏感性,可通过在试验中设置一组阳性对照来加以证实。然而,采用阳性对照来证实敏感性仅限于实验室在之前的 6 个月内应用该试验方法未产生阳性结果的情况。

注:十二烷基硫酸钠(SLS)是适宜的阳性对照。

6.3.3 动物与管理

应使用 3 只健康、初成年的白化兔,雌雄不限,同一品系,体重不低于 2 kg。如预期有刺激反应,初试应考虑使用 1 只动物。除非出现明确的阳性反应[红斑或水肿记分大于 2(见表 1)],否则应至少再使用 2 只动物进行试验。在使用了至少 3 只动物后,如为疑似反应,应考虑进行复试。

应使动物适应环境,并按 ISO 10993-2 的规定饲养。

表 1 皮肤反应记分系统

反 应	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)至无法进行红斑分级的焦痂形成	4

表 1 (续)

反 应	刺激记分
水肿形成	
无水肿	0
极轻微水肿(勉强可见)	1
清晰水肿(肿起边缘清晰)	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
应记录并报告皮肤部位的其他异常情况。	

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 4 h~24 h 前在动物背部脊柱两侧除去足够面积被毛(约 10 cm×15 cm 区域),用作试验和观察部位。为了便于观察和/或再次试验,可能需反复除毛。如果试验机构确认了脱毛剂的使用过程,则可由专业人员使用脱毛剂除毛。如需反复接触,则按照下列 6.3.4.2.1、6.3.4.2.2 或 6.3.4.2.3 步骤进行,时间最长为 21 d。

6.3.4.2 试验样品的应用

6.3.4.2.1 粉剂或液体样品的应用

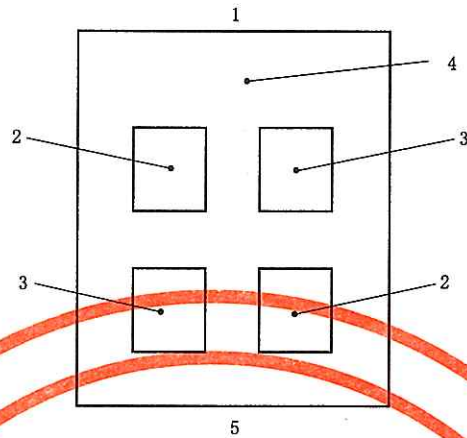
将 0.5 g 或 0.5 mL 的试验材料直接置于图 1 所示皮肤部位。固体和疏水性材料无需湿化处理,粉剂使用前宜用水或其他适宜的溶剂稍加湿化(见附录 A)。

用 2.5 cm×2.5 cm 非封闭式的敷料(如吸水性纱布块)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小心拭干。

6.3.4.2.2 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 大小的吸水性纱布块上,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)覆盖敷贴部位至少 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小心拭干。



说明

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

图 1 皮肤应用部位

6.3.4.2.3 固体样品的应用

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),应使用水或必要时选择一种替代溶剂将试验材料充分湿化,以保证与皮肤良好的接触性(见附录 A)。如使用溶剂,应考虑溶剂对试验材料所致皮肤刺激反应的影响。

用 2.5 cm×2.5 cm 的非封闭性敷料(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小心拭干。

6.3.5 动物观察

6.3.5.1 总则

特别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技术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,分别在除去敷贴片后(1±0.1)h、(24±2)h、(48±2)h 和(72±2)h 记录各接触部位情况。如存在持久性损伤则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,但延长期不超过 14 d。

6.3.5.3 重复接触试验

重复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±2)h后]。

重复接触试验时,每次在除去敷贴片后(1±0.1)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,分别在除去敷贴片后(1±0.1)h、(24±2)h、(48±2)h和(72±2)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±2)h、(48±2)h和(72±2)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。

在72 h评分后,分别将每只动物试验样品和空白在(24±2)h、(48±2)h和(72±2)h引起的全部红斑和水肿记分相加,再将所有计分之总和除以6(两个试验/观察部位,3个时间点)计算出某一动物的原发刺激指数。

将每只动物全部原发性刺激记分相加后再除以动物总数(一般为3)得出试验样品原发性刺激指数。

当采用空白或阴性对照时,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。

对重复接触试验,应按照上述方法计算每只动物原发性刺激记分,考虑全部评价终点。按下列规定计算累积刺激指数。

将全部动物刺激记分相加后再除以动物总数,该值即为累积刺激指数。

将累积刺激指数对照表2给出的刺激反应,报告相应的反应类型。

注:累积刺激指数分级是基于化学物在家兔试验中得出的原发性刺激指数(PII),和大量化学物在人体试验中得出的原发性刺激反应的关系而确定的。

记录每只动物的任何反应,包括表1中给出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)给出了原发性或累积刺激指数。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2 兔原发性或累积刺激指数类型

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) 重复接触时的接触次数和接触周期；
- i) 结果评价。

6.4 动物皮内反应试验

6.4.1 简介

用作植入物的医疗器械采用皮内反应试验。通过皮内注射材料浸提液,对材料在试验条件下产生刺激反应的潜能做出评定。

6.4.2 应排除的试验材料

任何显示为皮肤、眼、黏膜组织刺激物的材料,或是 $\text{pH} \leq 2.0$ 或 ≥ 11.5 的材料,不应进行皮内试验。需要进一步的风险表征/评定的例外情况下,即使已知被试材料是刺激物或材料的 pH 在上述范围之外可能还是需要进行测试,这种情况应论证并形成文件。

6.4.3 试验样品

试验样品应按附录 A 制备成浸提液。由于每一动物有多个试验部位,可将几种试验样品与适宜的阴性对照或空白液一起应用。

6.4.4 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 ISO 10993-2 的规定饲养。评价试验材料初试应至少采用 3 只动物。如预期有刺激反应,初试应考虑使用 1 只动物。除非出现明显的阳性反应[红斑或水肿记分大于 2(见表 1)],否则应至少再使用 2 只动物进行试验。在使用了至少 3 只动物后,如为疑似反应,应考虑进行复试。

6.4.5 试验步骤

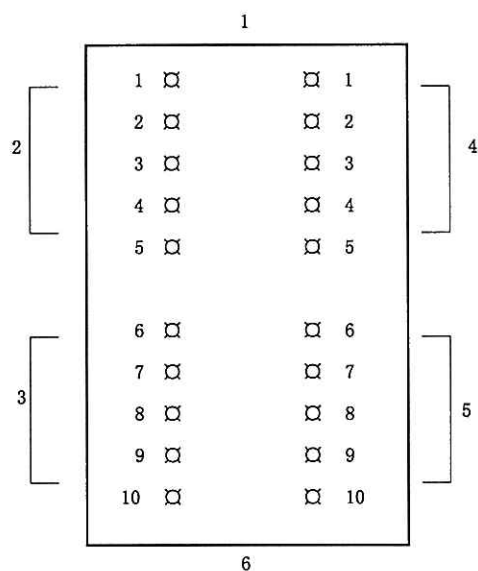
试验前 4 h~18 h,彻底除去动物背部脊柱两侧足够面积的被毛,以备注射浸提液。

在每只兔脊柱一侧的 5 个点皮内注射 0.2 mL 用极性或非极性溶剂制备的浸提液。应根据试验材料的粘度选用最小规格的注射针进行皮内注射。

图 2 给出了注射点排列示例。

在每只兔的脊柱另一侧注射极性和非极性溶剂对照液,操作步骤同上(举例见图 2)。

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。



说明:

1——头端；

2——0.2 mL 极性浸提液注射点；

3——0.2 mL 非极性浸提液注射点;

4——0.2 mL 极性溶剂对照液注射点；

5——0.2 mL 非极性溶剂对照液注射点；

6——尾端。

图 2 注射点排列

6.4.6 动物观察

注射后即刻并在 $(24\pm 2)\text{h}$ 、 $(48\pm 2)\text{h}$ 和 $(72\pm 2)\text{h}$ 观察记录各注射部位状况。

按表 3 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±2)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。

如可行也可使用非侵入性技术以有助于评价。

表 3 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)至无法进行红斑分级的焦痂形成	4

表 3 (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(肿起边缘清晰)	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
应记录并报告注射部位的其他异常情况。	

6.4.7 结果评价

在 (72 ± 2) h 评分后,分别将每只动物试验样品或空白对照的 (24 ± 2) h、 (48 ± 2) h 和 (72 ± 2) h 的全部红斑与水肿记分相加,再除以 $15[3(\text{记分时间点}) \times 5(\text{试验样品或空白对照注射点})]$,计算出每只动物试验样品或空白对照的记分。3 只动物记分相加后除以 3 得出每一试验样品和相应空白对照的总平均记分。试验样品记分减去空白对照记分可得出试验样品最终记分。如试验样品最终记分不大于 1.0,则符合该试验要求。在任何观察期,如试验样品平均反应疑似大于空白对照反应,应另取 3 只家兔复试,如试验样品最终记分不大于 1.0,则符合试验要求。

注:空白对照样品为图 2 中提到的极性或非极性溶剂对照。

6.4.8 试验报告

试验报告应包括:

- 试验材料或器械的描述;
- 试验材料或器械的预期用途/应用;
- 制备试验样品所用方法的详细描述;
- 试验动物描述;
- 注射方法;
- 注射点记分;
- 观察记录;
- 结果评定。

6.5 人体皮肤刺激试验

6.5.1 简介

目前主要依赖用实验动物来推测人体皮肤刺激(见附录 F),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)进行风险评定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:

- 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;
- 为某些人体接触程度高的化学物提供风险评定;

c) 便于用先前已获取的实验动物研究数据推测人体应用。

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 的规定进行。附录 C 中给出了临床试验其他特殊要求。

注: F.1 给出了更多的刺激试验信息。

6.5.2 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任何明显健康风险。

在下列情况下不应将材料用于人体试验:

- a) 在体外或体内预测试验时,材料已显示出有刺激性;
注:在某些情况下,可能需要进行产品的刺激性样品/浸提液附加人体试验,以进一步表征人体潜在风险。
 - b) 在体外或体内预测试验时,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) 在试验条件下材料产生任何急性毒性危害;
 - f) 材料产生任何遗传毒性、生殖毒性或致癌性危害。
- 志愿者选择要求和指南见附录 C 和附录 F。

7 皮肤致敏试验

7.1 试验方法选择

目前有三种测定化学物潜在皮肤致敏性的动物试验,其中包括两个豚鼠试验和一个小鼠试验。迄今为止,用于检验皮肤致敏反应最常用的两个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,见参考文献[51]。封闭式贴敷试验适用于局部应用产品。

国际已接受小鼠局部淋巴结试验(LLNA)作为豚鼠试验的唯一替代试验用于检验单一化学物,并且目前为化学物的首选测定法,见参考文献[69]、[88]和[91]。在某些情况下,有些试验样品可能需要豚鼠试验来评价潜在的致敏性。对不能渗透皮肤的某些金属和高分子量物质出现假阴性、假阳性的情况,豚鼠试验评价可能是准确的。宜注意刺激活性也可以导致阳性淋巴结应答。

鉴于 ISO 10993-2 中动物福利要求的规定,应考虑 LLNA。除了动物福利的原因,LLNA 在提供客观定量数据方面具有优势。

注:全部三种方法被开发用于测定化学物的致敏潜能,即接触性皮炎、迟发型(Ⅳ型)超敏反应。

7.2 小鼠局部淋巴结试验(LLNA)

7.2.1 原则

某一试验样品处置小鼠耳背局部后,测定鼠耳应用部位引流淋巴结内淋巴细胞的增殖程度。确定某种试验材料为致敏物时,其临界值是是与对照活性比较细胞增殖应答为 3 倍或更多。

在用物质进行 LLNA 时,应采用剂量反应方法。对最终产品/医疗器械,只采用未稀释浸提液可以满足试验要求。

注：参考文献中包含有代表性的 LLNA 文献。鼓励实验室在进行 LLNA 时对这些文献和其他现有相关文献进行评审。此外，目前正在开发 LLNA 的体外替代方法，这方面的最新信息见参考文献中给出的 ECVAM、ICCVAM 和 JaCVAM 网站。见参考文献[114]、[115]、[116]。

7.2.2 试验样品制备

试验样品应为液体、悬浮液、凝胶或膏状物，此类样品可应用于小鼠的耳部。可能的情况下，应检验系列剂量（稀释液）。否则，宜采用所制备的最高浓度的化学溶液、悬浮液或浸提液。全身毒性和重度局部皮肤刺激会使试验结果无效，因此应避免这些反应。在某些情况下，可能需要进行预试验。

物质/化学物最常用的介质是丙酮橄榄油(AOO)4:1 混合物。亲水性和/或不能充分黏附于耳部皮肤的液体样品宜加以改良，以黏附于试验部位。可通过添加诸如羧甲基纤维素或羟乙基纤维素(0.5%)达到目的。对水溶性化学物，二甲基亚砜(DMSO)或二甲基甲酰胺(DMF)优于表面活性剂普朗尼克®L92^{1]}。见参考文献[89]。也可使用文献中提到的其他替代浸提介质，见参考文献[88]。添加物对浸提介质成分方面的作用和/或改变应进行确认并形成文件。可通过试验进行确认，采用通常用作阳性对照的微弱至中度致敏物。此外，为了证实所制备的浸提液仍能够检出潜在致敏物的存在，可采用阳性对照强化试验样品。ISO 10993-12 描述了浸提方法。

每次试验给予应分别制备浸提液。

注：附录 E 中给出了聚合物浸提液特定制备浸提方法信息。

7.2.3 动物与管理

应使用健康 CBA/Ca 或 CBA/J 品系雌性小鼠，除非确认了另外的品系。见参考文献[88]、[96]。已有报道几个小鼠品系是被认可的(DBA/2、B6C3F1、BALB/c)。见参考文献[90]。小鼠应未孕，并且 8 周~12 周龄。每一试验中所用小鼠的周龄应匹配(在一周范围内)。雄性小鼠如显示与雌性相等的敏感性水平，也可使用。

应按 ISO 10993-2 的规定管理并选择动物，使小鼠适应实验室环境，应单独识别。对某些试验样品，可能需要单独饲养。对此应说明理由并形成文件。

注：如采用群养，宜考虑交叉污染和不期望的经口摄入。

7.2.4 试验步骤

LLNA 检验化学物一般采用剂量反应方式。医疗器械供试样品可能为浸提液，这种情况下仅有单剂量用于试验，一般可检验未稀释的浸提液。不过，当浸提液含有高毒性成分时，毒性在 LLNA 中可导致阴性反应。因此在 LLNA 中检验高毒性浸提液(见 ISO 10993-5)时，推荐采用剂量反应方式和稀释浸提液。

为了确保试验步骤的再现性和敏感性，每一试验应包括已知微弱至中度接触致敏原，例如巯基苯并噻唑、己基肉桂醛和苯唑卡因。上述致敏原也许不适合于样品制备所用介质(如，水基质)，这种情况下可选择另外一种阳性对照。在经常进行 LLNA 时，不必每次试验都包括阳性对照，但至少每 6 个月应采用一次阳性对照。

在试验开始和结束时应记录每只动物体重。为了检验试验样品的潜在毒性，试验中应进行临床观察并记录观察结果。

注：当每 6 个月仅采用一次的阳性对照出现阴性结果时，可能会影响之前 6 个月期间获取的试验结果。参考文献[88]中指出，常规进行 LLNA(即每个月进行 LLNA 不少于一次)和进行过 LLNA 并有形成文件的获取阳性对照物试验一致性结果能力的实验室可考虑阳性对照物定期试验(即≤6 个月间隔)。重要的是要了解，在每次定

1] 给出的信息是为了便利本部分的使用者，不代表标准发布机构认可这些产品，相等的产品如能够产生相同的结果也可以使用。

期阳性对照试验之间的周期内,仅有定期阳性对照而非平行阳性对照的情况下,在判定无平行阳性对照得出的阴性结果的适当性和可接受性方面可能会有分歧。例如,如在定期阳性对照试验期间内获取到假阴性结果,则在最后一次可接受的与不可接受的阳性对照试验之间的周期内获取到的全部阴性试验物的结果可能会被质疑。为了证实之前的阴性试验物的结果是可接受的,实验室可能要重复进行全部阴性结果的试验,这样需要额外的费用并增加动物使用。

7.2.5 试验组

进行 LLNA 时,每组应至少采用 4 只小鼠的数据用于评价,可通过测定每只动物或汇集的淋巴结样品来确定淋巴结反应。对于统计学分析,优先采用动物个体测定方式。

当仅有单剂量用于评价时(如浸提液),每组至少采用 5 只小鼠,测定每只动物的反应。

试验组应设置为:

- 所用每种介质空白组(见附录 A);
- 所用每种介质阳性对照组,适宜时;
- 所用每种介质浸提液试验组。

在检验单一化学物或物质时,应采用剂量反应方式进行 LLNA。对其他试验类型和浸提液类的样品,剂量反应评价可能是不可行的。当仅有一个试验组时,应进行论证并形成文件。

注:在采集到充分的数据以证实阳性对照剂量反应的一致性时,可能包含有显示试验敏感性的单剂量。见参考文献[88]。

应将适宜的样品应用于指定小鼠双耳的背侧,剂量为 25 $\mu\text{L}/\text{d}$,连续 3 d。每天观察双耳可能会干扰结果解释的刺激迹象。见参考文献[73]、[82]和[84]。

7.2.6 细胞增殖测定和组织制备

引流淋巴结内的增殖细胞可通过放射性或荧光标记物进行标记。通常使用的放射性标记物是 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷和 ^{125}I -碘脱氧尿苷,有时也可使用荧光氟脱氧尿苷。

最后一次处置(72 ± 2)h后,记录每只小鼠体重并静脉注射标记物以测定细胞增殖。全部试验和对照小鼠经尾静脉注射 0.25 mL 含 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷 740 kBq(20 μCi)放射单位的磷酸盐缓冲液(PBS),对 ^{125}I -碘脱氧尿苷则注射 0.25 mL 含 74 kBq(2 μCi)放射单位的 PBS,或注射 0.25 mL 含 10^{-5} mol/L 荧光氟脱氧尿苷的 PBS。见参考文献[88]。

经论证也可使用其他不需要放射性标记的替代步骤[如 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、三磷酸腺苷(ATP)测定(DA 方法)]。

注:更多信息见参考文献[88]、[91]、[100]、[114]。

注射标记液(5 ± 0.75)h后无痛处死小鼠。移除小鼠耳引流淋巴结,应小心操作避免组织样品交叉污染。可以将每组动物的淋巴结合并,也可以将每只小鼠的两只淋巴结并到一起。轻柔按压淋巴结通过一个 200 μm 不锈钢丝网或尼龙网制备单细胞制备物。首选从每只动物个体采集的数据,因为这种数据可提供一组中每只动物之间的变异性。细胞制备物在 PBS 中经离心和重悬洗涤两次,用 5% 三氯乙酸(TCA)在(4 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 沉淀(18 ± 1)h。最终离心后,将沉淀细胞重悬于 1 mL TCA 中并移至含有 10 mL 闪烁液的闪烁管中进行 ^3H 计数,或直接移至伽马计数器进行 ^{125}I 计数。见参考文献[70]、[90]、[91]。

注 2:也可采用半体内方法标记并测定细胞增殖。见参考文献[92]、[93]。

7.2.7 结果与解释

测定每只小鼠每分钟淋巴结细胞计数(cpm)的放射活性水平。转换每分钟计数(cpm)为每分钟分解数(dpm),计算每组小鼠的 cpm 或 dpm 平均值和标准差(仅用于个体样品方法)。见参考文献[88]。每一结果减去本底值。

试验 cpm 或 dpm 除以空白 cpm 或 dpm 得出刺激指数(SI)。供试试验样品 SI 为 3 或大于 3(≥ 3.0)应考虑阳性,为致敏物。见参考文献[64]。

阳性对照样品 SI 应 ≥ 3.0 。

对于验证试验,应同时或试验前 6 个月内采用阳性对照。见参考文献[88]。

7.2.8 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) 试验动物的描述;
- e) 耳部应用方法;
- f) 细胞增殖测定方法的描述;
- g) 观察记录,包括临床观察和体重测量;
- h) 结果评定,包括阳性对照。

7.3 豚鼠皮肤致敏检验法

7.3.1 原则

目前有两种豚鼠检验法用于测定化学物和医疗器械的皮肤致敏活性,为 Buehler 试验和 GPMT。两种方法由诱导和激发两个阶段组成,涉及超敏反应的全过程。

7.3.2 试验样品浓度选择

目前检验单一化学物潜在致敏性的导则推荐试验中仅采用一种浓度。

注:附录 E 中给出了聚合物浸提液特殊制备浸提方法。

7.3.3 诱导

致敏率很大程度上取决于诱导剂量,可能的情况下豚鼠试验应采用轻度到中度刺激的诱导剂量。如达不到刺激限值,则应采用最高可能浓度,但不应影响动物的健康。豚鼠试验的诱导剂量一般依据具体豚鼠试验中描述的预试验进行选择。用常用溶剂制备的未稀释浸提液的胃肠外剂量不必进行预试验。

7.3.4 激发

豚鼠试验的激发剂量也基于在之前未接触试验材料的动物体上进行的预试验。应采用预试验评价中确定的最高无刺激剂量。为了有助于结果评价,建议激发阶段采用一种以上浓度(见 F.2)。

7.4 影响试验结果的其他重要因素

最大剂量试验需要皮内注射,因此试验样品的生物化学和物理性能可能影响试验的选择。试验样品如不能皮内注射,应采用替代方法。应在无菌条件下制备浸提溶液,非无菌溶液不宜用于皮内应用。

介质的选择会影响试验材料的生物利用度。虽然没有一种介质是对所有的材料都是最理想的,但宜选择通过溶解和渗透达到最佳接触的介质。在不影响结果解释的前提下,试验材料的浓度宜采用尽可能高的浓度。大部分研究者更愿意试验样品为一种溶液,因为分散剂易于形成沉淀,使浸提液给药困难。用于皮内注射的介质包括盐溶剂、丙二醇和植物油。

不同实验室结果之间的变异性可有几种来源,下列因素在试验步骤中是很重要的:

- 环境试验条件;
- 动物试验部位;
- 毛发去除方法(剪/剃或化学脱毛法);
- 敷贴设计类型;
- 试验材料数量;
- 封闭程度;
- 接触时间和动物读数。

动物应答性也取决于遗传因素和饲养条件。

虽然反应的严重程度有助于结果解释,但是与适宜对照比较在激发阶段具有阳性反应的试验动物的数量对预示某一阳性试验结果是必要的。激发阶段的临界反应最好通过再激发来证实。尚未发现组织病理学有助于试验结果的评价。

为确保试验的再现性和敏感性,应定期进行阳性对照试验。宜选用弱到中度的接触变应原,如巯基苯并噻唑、己基肉桂醛和苯佐卡因。阳性对照应至少每隔 6 个月进行一次。见参考文献[6]。

注:为得到阳性反应,可对中度和强致敏剂(如甲醛和 DNCB)进行稀释。但这不能保证同时能识别出医疗器械浸提液中的弱致敏剂。

7.5 豚鼠最大剂量试验(GPMT)

7.5.1 原理

单一化学物采用豚鼠最大剂量试验,对材料在试验条件下使豚鼠产生皮肤致敏反应的潜能做出评定。

7.5.2 试验样品制备

试验样品应按附录 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 7.5.4.2)。

注:附录 E 中给出了聚合物浸提液特定制备浸提方法。

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,试验开始时体重应为 300 g~500 g。雌鼠应未产并无孕。

应使动物适应环境,并按 ISO 10993-2 的规定饲养。为了确定最佳的试验浓度(见 7.5.4.2),必要时宜用一组动物进行预试验。

试验材料如为粉剂或液体,应至少使用 10 只动物接触试验样品,至少使用 5 只动物作为对照组。如需要进行预试验应另取动物。

对于浸提液试验,应至少使用 10 只动物接触试验样品,至少使用 5 只动物作为溶剂对照组。如需要进行预试验应另取动物。

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 10 只试验动物加 5 只对照动物试验也未必会出现阳性结果。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

在试验开始之前除去动物全部试验部位的被毛。

每一注射点皮内注射 0.1 mL。

对于局部应用,将适宜的滤纸或吸水性纱布块(4 cm²~8 cm²)浸透试验样品,贴敷于除毛皮肤上,再用封闭式包扎带缠绕动物躯干固定。

注:用封闭式包扎带固定动物时,宜注意使动物能正常呼吸。首选采用弹性包扎带,宜由经过培训的专业人员进行操作。

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。

用通用溶剂制备的未稀释的浸提液不需要进行预试验。

将试验样品的系列稀释物局部应用于动物腹侧部位,至少采用 3 只动物。24 h 后除去封闭性包扎带和敷贴片,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至中度红斑,但不应对动物产生其他不良作用。医疗器械浸提液有可能达不到刺激限值,这种情况应采用尽可能高的浓度,例如未稀释浸提液。对于最终产品/医疗器械来说,只用未稀释浸提液可能足以满足试验。

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
散发性或斑点状红斑	1
中度融合性红斑	2
重度红斑和/或水肿	3

为了对主试验期间可能发生的干扰读数的皮肤过度反应状况进行评价,应考虑对全部动物进行弗氏完全佐剂(FCA)注射的预处置。

7.5.4.3 主试验

7.5.4.3.1 皮内诱导阶段

按图 3 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(符合中国药典或英国药典或美国药典要求)。

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。

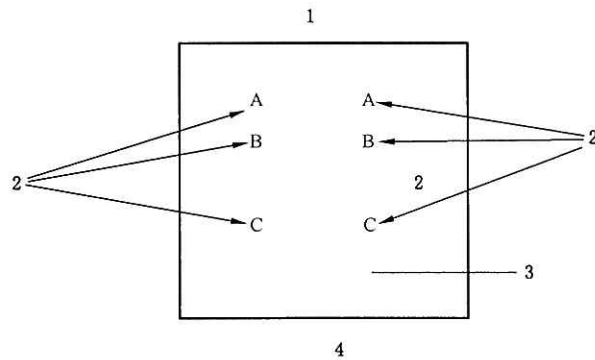
部位 C:试验样品(部位 B 中采用的浓度)以 50 : 50 的体积比例与弗氏完全佐剂和溶剂(50%)配制成的乳化剂混合后进行皮内注射;对照组注射空白液与佐剂配制成的乳化剂。

7.5.4.3.2 局部诱导阶段

皮内诱导阶段后(7±1)d,按 7.5.4.3.1 部位 B 中选定的浓度,采用面积约 8 cm² 的敷贴片(滤纸或吸水性纱布块)局部贴敷于每只动物的肩胛骨内侧部位,覆盖诱导注射点(见图 3)。如按 7.5.4.3.1 的最大浓度未产生刺激反应,应在局部敷贴应用前(24±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±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±2)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。



说明:

- 1——头端;
- 2——0.1 mL 皮内注射点(见 7.5.4.3.1);
- 3——去毛的肩胛骨内侧部位;
- 4——尾端。

图 3 皮内注射点部位

7.5.4.3.3 激发阶段

局部诱导阶段后(14 ± 1)d,用试验样品激发全部试验动物和对照动物。按 7.5.4.3.1 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对照中浸透,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 ± 2)h 后除去包扎带和敷贴片。

7.5.5 动物观察

除去敷贴片后(24 ± 2)h 和(48 ± 2)h 观察试验组和对照组动物激发部位皮肤情况,特别推荐在自然光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。

7.5.6 结果评价

按 Magnusson 和 Kligman 分级标准,对照组动物分级小于 1,而试验组中分级大于或等于 1 时一般提示致敏。如对照组动物分级大于或等于 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,可能需要在首次激发后 1 周~2 周进行再次激发,以明确反应。所用方法与首次激发相同,采用动物未试验的一侧部位。

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) 试验动物的描述;
- e) 试验部位的接触方法;
- f) 试验部位标记和读数;
- g) 观察记录;
- h) 结果评定。

7.6 封闭贴敷试验(Buehler 试验)

7.6.1 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定。

7.6.2 试验样品制备

试验样品应按附录 A 的规定进行制备。在不影响结果解释的情况下试验样品浓度应尽可能的高(见 7.6.4.2)。如试验样品的形状和尺寸适宜,局部应用器械(如电极)可原样贴敷。

7.6.3 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。如使用雌鼠,应未产并无孕。

应使动物适应环境,并按 ISO 10993-2 的规定饲养。为了确定试验样品的浓度(见 7.5.4.2),宜用一组动物进行预试验。

粉剂或液体试验时,应至少使用 10 只动物接触试验样品,至少使用 5 只动物作为对照组。如需要进行预试验应另取动物。

浸提液试验时,应至少使用 10 只动物接触每一浸提液,至少使用 5 只动物作为每一溶剂对照组。如需要进行预试验应另取动物。

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 10 只试验动物加 5 只对照动物试验也未必会出现阳性结果。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。

7.6.4 试验步骤

7.6.4.1 准备

在试验开始之前彻底剪除或剃除动物全部试验部位被毛。

对于局部应用,将适当尺寸的敷贴片(滤纸或吸水性纱布)浸透试验材料或浸提液,贴敷于动物的除毛部位,再用封闭式包扎带固定(6 ± 0.5)h。可能要对每只动物采用固定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。

注:用封闭式包扎带固定动物时,宜注意使动物能正常呼吸。首选采用弹性包扎带,宜由经过培训的专业人员进行操作。

7.6.4.2 预试验

预试验是为了确定 7.6.4.3 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 ± 0.5)h 后除去包扎带和敷贴片。除去敷贴片后(24 ± 2)h 和(48 ± 2)h,按表 4 给出的 Magnusson 和 Kligman 分级标准评定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,但不动物产生其他不良作用;
- b) 最高浓度在主试验的激发阶段不出现红斑。

7.6.4.3 主试验

7.6.4.3.1 诱导阶段

按 7.6.4.2a)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 ± 0.5)h 后除去任何封闭式包扎带类的固定物和敷贴片。1 周中连续 3 d 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。

7.6.4.3.2 激发阶段

最后一次诱导贴敷后(14 ± 1)d,用试验样品对全部试验动物和对照动物进行激发。按 7.6.4.2b)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 ± 0.5)h 后除去固定物、封闭包扎带和敷贴片。

7.6.5 动物观察

首次激发后或再次激发接触后(24 ± 2)h,

- a) 用市售脱毛剂给动物脱毛,按制造商的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 ± 2)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。

7.6.6 结果评价

表 4 给出的 Magnusson 和 Kligman 分级标准适用。

对照组动物分级小于 1,而试验组中分级大于或等于 1 时一般提示致敏。如对照组动物分级大于或等于 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。

这种情况下推荐采用新的阴性对照组。

7.6.7 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) 试验动物的描述;
- 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) 结果评定,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专业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的刺激和皮肤致敏迹象时不一定表明试验材料或器械不能使用。用任何描述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评定。

按本部分描述的试验步骤得出的预测性试验结果不能单独成立,阴性试验结果不一定能排除产品可能导致皮肤过敏反应的可能性。为了将假阳性或假阴性结果出现的可能性降至最低,对任何检验法的阳性和阴性试验结果均宜进行严谨的持续性核查。宜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:

- 行业和消费者抱怨数据;
- 包含相似组件器械方面的经验;
- 皮肤病诊所的诊断试验结果;
- 回顾性流行病学数据。

附 录 A
(规范性附录)
刺激/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/致敏试验数据时,应考虑医疗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

有一定适宜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 cm×2.5 cm 的样品,厚度近似实际使用要求但不超过 0.5 cm。同法制备适用的阴性对照样品。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,吸水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化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,对其生物学活性方面具有潜在的显著影响。

粉剂(如高吸水剂)应采用直接附着或用适当的溶剂调成糊状物后进行试验。对照应采用相同的溶剂与经湿化、稀释或悬浮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,如吞噬作用,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进行试验,如不可行采用适当溶剂稀释后试验。对照应采用相同的溶剂与稀释的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进行试验。如用浸提液进行试验,应按 ISO 10993-12 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

试验材料如要进行浸提、稀释、悬浮或湿化处置,应使用适当的无刺激性溶剂。ISO 10993-12 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
(规范性附录)
特殊的刺激试验

B.1 总则

下列特异性刺激试验与预期应用于特定部位的医疗器械具有相关性。如进行这类试验,应给出试验方法的选择说明。

B.2 眼刺激试验**B.2.1 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,并且仅用于预期与眼或眼睑接触的材料。

最近,机构间替代方法评价协调委员会(ICCVAM)评价了四个体外替代试验系统,其中的两个试验十分成熟,可替代体内动物试验用于鉴别重度刺激物和腐蚀物。这些方法是牛眼角膜混浊度与渗透度(BCOP)试验法和离体鸡眼(ICE)试验法。见参考文献[107]。对于弱刺激物,可能仍需要体内试验。

B.2.2 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定。

B.2.3 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 $\text{pH} \leq 2.0$ 或 ≥ 11.5 的材料也不宜再进行试验,宜标示为潜在的眼刺激物。

特殊情况下需要进一步的风险表征/评定,可能需要检验材料的最低刺激性,这种情况应论证并形成文件。

B.2.4 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:有的产品可能不宜直接在眼中试验,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。

如试验材料只能用其浸提液进行试验,应按附录 A 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.2.5 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 ISO 10993-2 的规定饲养。

初试应使用 1 只动物评价试验材料。如 1 只动物出现清晰的阳性反应(见表 B.1)时,则不必再进行试验。

固体或液体材料如没有出现反应时,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。

如试验使用了至少 3 只动物后反应仍然疑似或不明确,应考虑进行复试。

B.2.6 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。

检查眼时可使用 2% 荧光素钠(符合英国药典或中国药典)检查角膜损伤,也推荐使用检眼镜、手持式裂隙灯或其他适宜的器械。

按 B.2.4 的规定将试验样品滴入动物的 1 只眼内。

滴注后闭眼约 1 s。

浸提液试验时,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,可进行重复接触试验。重复接触试验只能在急性接触试验完成后进行[至少在 (72 ± 2) h 后],接触期宜与试验材料/器械临床使用期相似。

B.2.7 动物观察

对一次性滴入试验材料的动物,在滴注后约 (1 ± 0.1) h、 (24 ± 2) h、 (48 ± 2) h 和 (72 ± 2) 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: ISO 9394^[25] 给出了接触镜试验指南,要求 21 d 接触期,每天接触 8 h。这在该指南中是一个例外情况。

按表 B.1 规定的眼损伤记分系统,对观察到的反应记分并记录。

表 B.1 眼损伤记分系统

反 应	记分
1. 角膜	
浑浊程度(最致密区域):	
透明	0
云翳或弥散混浊区,虹膜清晰可见	1 ^a
易识别的半透明区,虹膜清晰可见	2 ^a
乳白色区,看不见虹膜,勉强可见瞳孔	3 ^a
浑浊,看不见虹膜	4 ^a
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 ^a
无对光反射,出血性严重结构破坏(其中一种或全部)	2 ^a
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 ^a
弥散性充血,呈紫红色	3 ^a
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 ^a
眼睑水肿使眼呈半闭合状	3 ^a
眼睑水肿使眼呈半闭合乃至全闭合状	4 ^a
分泌物	
无分泌物	0
超过正常分泌量(不包括正常动物眼内眦少量分泌物)	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
^a 阳性结果。	

对多次滴入试验材料的动物在每次滴注前和滴注后约(1±0.1)h 检查每只动物的双眼。

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

按表 B.1 规定的眼损伤记分系统,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:

——极重度眼损伤(如结膜腐痂和溃疡、角膜穿孔、前房内有血或脓液等);

——有血污或脓液排出；

——明显的角膜溃疡。

动物如显示表 B.1 记分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 ± 2) h 内无可逆迹象;或

——重度结膜炎(结膜水肿记分 4,并伴发充血记分 3),并在 (48 ± 2) h 内无可逆迹象。

无痛处死动物。

B.2.8 结果评价

试验眼与对照眼之间的差异性应按表 B.1 给出的记分系统进行判定并解释。

急性接触

如果有 1 只以上动物试验眼在任何观察阶段呈现阳性结果(表 B.1 中有脚注的记分),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 只呈轻度或中度反应或是疑似反应,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现阳性结果(表 B.1 中有脚注的记分),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标示该材料为眼刺激物。

重复接触

如试验组中半数以上动物在任何观察阶段呈现阳性结果(表 B.1 中有脚注的记分),即认为该试验材料为眼刺激物。

B.2.9 试验报告

试验报告应包括:

- 试验样品的描述;
- 试验样品的预期用途/应用;
- 制备试验样品所用方法的详细描述;
- 试验动物的描述;
- 滴入的方法;
- 眼记分;
- 观察记录;
- 结果评定。

B.3 口腔黏膜刺激试验

B.3.1 总则

口腔刺激试验应仅考虑用于预期与口腔组织接触的材料,并且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。

B.3.2 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定。

B.3.3 应排除的试验材料

任何已显示为皮肤或眼的刺激物,或 $\text{pH} \leq 2.0$ 或 ≥ 11.5 的材料不应再进行试验,可标示为潜在的口腔组织刺激物。

需要进一步的风险表征/评定的例外情况下,即使已知被试材料是刺激物或材料的 pH 在上述范围

之外可能还是需要进行测试,这种情况应论证并形成文件。

B.3.4 试验材料

按附录 A 规定制备试验材料。

B.3.5 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 ISO 10993-2 的规定饲养。

除此以外,适当时给动物套上 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,必要时调整项圈。如动物体重持续下降,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.3.6 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,可直接将样品(直径不大于 5 mm)放入颊囊内。

对液体试验材料或浸提液样品,则可用棉球浸透样品,记录吸收的体积,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。应使用适宜的对照动物进行平行试验。

必要时重新给动物带上项圈放回笼中。

接触时间应与材料预期实际使用时间一致,但不能少于 5 min。

接触后除去项圈和棉球,用生理盐水冲洗颊囊,注意不要污染另一侧颊囊。

对于急性接触,每小时(± 0.1 h)重复上述步骤,共 4 h。

重复接触试验时,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.3.7 动物观察

取出棉球后肉眼观察颊囊,并且在每次接触前(如需重复接触时)检查颊囊。

描述动物颊囊的一般状况,并按表 B.2 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 ± 2)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检查。

表 B.2 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
清晰红斑	2
中度红斑	3
重度红斑(紫红色)至干扰红斑分级的焦痂形成	4
宜记录并报告组织的其他不良改变。	

B.3.8 结果评定

B.3.8.1 肉眼观察评价

比较试验侧颊囊与对侧颊囊,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.2)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.3.8.2 组织学评价

应由病理学家对口腔组织显微镜下的刺激作用进行评价,可按表 B.3 给出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。

对照颊囊或对照动物的显微镜评价总分大于 9 时可能表明有病理改变,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.4)。

对于重复接触试验,可将表 B.3 修改为适合于对有关慢性刺激组织反应的评价。

B.3.9 试验报告

试验报告应包括:

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

表 B.3 口腔、阴茎、直肠和阴道组织反应显微镜检查记分系统

反 应	记 分
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
白细胞浸润(每个高倍视野)	
无	0

表 B.3 (续)

反 应	记分
极少 (少于 25)	1
轻度 (26~50)	2
中度 (51~100)	3
重度 (大于 100)	4
血管充血	
无	0
极轻	1
轻度	2
中度	3
重度伴血管破裂	4
水肿	
无	0
极轻	1
轻度	2
中度	3
重度	4

表 B.4 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
宜记录组织的其他不良改变,并包括在反应的评定中。 表 B.3 给出的显微镜检查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.4 阴茎刺激试验

B.4.1 总则

阴茎刺激试验应仅考虑用于预期与阴茎组织接触的材料,并且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。

B.4.2 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定。

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 $\text{pH} \leq 2.0$ 或 ≥ 11.5 的材料不应再进行试验,应标示为潜在的阴茎刺激物。

B.4.4 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.4.5 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 ISO 10993-2 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.2 给出的记分系统对红斑进行评分,不应使用出现严重变色或红斑记分大于等于 2 的动物。

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.4.6 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,并应采取措施(如 Elizabethan 颈圈)防止动物舔试验部位,以避免继发性因素干扰原发性刺激反应。

或者,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 ± 0.1)h。

对于急性接触,每小时(± 0.1 h)重复上述步骤,共 4 h。

长期重复接触试验时,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

急性接触时,每次接触后(1 ± 0.1)h(即下次接触前)注意观察阴茎一般状况。末次接触后(1 ± 0.1)h、(24 ± 2)h 和 (48 ± 2)h 观察并记录动物状况。

长期重复接触时,在首次接触后(1 ± 0.1)h 和下次接触之前观察记录阴茎一般状况。

按表 B.2 给出的记分系统对动物每一间隔期皮肤表面红斑反应记分,并记录结果以出具试验报告。

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记分。每一观察记分最高为 4 分。

B.4.8 结果评定

B.4.8.1 肉眼观察评价

将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(见表 B.2)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检查。

B.4.8.2 组织学评价

应由病理学家对阴茎皮肤的刺激作用进行评价,可按表 B.3 给出实验组平均记分。

对所有试验组动物显微检查结果进行分级评价,总数除以观察动物数得到一个组平均值。最大记分为 16。

对照组同法计算。

对照动物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.4)。

对于长期重复接触试验,可将表 B.3 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) 试验样品的描述;
- 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) 试验动物的描述;
- e) 接触方法;
- f) 试验部位记分;
- g) 观察记录;
- h) 组织学评价;
- i) 结果评定。

B.5 直肠刺激试验

B.5.1 总则

直肠刺激试验应仅考虑用于预期与直肠组织接触的材料,并且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。

B.5.2 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定。

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 $\text{pH} \leq 2.0$ 或 ≥ 11.5 的材料不应再进行试验,可标示为潜在的直肠刺激物。

B.5.4 试验材料

固体或液体试验材料应按附录 A 的规定进行制备。

B.5.5 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论证。

应使动物适应环境,并按 ISO 10993-2 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液、水肿和/或其他感染、刺激和/或损伤迹象。

B.5.6 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,然后将湿润处理过的导管轻柔地插入直肠,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,试验样品注入时或注入后可能会有溢出,可用软纸巾轻柔拭去溢出的液体。

每次间隔 (24 ± 2) h 重复上述步骤,连续 5 d。

对于长期重复接触试验,应根据预期临床接触时间确定接触次数、时间和间隔期。

B.5.7 动物观察

初次接触后 (24 ± 2) h 和每次试验操作前注意并记录会阴部位溢液、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.5.8.1 和 B.5.8.2)。

B.5.8 结果评价

B.5.8.1 肉眼观察评价

末次接触后 (24 ± 2) h 无痛处死动物,完整切下直肠后纵向剖开,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检查。

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.5.8.2 组织学评价

应由病理学家对直肠组织的刺激作用进行评价,可按表 B.3 给出的记分系统对每块组织进行评分。

试验组全部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.4)。

对于长期重复接触试验,可将表 B.3 修改为适合于对有关慢性刺激组织反应的评价。

B.5.9 试验报告

试验报告应包括:

- a) 试验样品的描述;
- 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) 试验动物的描述;
- e) 接触方法;
- f) 试验部位记分;
- g) 观察记录;
- h) 组织学评价;
- i) 结果评定。

B.6 阴道刺激试验

B.6.1 总则

阴道刺激试验应仅考虑用于预期与阴道组织接触的材料,并且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。

B.6.2 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定。

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 $\text{pH} \leq 2.0$ 或 ≥ 11.5 的材料不应再进行试验,可标示为潜在的阴道组织刺激物。

B.6.4 试验材料

固体或液体试验材料应按附录 A 的规定进行制备。

B.6.5 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论证。

应使动物适应环境,并按 ISO 10993-2 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溢液、水肿和/或其他感染、刺激和/或损伤迹象。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作出假阳性反应判定。

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,然后将湿润处理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,试验样品注入时或注入后可能会有溢出,可用软纸巾轻轻拭去溢出的液体。

每次间隔 (24 ± 2) h 重复上述步骤,至少连续 5 d。

对于长期重复接触试验,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.6.7 动物观察

初次接触后 (24 ± 2) h 和每次试验操作前注意并记录阴道口和会阴部位溢液、红斑和水肿迹象。

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 和 B.6.8.2)。

B.6.8 结果评价

B.6.8.1 肉眼观察评价

末次接触后 (24 ± 2) h 无痛处死动物,完整切下阴道后纵向剖开,检查上皮组织层的刺激、损伤以及坏死迹象。

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检查。每块阴道组织应取其两端和中央三部分。

将接触过试验材料的动物阴道与对照动物的阴道进行比较。

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.6.8.2 组织学评价

应由病理学家对阴道组织的刺激作用进行评价,可按表 B.3 给出的记分系统对每一组织进行评分。试验组全部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.4)。

对于长期重复接触试验,可将表 B.3 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:

- 试验样品的描述;
- 试验样品预期用途/应用;
- 制备样品所用方法的详细描述;
- 试验动物的描述;
- 接触方法;
- 试验部位记分;
- 观察记录;
- 组织学评价;
- 结果评定。

附 录 C
(规范性附录)
人体皮肤刺激试验

C.1 总则

下列要求适用于除 ISO 14155-1 和 ISO 14155-2 之外的范围,这些要求更具有特异性。

C.2 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。

C.3 方法描述

C.3.1 志愿者选择

GB/T 16886 的本部分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。此外已知对试验材料过敏或显示任何皮炎症状的人员应排除于试验之外。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。

C.3.2 剂量制备

液体试验材料一般使用时不稀释。固体材料试验时,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(空白)贴敷。

C.3.3 步骤

C.3.3.1 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。

C.3.3.2 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。

敷贴片应能向皮肤单位面积内释放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,也可将纱布块湿润并使试验材料覆盖整个试验部位。

C.3.3.3 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,以保证能充分评定迟发型刺激反应。

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。

C.3.3.4 短期接触

除了按 C.3.3.3 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,可在志愿者试点组进行试验。根据得出的数据确定试验进程,随后再敷贴时应在 (48 ± 2) h、 (72 ± 2) h 读数后进行。

C.3.3.5 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,在除去敷贴片后立即对反应分级,并分别在 (1 ± 0.1) h~ (2 ± 1) h、 (24 ± 2) h、 (48 ± 2) h 和 (72 ± 2) h 时进行分级。必要时测定反应的可逆性,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 C.1 对皮肤刺激反应分级并记录。

可使用无创性生物工程方法(参见附录 E)。

表 C.1 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 4 h 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 4 h 时将会出现更强烈的反应。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),并还应培训评定人员注意即时反应(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 4 h 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。

C.3.3.6 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,以确定试验组检测试验混合物刺激反应

的适用性。最好使用 20% 的十二烷基硫酸钠(SDS)作为阳性对照,因其刺激作用已经过充分表征(见 F.1)。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。

C.4 数据和报告

C.4.1 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(24 ± 2)h、(48 ± 2)h 和 (72 ± 2)h 时每个志愿者的刺激反应得分和观察到的任何其他反应。

C.4.2 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,则不应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皮肤刺激潜力,注意不要混淆个别志愿者在皮肤刺激敏感性方面的差异。

C.4.3 试验报告

试验报告应按照 ISO 14155-1 和 ISO 14155-2 的要求,人体皮肤刺激试验特殊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:
 - 1) 物理性质和相关的理化特性;
 - 2) 识别数据;
- c) 介质:
 - 1) 选择用于湿化某一固体试验材料的介质的识别和论证;
- d) 志愿者:
 - 1) 应用试验材料的志愿者的人数;
 - 2) 志愿者的年龄、性别分布情况;
- e) 结果:
 - 1) 在 0 h、(1 ± 0.1)h~(2 ± 0.2)h、(24 ± 2)h、(48 ± 2)h 和 (72 ± 2)h 时的反应率和在其他时间的反应得分;
 - 2) 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 ± 2)h、(48 ± 2)h 和 (72 ± 2)h 时刺激反应率的总结];
 - 3) 对观察到的所有刺激反应的描述;
 - 4) 对观察到的其他非刺激反应的描述;
 - 5) 结果的统计学处理(与阳性对照的对比,如用 Fisher's 试验);
 - 6) 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、试验和对照材料试验结果;
- f) 结果讨论。

附 录 D
(资料性附录)
体外皮肤刺激试验

D.1 背景信息

近来发表了几项研究,涉及测定化学物刺激活性的体外试验方法的评价与确认,这种方法作为兔皮肤刺激试验的替代方法。见参考文献[101]、[102]、[103]、[104]。2007年,ECVAM科学咨询委员会(ESAC)对测定化学物皮肤刺激性的体外人体皮肤模型的确认过程进行了评价。见参考文献[101]。评价之后,ESAC给出下列共识:

“对下列体外试验范围的科学文献和同行评审论文进行审核后,已经过充分的确认研究:

1. EpiDerm^{TM21} (包括 MTT 还原和 IL-1 α 释放)
2. EPISKIN^{TM22} (包括 MTT 还原和 IL-1 α 释放)

EPISKIN^{TM22}方法表明,当试验终点采用 MTT 还原进行评价时,为了辨别 R38 皮肤刺激性和无标记(无皮肤刺激性)试验物质,EPISKIN^{TM22}方法用作 Draize 皮肤刺激试验(OECD TG 404 & 指令 67/548/EEC 附录 V B.4 方法)的替代方法(依据本附录规定方法的性能),对于预测兔皮肤刺激性来说,是一个可靠并相关独立的试验。目前,IL-1 α 终点宜视为 MTT 试验法的一种有效的辅助方法,该法可能会提高试验的敏感性,而不会降低试验的特异性。该终点可用于确认 MTT 终点获得的阴性结果。

当前由于 EpiDerm^{TM21}法的高特异性,可有效鉴别皮肤刺激物,但阴性结果可能需要进一步试验(如按照参考文献[7]所述的等级策略)。宜对 EpiDerm^{TM21}方案进行改进来提高敏感性水平。”

EPISKIN^{TM22}和 EpiDerm^{TM21}两种模型都可以有效识别皮肤刺激化学物,仅有 EPISKIN^{TM22}模型可用于显示化学物的无刺激(无标记)特性。在 EPISKIN^{TM22}模型中,IL-1 α 产生的测定可用于进一步确定阴性反应。EpiDerm^{TM21}模型中出现的阴性反应则需要采用兔皮肤刺激试验来加以证实。

除了市售皮肤模型(见 D.2.2),还有“开放源”模型,这些模型都是基于相同的原理,采用与皮肤相同基质的人体细胞。见参考文献[109]。

应该注意到迄今为止皮肤刺激体外试验仅验证过纯化学物,而未验证过医疗器械浸提液。为了将这些方法用于检验医疗器械的潜在刺激性,对这一特定领域的进一步确认是十分必要的。医疗器械试验的某些方面,如浸提技术和浸提液中化学物可能的低浓度,这样可能需要调整试验方案,例如改变浸提技术或孵育时间。

D.2 体外皮肤刺激试验原理

D.2.1 总则

体外皮肤模型刺激检验法的原理是基于刺激性化学物能通过扩散方式穿透角质层,对角质层下的细胞具有细胞毒性。此外,如果没有细胞毒性作用或毒性作用微弱,可测定上皮释放的炎症介质数量,并且可采用递进方式增强该试验的敏感性。

试验材料局部应用于三维人体上皮模型,为至少由数层上皮细胞层和功能性角质构成的重建上皮。通过测定材料降低细胞活性至低于规定限值水平(如 50%)的能力来鉴别刺激性材料。作为皮肤

2] ISO 10993-10:2010 的附录 D 给出了模型示例为 EpiDermTM、EPISKINTM、Vitrolife-Skin、TESTSKIN、Labcyte EPI-MODEL,给出的信息是为了便利本部分的使用者。

刺激性的其他测定方法,可以测定炎症介质(如白介素 1α)。

对于体外人体皮肤模型试验系统皮肤刺激的确认,在确认研究中要包含审慎选择的代表宽范围等级的化学物。见参考文献[102]、[103]、[104]。试验方法通常用于各类化学物,除了气体和气溶胶。

D.2.2 基本模型特性

人体皮肤模型可从市场购买(如 EpiDermTM^{3]}、EPISKINTM^{3]}、Vitrolife-Skin^{3]}、TESTSKIN^{3]}、Labcyte EPI-MODEL^{3]}),或由测试实验室开发或构建。宜对任何新模型进行验证并与现有模型比较。宜采用人体角质细胞构建上皮,功能性角质层下宜有多层生发上皮细胞层(基底层、棘层、颗粒层)。角质层宜为多层,包含必要的脂质层,产生功能性稳健屏障,以抵抗细胞毒化学标志物[如十二烷基磺酸钠(SDS)或 Triton X-100]的快速穿透。可在应用已建立的细胞毒化学标志物后,通过 IC_{50} 或 ET_{50} 的测定估计这一特性。模型的封闭性能宜防止角质层至活组织周围的材料通路,否则会导致不理想的皮肤接触建模。

对某一新皮肤或表皮模型的一般特性表征,宜进行组织学评价(H&E染色)、角蛋白测定(免疫组织化学)和脂质分析(高性能薄层色谱分析)。见参考文献[110]。

皮肤模型宜无细菌、支原体和真菌污染。

D.2.3 功能性模型要求

D.2.3.1 总则

参考文献[105]描述了功能性模型条件。下列指标适用于体外皮肤刺激试验。

D.2.3.2 活性

细胞活性的高低通常采用 MTT 或其他代谢转化活体染色剂进行定量测定。在这些情况下,阴性对照组织的浸提(溶解)染色剂的光密度(OD)宜至少比浸提溶剂的 OD 高 20 倍,阴性对照组织的 OD 最好超过 0.8。宜证实阴性对照组织在试验期间的培养中是稳定的,在试验期间各时间点可进行细胞活性检验,测定宜给出每一时间点相同的活性。

D.2.3.3 屏障功能

角质层及其脂质构造宜足以抵抗细胞毒化学标志物(如 SDS 或 Triton X-100)的快速穿透,该性能的评估可通过测定化学标志物在固定接触时间后降低组织活性 50%时的浓度(IC_{50}),或测定应用规定的、固定浓度化学标志物后降低细胞活性 50%时需要的接触时间(ET_{50})。充分功能性角质层的 ET_{50} 宜在 2 h 以上。

D.2.3.4 形态学

接下来宜对重建皮肤/上皮进行组织学检查,显示人体皮肤/上皮类似结构(包括功能性角质层)。这种信息可由皮肤构造的制造商提供。

D.2.3.5 再现性

使用特定模型试验方法的结果宜证实随时间的推移具有可重现性,该模型应能够证实延时阶段参照化学物的预测值的正确性(见表 D.1)。

3] ISO 10993-10:2010 的附录 D 给出了模型示例为 EpiDermTM、EPISKINTM,给出的信息是为了便利本部分的使用者。

表 D.1 质量控制(QC)批次放行指标示例

	低允许限量	允许范围均值	高允许限量
EPISKIN ^{TM4]} (18 h SLS)	IC ₅₀ = 1.0 mg/mL	IC ₅₀ = 2.32 mg/mL	IC ₅₀ = 3.0 mg/mL
EpiDerm ^{TM4]} (1% Triton X-100)	ET ₅₀ = 4.8 h	ET ₅₀ = 6.7 h	ET ₅₀ = 8.7 h

D.2.3.6 模型质量控制(QC)

所用每批表皮模型应符合规定的生产放行指标,其中存活性与屏障功能是最重要的,IC₅₀或ET₅₀的允许范围(高和低限值)应由皮肤模型供应商确立(当采用自制模型时由研究者确立)。仅有合格组织测定的结果对可靠预测刺激作用是可接受的,D.3 作为示例,给出了 EPISKIN^{TM4]}、EpiDerm^{TM4]} 的允许范围。

D.3 试验材料

试验材料可由固体、液体、半固体和蜡状物组成。液体可以是水性的或非水性的,固体材料可溶于水或不溶于水。固体在应用前宜研磨成粉剂,其他样品试验前的处理不是必需的。对医疗器械或生物材料浸提液,可采用极性和非极性两种溶剂。

阴性参照对照品和阳性参照对照品宜与试验物质平行进行试验,以证实组织存活性(阴性参照对照品)、屏障功能和所产生的组织敏感性(阳性参照对照品)在限定的历史允许范围内。阳性对照物质清单见参考文献[105]。

无刺激阴性对照品(如 PBS、水或空白)应与试验物质平行进行试验。阴性对照组织在培养中宜稳定,而且在试验化学物接触和孵育后的整个阶段活性测定值相近。应建立最低活性(如表示为活体染色剂绝对 OD)作为试验允许标准。阴性对照 OD 一般宜 0.8 以上。

试验中宜采用适当的阳性对照(如 5% SDS),以避免模型的彻底“淘汰”。应基于从充分数量的独立试验中获得的数据来建立阳性对照反应范围,在每一试验中,阳性对照合理分类为刺激物,应在已建立反应范围内,并且三组平行组织的标准差应低于规定的最大值。如达不到这些标准,该试验无效,宜进行复试。表 D.2 给出了 ECVAM 皮肤刺激确认研究中所采用的两种皮肤模型(EPISKIN^{TM4]}、EpiDerm^{TM4]})的典型范围。

表 D.2 模型对阳性对照(5%SDS)反应范围举例

皮肤模型	活性	范围	SD
EPISKIN ^{TM4]}	<40 %	1.5~32.2(1.3~41.6) ^a	≤18 %
EpiDerm ^{TM4]}	<20 %	3.7~13.8(4.7~13.6) ^a	≤18 %
^a 95 %置信区间。			

4] ISO 10993-10:2010 的附录 D 给出了模型示例为 EpiDermTM、EPISKINTM,给出的信息是为了便利本部分的使用者。

D.4 试验步骤

按照制造商提供的方法在组织培养基中培养组织构架。组织如经过运输,在实验室内使用组织之前宜小心按照按照推荐的条件步骤进行处置。

宜将至少 3 个足够尺寸(至少 10 mm 直径,0.63 cm²)的平行组织与试验样品和对照品一起孵育,试验样品和对照品与皮肤构架宜孵育至少(15±5)min。

足够数量的试验物质宜均匀覆盖皮肤表面,采用最低 25 μL/cm² 或 25 mg/cm²。固体物质宜采用去离子水或蒸馏水湿化后应用,以确保与皮肤的良好接触性。适当时,固体物在应用前研磨成粉剂。

孵育(15±5)min 后,试验样品经采用适宜的缓冲液或 0.9%氯化钠溶液彻底洗涤和冲洗后移除。洗涤和冲洗步骤宜适合于移除全部试验材料。考虑到微弱刺激作用的恢复,组织在新鲜培养基中继续孵育(42±2)h 作为接触后恢复期。(42±2)h 后测定细胞存活率。

注:重要的是要认识到医疗器械浸提液可能含有低浓度的刺激性化学物,因此需要与接触期相适应。

仅有定量方法可用于测定细胞活性。此外,活性的测定宜与所用的三维组织构架相适配。非特异性染色剂结合不宜干扰细胞活性的测定,因此不适宜采用蛋白结合和无代谢转化的染色剂(如中性红)。

最常用的方法为 MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue;CAS 号 298-93-1)] 还原法,该法已经显示可给出准确并具重现性的结果。将皮肤样品置于适宜浓度的 MTT 溶液(如 0.3 mg/mL 或 1 mg/mL)中 3 h,然后用一种溶剂(异丙醇)溶解沉积在细胞中的蓝紫色结晶甲臆,通过在 540 nm~595 nm 波长处测定 OD 确定甲臆的浓度。

注 1: 试验材料与活体染色剂的化学相互作用可能模拟细胞代谢,导致假活性测定值。当试验材料经冲洗未完全从皮肤上移除时会出现这种情况。试验材料如直接作用于活体染色剂,宜采用其他对照品来检测并调整试验物质对活性测定的干扰。

注 2: 采用四唑盐检测细胞代谢进行细胞活性测定的还有其他一些方法,比如 XTT、MTS 和 WST-1 法。

除了皮肤构架中细胞存活性,可测定白介素 1α(IL-1α)作为一种补偿终点,尤其见于 EPISKIN^{TM5]} 模型。上皮组织显示细胞活性大于 50%,在孵育后期结束时[(42±2)h 孵育后]采用市售酶联免疫试剂盒测定(即刻或冰冻)IL-1α 释放入组织培养基中的总量,见参考文献[107]。IL-1α 总量宜以国际单位表示。

D.5 结果和解释

每一试验样品测得的光密度(OD)值与阴性对照(设置为 100%)比较可用于计算活性百分数。宜明确规定区分无刺激试验材料刺激性的细胞活性百分数限值,以及用于评价结果与识别刺激材料的统计程序,并证明是适当的。

EPISKIN^{TM5]} 或 EpiDerm^{TM5]} 模型中,在接触和孵育后如组织活性≤50%,则试验物质被认为有皮肤刺激性。

虽然 IL-1α 或许有助于获取化学物潜在刺激性的其他信息,但一般仅有 MTT 法的结果用于考虑试验样品为刺激物。正在进行进一步的研究以改善 IL-1α 法的再现性,组合两种试验终点,以可靠预测刺激性。

EPISKIN^{TM5]} 模型中,组织显示细胞活性为大于 50%,在孵育后期结束时[(42±2)h 孵育后]测定(即刻或冰冻)IL-1α 释放入组织培养基中的总量。

在接触(15±5)min 和孵育后(42±2)h,如组织活性大于 50%,并且 IL-1α 释放量大于 9 IU/mL,

5] ISO 10993-10:2010 的附录 D 给出了模型示例为 EpiDermTM、EPISKINTM,给出的信息是为了便利本部分的使用者。

则试验物质被认为具有皮肤刺激性。

在接触 (15 ± 5) min 和孵育后 (42 ± 2) h,如组织活性大于 50%,并且 IL-1 α 释放量 ≤ 9 IU/mL,则试验物质被认为无皮肤刺激性。

在 EpiDermTM^{6]} 模型中,阴性反应需要在家兔皮肤刺激试验中得到证实。

D.6 试验报告

试验报告应包括下列信息:

- a) 所用皮肤模型和方法说明;
- b) 试验样品和对照样品的描述,包括化学名称,例如 IUPAC 或 CAS 名称和已知的 CAS 号;
- c) 物质或制剂(质量分数)的纯度和组分;
- d) 与研究相关的物理-化学特性,比如物理形态、挥发性、pH、稳定性、水溶性;
- e) 试验前对试验/对照物的处置(如加温、研磨),适当时;
- f) 已知的稳定性;
- g) 所用的细胞系统;
- h) 用于测定细胞活性的测量器械(如分光光度计)的设备校正信息;
- i) 所用特殊皮肤模型包括其活性的完整支持信息;
- j) 所用详细的试验步骤;
- k) 所用试验剂量;
- l) 试验步骤任何修改的描述;
- m) 对模型历史数据的参照;
- n) 所用评价标准的描述;
- o) 结果评定,包括每一试验样品和对照品测定活性数据列表;
- p) 观察到的其他作用的描述;
- q) 结果讨论;
- r) 结论。

6] ISO 10993-10:2010 的附录 D 给出了模型示例为 EpiDermTM、EPISKINTM,给出的信息是为了便利本部分的使用者。

附录 E

(资料性附录)

聚合物试验材料浸提液制备方法

E.1 总则

本附录给出了用于豚鼠最大剂量致敏试验(GPMT)的聚合物试验材料的浸提液制备指南,日本卫生、劳动与福利部(MHLW)的日本医疗材料和器械基本生物学试验导则(医疗器械评价部 2003 年 3 月 19 日发布的 36 号公告)描述了这种浸提液制备^[22]。

E.2 制备方法

E.2.1 预浸提

对试验样品进行预浸提步骤以确定用于 GPMT 的最适宜的浸提液制备。

推荐浸提溶剂采用甲醇和丙酮。试验样品切成小块(可能时),置于两个烧瓶中。每个烧瓶内加入 10 倍~20 倍体积的溶剂(即每克试验样品加 10 mL~20 mL 溶剂),在室温下振摇烧瓶进行浸提。在 24 h 至 72 h 浸提期间振摇 3 次[即 (4 ± 1) h、 (8 ± 1) h、 (24 ± 2) h],每次采用同体积新鲜溶剂。采集每一浸提期的浸提液并汇集到一起,通过蒸发溶剂获取残留物。

基于获取到的残留物质量确定最适合试验的溶剂。宜测定残留物百分率,选择获取最高残留量的溶剂为致敏试验浸提溶剂。

加入橄榄油、丙酮、甲醇或二甲基亚砜(DMSO)测定残留物的溶解度,溶解大部分残留物的溶剂用做 GPMT 的试验介质。

注:如无法获取丙酮或甲醇中的试验样品溶解物或降解物,或无法获取足够的残留量,可采用 *n*-正己烷或环己醇和丙醇 1:1 的混合物作为浸提溶剂。

E.2.2 最终浸提

E.2.2.1 总则

从有机溶剂浸提物中制备试验液有两个方法。

当试验样品溶剂浸提获取到的残留量与试验样品重量相对较高,由于已经获取到足够的残留量,方法 1 适用。此外,特别推荐方法 1 用于评价反复使用的医疗器械的风险,见参考文献[56]。

当试验样品溶剂浸提获取到的残留量或试验样品重量相对较低,方法 2 适用。试验样品重量低的产品如隐形眼镜和人工晶体。

对方法 1 和方法 2 两种方法,溶剂与试验样品浸提平行制备,溶剂总量与试验样品浸提期间所用总体积相等,采用与试验浸提液相同的浓缩步骤,这种溶剂空白用作试验各阶段的阴性对照。

E.2.2.2 按方法 1 试验样品制备

对方法 1,浸提时将适宜的 10 倍~20 倍体积的溶剂(依据预浸提试验中确定的)覆盖试验样品,并在室温下进行搅拌(振摇)。将溶剂采集到另外的烧瓶中。溶剂置换 3 次[如 (4 ± 1) h、 (8 ± 1) h、 (24 ± 2) h 浸提后],并根据试验材料浸出物的沥滤和稳定性方面的情况,在 24 h~72 h 浸提期间在室温下反复搅拌。

通过蒸发采集的溶剂获取残留物,在可能的最低温下使用旋转蒸发器,在低压强下进行可控式蒸发。

如同预浸提试验中稳定性试验所确定的,将残留物溶入适宜的介质(橄榄油/丙酮/乙醇/DMSO)内,制备 GPMT 皮内诱导阶段和局部诱导阶段所用的 10%(质量分数)和 20%(质量分数)的试验液。

在 GPMT 激发阶段用介质制备 10%(质量分数)的试验液,再用介质稀释为 1%、0.1%、0.01%和 0.001%的试验液。

E.2.2.3 按方法 2 试验样品制备

对方法 2,浸提时将适宜的 10 倍~20 倍体积的溶剂(依据预浸提试验中确定的)覆盖试验样品,并在室温下振摇(24±2)h。将溶剂采集到一个烧瓶中。在 24 h~72 h 期间重复浸提步骤 3 次,每次采用同体积新鲜溶剂。将浸提液汇集到一个烧瓶内并对溶剂进行蒸发。

对皮内诱导阶段,蒸发获取的浸提液,直至浸提液的残留毫升数等同于或稍低于所用样品的原始克数的一半(即如果浸提 10 g 试验样品,则混合溶剂浸提液蒸发至约 5 mL),或完全蒸发获取残留物。在获取到残留物时,将其溶于适宜的介质(依据预浸提试验中确定的)中至 5 mL,该溶液视为 200%试验液。

此外,用介质稀释 200%试验液以制备 100%试验液。

局部诱导阶段采用 100%试验液。对皮内和局部诱导两个阶段,200%和 100%试验液的介质替换为橄榄油,用同体积的橄榄油混合试验液,并在一股氮气下蒸发介质。

GPMT 激发阶段采用 100%、50%、25%、12.5%和 6.25%试验液。用介质稀释 100%试验液,得到 50%、25%、12.5%和 6.25%试验液。激发阶段不用橄榄油替换试验液的介质。

E.3 豚鼠最大剂量致敏试验(GPMT)

E.3.1 总则

除了下列描述的激发阶段,应按 7.3 的描述进行 GPMT。采用溶剂浸提方法进行激发时不宜用封闭贴敷。

E.3.2 激发阶段

封闭贴敷应用两周后,全部试验和对照动物用试验样品进行激发。

对方法 1,将 10%(质量分数)、1%和 0.1%试验液的等份 0.1 mL 局部应用于每一试验和阴性对照动物的右腹侧。另外,将 0.01%和 0.001%试验液的等份 0.1 mL 和阴性对照介质局部应用于每一试验和阴性对照动物的左腹侧。

对方法 2,将 100%、50%和 25%试验液的等份 0.1 mL 局部应用于每一试验和阴性对照动物的右腹侧。另外,将 12.5%和 6.25%试验液的等份 0.1 mL 和阴性对照介质局部应用于每一试验和阴性对照动物的左腹侧。

对方法 1 和方法 2 两种方法,采用溶于乙醇的 0.1%DNCB 的等份 0.1 mL 应用于阳性对照动物右腹侧,左腹侧应用乙醇。

注:可同样进行封闭激发。

附录 F (资料性附录) 背景信息

F.1 刺激试验

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。

皮肤刺激试验结果可能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。见参考文献[1][3][36]。SDS 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。见参考文献[19][20]。

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,1988 年 6 月 7 日的委员会指令^[23]),SDS 被分类为皮肤刺激物,但是 SDS 达到或接近被视为皮肤刺激物的化学物临界水平并未明确。这样比起使用纯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。见参考文献[36]。

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。见参考文献[11][15]。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。见参考文献[13][17][18]。不过 Draize 白化兔皮肤刺激试验已具有 10 多年的经验,参考文献[7]描述了该方法。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,用胶带固定敷贴片并用半透气性包扎带缠绕动物整个躯体(4 ± 0.5)h。4 h 后除去敷贴片并清洁试验部位,1 h 后对出现的红斑和水肿反应进行评分。同样对(24 ± 2)h、(48 ± 2)h 和(72 ± 2)h 的反应进行评分。

兔眼刺激试验也已开发用于预测人眼的刺激性。见参考文献[32]。已发表的 Draize 记分系统^[31]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的认可。见参考文献[26]。最近,欧洲替代方法验证中心(ICCVAM)评价了四个体外替代试验系统,其中两个方法已经被充分发展,替代体内动物试验用于识别重度刺激物和腐蚀物。这些方法是牛眼角膜混浊度与渗透度(BCOP)试验法以及 ICCVAM 试验方法评价报告^[107]。对弱刺激物,仍然需要采用体内方法进行评价。

外推性人体皮肤刺激数据主要来源于研究机构,如见已出版的《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。参考文献[5]给出了其他背景信息。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。

F.2 皮肤致敏试验

一次或多次接触表皮后,在免疫系统的组分的引发和诱导下,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原性复合物。存在于表皮/真皮接缘处的朗罕氏细胞将抗原递呈给特异性淋巴细胞,而后活化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初始激活因子,这样以后再次接触同一抗原时,活化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采用斑贴试验在一例临床病例中揭示了汞接触变态反应。这一创新的方法为以后的诊断和预测人及动物接触变态反应试验提供了科学基础。Landsteiner和Chase等人证实使用豚鼠研究皮肤致敏反应,评价化学物致敏潜能的前瞻性/预测性试验的开发即是延续了他们的开创性研究^[34]。

Magnusson和Kligman等人^[35]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[用或不用弗氏完全佐剂(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,可检测出微弱致敏物,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^[6]在1965年提出封闭斑贴法为首选接触方法,该法产生封闭性,用优化接触来模拟人体使用过程(人体重复损害斑贴试验,HR IPT)。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HR IPT试验中的受试者得以避免发生有害反应。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,而且在风险评定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。见参考文献^[51]。

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的读数。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法规认可接受,只要该方法由研究者以适当的文件形式提出并加以验证。在所有的试验中,均应按照原始参考资料完成试验步骤。下面给出了其他试验。

参考文献^[49]给出了一种最新的皮肤致敏试验。

- 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(佐剂和斑贴)试验[Scratched skin (adjuvant and patch) test]
- 8) 鼠耳肿胀试验(Mouse ear swelling test)

除了GPMT和Buehler封闭贴敷试验,局部淋巴结试验(LLNA)已被经济与合作发展组织(OECD)接受作为当前豚鼠试验的唯一替代方法,该法对动物保护方面有所改善。见参考文献^[88]。LLNA已被认可用于化学物致敏活性的检测。见参考文献^[94] [95]。

LLNA 的科学原理是,通过测定局部接触试验样品后小鼠引流淋巴结内掺入³H 甲基胸腺嘧啶核苷的量来检测致敏反应。该试验不包括激发阶段,试验所关注的终点是刺激指数(SI),给出试验动物和对照动物淋巴结内掺入胸腺嘧啶核苷的比率。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间评价,已经证实了 LLNA 在剂量水平关系方面具有再现性。见参考文献[64][65][70][77][81][83][87]。然而,也有报告称 LLNA 很难区分刺激性与变应原性物质。见参考文献[67][77][83],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。见参考文献[64]。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。见参考文献[73][74]。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。见参考文献[82]。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。

豚鼠淋巴结测定(PLNA)是另外一种淋巴结检验法,该法采用脚垫皮下应用(见参考文献[68][71][86])。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。见参考文献[63]。

风险评定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能、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能,其诱导浓度越低说明致敏剂的致敏潜能越大。见参考文献[45][85]。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。见参考文献[56]。

另外,混合剂和产品的预测性试验很少被确认,并且可在产品成分试验后再进行,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。见参考文献[53]。另一个例子是,橡胶长筒靴制备的丙酮/氯仿浸提液进行的动物试验引发了人体接触性皮炎,逐渐发现,巯基苯并噻唑(mercaptobenzothiazole)和二硫化二苯并噻唑(dibenzothiazyl disulfide)是诱发变应原。见参考文献[52]。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,有机溶剂浸提液诱发了豚鼠皮肤致敏反应。

日本医用材料和器械基本生物学试验导则(1995)^[24]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,在风险评定步骤中对材料残留物百分率与仍能诱发动物皮肤致敏反应的残留物(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还没有用于常规使用,但鉴于欧洲新法规禁止化妆品使用动物试验,可能将会有新策略用于致敏物的识别。见参考文献[14][108][111][112][113]。

参 考 文 献

皮肤刺激、眼刺激和皮肤致敏试验的一般参考文献

- [1] 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
- [2] World Medical Association, Declaration of Helsinki, Recommendation guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, October 1983 and 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. *Proc. XXVIth Conf.*, Geneva, 1993
- [3] LEE, C. H. and MAIBACH, H. I., The sodium lauryl sulfate model: an overview, *Contact Dermatitis*, 33, pp.1-7, 1995
- [4] MARZULLI, F. N. and MAIBACH, H. I., (eds.) *Dermatotoxicology*, 5th edn., Hemisphere Publ. Corp., 1996
- [5] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guideline for the testing of chemicals. Acute dermal irritation study in human volunteers. Draft document, Nov. 1997
- [6] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines for the testing of chemicals No. 406, Skin sensitization, OECD Publications, 1992
- [7] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines for testing of chemicals No. 404, Acute skin irritation/corrosion, OECD Publications, 1992
- [8] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guidelines for testing of chemicals No. 405, Acute eye irritation/corrosion, OECD Publications, 1992
- [9] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guidelines for testing of chemicals No. 430, In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER), OECD Publications, 2009
- [10] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guidelines for testing of chemicals No. 431, In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Publications, 2009
- [11] 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). CRC Press, Boca Raton, pp. 335-341, 1996
- [12] RUSSEL, W. M. S. and BURCH, R. L., *The principles of humane experimental technique*, 238 pp., Methuen, London, 1959
- [13] SERU, P. J. and JEMEC, G. B. E., *Handbook of non-invasive methods and the skin*, CRC Press, 1995
- [14] DE SILVA, O., 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
- [15] 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), CRC Press, Boca Raton, pp. 329-334, 1996
- [16] SVENDSEN, O., GARTHOFF, B., SPIELMANN, H. et al., Alternatives to the animal tes-

ting of medical devices, ALTA, 24, pp.659-670, 1996

[17] WAHLBERG, J.E., Assessment of skin irritancy; measurement of skin fold thickness, Contact Dermatitis, 9, pp.21-26, 1983 Licensed by SAC to ISO/TC 194

[18] WAHLBERG, J.E. and WAHLBERG, E.N., Quantification of skin blood flow at patch test sites, Contact Dermatitis, 17, pp.229-233, 1987

[19] WAHLBERG, J.E. and MAILBACH, H.I., Nonanoic acid irritation—A positive control at routine patch testing? Contact dermatitis, 6, pp.128-130, 1980

[20] WAHLBERG, J.E., WRANGSJO, K. and HIETASOLA, A., Skin irritancy from nonanoic acid, Contact dermatitis, 13, pp.266-269, 1985

[21] 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

[22] Test Methods for Evaluating Biological Safety of Medical Devices, Part 2: Skin Sensitivity Tests, Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) memorandum, Jimurenaku Iryokikishinsa No. 36, 2003/03/19

[23] European Union, 88/379/EEC Council Directive, June 1988

[24] Japanese Guidelines of Basic Biological Tests of Medical Materials and Devices, 1995 Bibliography for skin and eye irritation tests

[25] ISO 9394, Ophthalmic optics—Contact lenses and contact lens care products—Determination of biocompatibility by ocular study using rabbit eyes

[26] BALLS, M., BERG, N. and BRUNER, L. H. et al., Eye irritation testing; the way forward, ATLA, 27, pp.53-78, 1999

[27] 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

[28] 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

[29] 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

[30] DRAIZE, J. H., Dermal Toxicity. Association of food and drug officials of the US, FDA, Washington, DC, pp.46-59, 1955

[31] 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, 1959

[32] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, Eye irritation testing, Monograph 11, Brussels, Belgium, 1988

[33] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, Skin irritation, Monograph 15, Brussels, Belgium, 1990

[34] 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

[35] 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.), Churchill Livingstone, New York, pp.1-11, 1975

[36] 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

口腔刺激参考文献

[37] 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

[38] ROY, M. and WHITE, H. I. Establishment of an improved technique for hamster mucous membrane irritation testing, *J. Dent. Res.*, 11, pp.365-1375, 1986 Bibliography for vaginal irritation tests

[39] 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

[40] 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

[41] 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

[42] 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 Bibliography for skin sensitization tests

[43] ANDERSEN, K. E. and MAIBACH, H. I., Contact allergy predictive tests in guinea pigs, *Curr. Probl. Dermatol.*, 14, 1985

[44] ANDERSEN, K. E. and MAIBACH, H. I., Guinea pig sensitization assays, An overview, *Curr. Probl. Dermatol.*, 14, pp.263-290, 1985

[45] 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

[46] BUEHLER, E. V., Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig, *Arch. Dermatol.*, 91, pp.171-175, 1965

[47] 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

[48] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, Skin sensitization testing, Monograph 14, Brussels, Belgium, 1990

[49] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, Skin sensitization testing for the purpose of hazard identification and risk assessment, Monograph 29, Brussels, Belgium, 2000

[50] FRANKILD, S., BASKETTER, D. A. and ANDERSEN, K. E., The value and limitations of rechallenger in the guinea pig maximization test, *Contact Dermatitis*, 35, pp.135-140, 1996

[51] 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

[52] 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

[53] 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, *Contact Dermatitis*, 23, pp.129-141, 1990[published erratum appears in *Contact Dermatitis*, 23, p.383]

- [54] LANDSTEINER, K. and CHASE, M. W., Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds, *J. Exp. Med.*, 69, p.767, 1939
- [55] 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
- [56] 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
- [57] 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
- [58] 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
- [59] 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
- [60] ROBERTS, D. W., Structure-activity relationships for skin sensitization potential of diacrylates and dimethacrylates, *Contact Dermatitis*, 17, pp.281-289, 1987
- [61] 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
- [62] 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
- LLNA 参考文献
- [63] ALBERS, R., BROEDERS, A., VAN DER PIJL, 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
- [64] 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
- [65] 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
- [66] BASKETTER, D. A. and SCHOLE, 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
- [67] BASKETTER, D. A., SCHOLE, 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
- [68] 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
- [69] 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/IInadocs/IIinarep.pdf>

- [70] 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
- [71] DESCOTES, J., PATRIARCA, C., VIAL T. et al., The popliteal lymph node assay in 1996, *Toxicol.*, 119, pp.45-49, 1997
- [72] 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
- [73] 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)
- [74] 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)
- [75] 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
- [76] 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
- [77] 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
- [78] 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
- [79] 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
- [80] 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
- [81] 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
- [82] LEA, L. J., WARBRICK, E. V., DEARMAN, R. J. et al., The impact of vehicle on assessment of relative skin sensitization potency of 1,4-dihydroquinone in the local lymph node assay, *Am. J. Contact Dermatitis*, 10, pp.213-218, 1999
- [83] 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
- [84] 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
- [85] ROBERTS, D. W., Structure-activity relationships of skin sensitization potential of diacrylates and dimethacrylates, *Contact Dermatitis*, 17, pp.281-289, 1987
- [86] 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
- [87] 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

[88] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guideline for the testing of chemicals No.429, Skin sensitisation; Local lymph node assay, OECD Publications, 2002

[89] RYAN, C.A., CRUSE, L.W., SKINNER, R.A. et al., Examination of a vehicle for use with water soluble materials in the murine local lymph node assay, *Food Chem Toxicol.*, 40, pp.1719-1725, 2002

[90] WOOLHISER, M.R., MUNSON, A.E. and MEADE, B.J., Comparison of mouse strains using the local lymph node assay, *Toxicology* 146, pp.221-227, 2000

[91] TAKEYOSHI, M., NODA, S., YAMASAKI, K. et al., Advantage of using CBA/N strain mice in a nonradioisotopic modification of the local lymph node assay, *J. Appl. Toxicol.*, 26, pp.5-9, 2006

[92] VAN OCH, F.M.M., SLOB, W., DE JONG, W.H. et al., A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of the uncertainty margins, *Toxicology*, 146, pp.49-59, 2000

[93] DE JONG, W.H., VAN OCH, F.M.M., DEN HARTOG JAGER, C.F. et al., Ranking of allergenic potency of rubber chemicals in a modified local lymph node assay, *Toxicol. Sc.*, 66, pp.226-232, 2002

[94] DEAN, J.H., TWERDOK, L.E., TICE, R.R. et al., ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. II Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 34, pp.258-273, 2001

[95] HANEK, K.E., TICE, R.R., CARSON, B.L. et al., ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. III Data analysis completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 34, pp.274-286, 2001

[96] ASTM F2148-07, Standard Practice for Evaluation of Delayed Contact Hypersensitivity Using the Murine Local Lymph Node Assay (LLNA)

[97] COCKSHOTT, A., EVANS, P., RYANS, C.A. et al., The local lymph node assay in practice; a current regulatory perspective, *Human Exp. Toxicol.*, 25, pp.387-394, 2006

[98] GERBERICK, G.F., RYAN, C.A., DEARMAN, R.J., and KIMBER, I., Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals, *Methods*, 41, pp.54-60, 2007

[99] AZAM, P., PEIFFER, J.L., OURLIN, J.C. et al., Qualitative and quantitative evaluation of a local lymph node assay based on ex vivo interleukin-2 production, *Toxicology*, 206, pp.285-298, 2005

[100] LEE, J.K., PARK, J.H., PARK, S.H. et al., A nonradioisotopic endpoint for measurement of lymph node cell proliferation in a murine allergic contact dermatitis model, using bromodeoxyuridine immunohistochemistry, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 48, pp.53-61, 2002

体外皮肤刺激试验参考文献

[101] HARTUNG, T., Statement on the validity of in vitro tests for skin irritation, ECVAM, Ispra, Italy, 2007 (http://ecvam.jrc.it/publication/ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf)

[102] KANDAROVA, H., LIEBSCH, M., GERNER, I. et al., The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests - An assessment of the performance of the optimised test, *ATLA*, 33, pp.351-367, 2005

[103] COTOVIO, J., GRANDIDIER, M.-H., PORTES, P. et al., The in vitro acute skin irritation of chemicals: Optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the

ECVAM validation process, ATLA, 33, pp.329-349, 2005

[104] SPIELMANN, H., HOFFMANN, S. and LIEBSCH, M., The ECVAM International Validation Study on In vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, ATLA, 35, pp.559-601, 2007

[105] ECVAM, Performance Standards for Applying Human Skin Models to In vitro Skin Irritation Testing, Final Version 25 May 2007, 13pp. Available under Downloads of study documents, available at (http://ecvam.jrc.it/ft_doc/2007-05-25_1_SIVS_Performance%20Standards_final.pdf)

[106] R&D Systems, Human IL-1 α /IL-1F1 Immunoassay, Catalog Number DLA50. For the quantitative determination of human interleukin 1 alpha (IL-1 α) concentrations in cell culture supernates, serum, and plasma. (<http://www.rndsystems.com/pdf/dla50.pdf>)

[107] ICCVAM TEST METHOD EVALUATION REPORT, In vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Severe Irritants and Corrosives. NIH Publication No.07-4517

[108] BASKETTER, D. and MAXWELL, G., In vitro approaches to the identification and characterization of skin sensitizers, Cutaneous and Ocular Toxicol., 26, pp.359-373, 2007

[109] POUMAY, Y. and COQUETTE, A., Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research, Arch Dermatol Res., 298, pp.361-369, 2007

[110] PONEC, M., Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing, Adv Drug Deliv Rev., 54 Suppl 1: pp.19-30, 2002

[111] ASHIKAGA, T., YOSHIDA, Y., HIROTA, M. et al., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol, Toxicology in vitro, 20, pp.767-773, 2006

[112] SAKAGUCHI, H., ASHIKAGA, T., MIYAZAWA, M. et al., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT, Toxicology in vitro, 20, pp.774-784, 2006

[113] ASHIKAGA, T., SAKAGUCHI, H., OKAMOTO, K. et al., Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study, Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 13, pp.27-35, 2008

[114] ECVAM, European Centre for the Validation of Alternative Methods. (<http://ecvam.jrc.it/>)

[115] ICCVAM, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. (<http://iccvam.niehs.nih.gov/>)

[116] JaCVAM, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods. (<http://jacvam.jp/about/about04.html>)

[117] OMORI, T., IKARASHI, Y., KANAZAWA, Y. et al., Validation studies on an alternative endpoint for the local lymph node assay (LLNA-DA): Importance of study management, Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August 21-25, 2007, Tokyo, Japan, AATEX, 14

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准

医疗器械生物学评价

第 10 部分:刺激与皮肤致敏试验

GB/T 16886.10—2017/ISO 10993-10:2010

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 4 字数 114 千字
2018 年 1 月第一版 2018 年 1 月第一次印刷

*

书号: 155066 · 1-59378 定价 54.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 16886.10-2017