

1 附 5

2 药包材皮肤致敏试验方法

3 本法系将供试品溶液与豚鼠皮肤接触，在规定时间内观察豚鼠皮肤的红斑和水肿反应，
4 以判定供试品在试验条件下使豚鼠产生皮肤致敏反应的一种方法。

5 **试验用动物** 使用健康、初成年的 Hartley 豚鼠作为皮肤致敏实验动物，试验开始时体
6 重应为 300g ~ 500g，雌（未孕）雄不限。对于一种提取介质，供试品组 10 只动物，阴性
7 对照组 5 只动物；复试时供试品组 20 只动物，阴性对照组 10 只动物。试验开始之前剃除
8 豚鼠背部 4cm×6cm 区域毛发。

9 **供试品溶液的制备** 取供试品，按照“药包材生物学评价与试验选择指导原则（9651）”
10 中生物学试验的要求制备供试品溶液。

11 **阴性对照液的制备** 采用供试品溶液制备同批号的提取溶剂（不含供试品），以相同的
12 方式制备作为阴性对照液。供试品溶液和阴性对照液应在制备后 24 小时内使用，在试验
13 前应平衡至室温，并确保充分混匀。

14 **试验方法（豚鼠最大剂量法）**

15 (1) 皮内诱导：按图 1 所示（A、B 和 C），在每只动物去毛的肩胛骨内侧部位成对皮
16 内注射 0.1mL。

17 部位 A：注射弗氏完全佐剂与提取溶剂以 1:1（体积比）比例混合的稳定乳化剂。

18 部位 B：注射供试品溶液；对照组动物仅注射阴性对照液。

19 部位 C：供试品溶液以 1:1 的体积比例与弗氏完全佐剂和提取溶剂配制成的乳化剂混
20 合后进行皮内注射；对照组注射阴性对照液与弗氏完全佐剂以 1:1 的体积比混合的稳定乳
21 化剂。

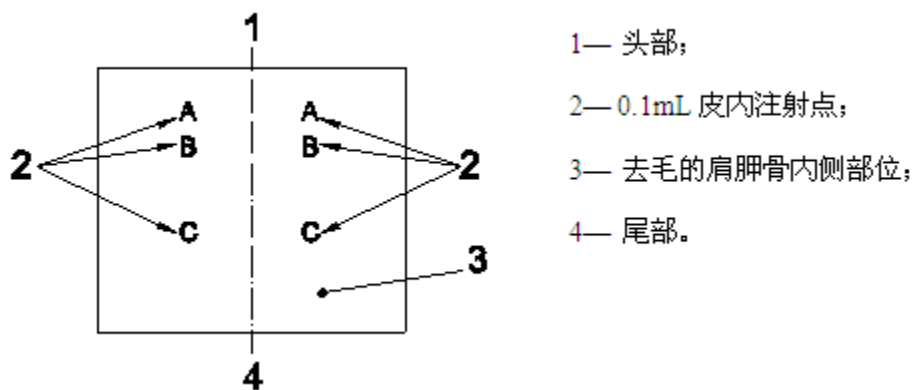


图 1 皮内注射点部位

(2) 局部诱导：皮内诱导后 (7 ± 1) 天，在注射部位再次剃毛，将 $2\text{cm}\times 4\text{cm}$ 的敷贴片 (滤纸或吸水性纱布块) 置于供试品溶液或阴性对照液中浸透，局部贴敷于动物剃毛区，覆盖诱导注射点。在局部敷贴应用前 (24 ± 2) 小时，如皮内诱导阶段部位 B 未产生刺激反应，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) 小时后除去包扎带和敷贴片。对照组动物使用阴性对照液同法操作。

(3) 激发：局部诱导后 (14 ± 1) 天，在豚鼠左右腹侧未试验部位剃毛，将 $2\text{cm}\times 2\text{cm}$ 的敷贴片置于供试品溶液或阴性对照液中浸透，局部贴敷于动物剃毛区。用封闭式包扎带固定，并于 (24 ± 2) 小时后除去包扎带和敷贴片。

动物观察 除去敷贴片后 (24 ± 2) 小时和 (48 ± 2) 小时观察供试品组和对照组动物激发部位的红斑和水肿，按表 1 给出的 Magnusson 和 Kligman 分级标准评级。

表 1 Magnusson 和 Kligman 分级

红斑形成	分级
无红斑	0
散发性或斑点状红斑	1
中度融合红斑	2
重度红斑和/或水肿	3

结果判定 阴性对照组动物分级小于 1，而供试品组分级大于等于 1 时提示致敏。如阴性对照组动物分级大于等于 1 时，供试品组动物反应超过阴性对照组中最严重的反应则认

38 为致敏。如为疑似反应，或供试品组出现反应的动物数量多于阴性对照组，但反应强度并
39 不超过阴性对照组时，可在首次激发后 1 周~2 周进行再次激发，以明确反应。所用方法
40 与首次激发相同，采用动物未试验的一侧部位。将出现致敏反应的动物数除以该组试验动
41 物数，求得致敏反应率(%)，按表 2 致敏反应率分级标准评定致敏性。

42

表 2 致敏反应率分级

致敏率(%)	分级	致敏性
0	0	无致敏性
< 10	1	极轻微
10~30	2	轻微
31~60	3	中度
61~80	4	强烈
81~100	5	极强

注：当 20 只动物/组时，致敏率应为 5%的倍数。

43

44 为了确保试验的再现性和敏感性，应定期进行阳性对照试验。巯基苯并噻唑、己基肉
45 桂醛和苯佐卡因是已知的致敏剂，也可采用中度致敏剂（如甲醛）和强致敏剂（如二硝基
46 氯苯，DNCB）。至少每 6 个月采用 10 只动物进行阳性对照试验；时间间隔小于 6 个月时，
47 至少采用 5 只动物。