

6 皮肤变态反应试验

Skin Sensitisation Test

1 范围

本规范规定了动物皮肤变态反应试验的基本原则、要求和方法。
本规范适用于化妆品原料及其产品安全性毒理学检测。

2 试验目的

确定重复接触化妆品及其原料对哺乳动物是否可引起变态反应及其程度。

3 定义

3.1 皮肤变态反应（过敏性接触性皮炎） skin sensitization, allergic contact dermatitis

是皮肤对一种物质产生的免疫源性皮肤反应。在人类这种反应可能以瘙痒、红斑、丘疹、水疱、融合水疱为特征。动物的反应不同，可能只见到皮肤红斑和水肿。

3.2 诱导接触 induction exposure

指机体通过接触受试物而诱导出过敏状态的试验性暴露。

3.3 诱导阶段 induction period

指机体通过接触受试物而诱导出过敏状态所需的时间，一般至少一周。

3.4 激发接触 challenge exposure

机体接受诱导暴露后，再次接触受试物的试验性暴露，以确定皮肤是否会出现过敏反应。

4 试验的基本原则

实验动物通过多次皮肤涂抹（诱导接触）或皮内注射受试物 10d—14d（诱导阶段）后，给予激发剂量的受试物，观察实验动物并与对照动物比较对激发接触受试物的皮肤反应强度。

4.1 实验动物和饲养环境

一般选用健康、成年雄性或雌性豚鼠，雌性动物应选用未孕或未曾产仔的。

实验动物及实验动物房应符合国家相应规定。选用标准配合饲料，饮水不限制，需注意补充适量 Vc。

4.2 动物试验前准备

试验前动物要在实验动物房环境中至少适应 3d—5d 时间。将动物随机分为受试物组和对照组，按所选用的试验方法，选择适当部位给动物去毛，避免损伤皮肤。试验开始和结束时应记录动物体重。

4.3 无论在诱导阶段或激发阶段均应对动物进行全面观察包括全身反应和局部反应，并作完整记录。

4.4 试验方法可靠性的检查

使用已知的能引起轻度/中度致敏的阳性物每隔半年检查一次。局部封闭涂皮法至少有 30% 动物出现皮肤过敏反应；皮内注射法至少有 60% 动物出现皮肤过敏反应。阳性物一般采用 2,4-二硝基氯代苯，肉桂醛，2-巯基苯并噻唑或对氨基苯酸乙酯。

5 试验方法

5.1 局部封闭涂皮试验（Buehler Test, BT）

5.1.1 动物数

试验组至少 20 只，对照组至少 10 只。

5.1.2 剂量水平

诱导接触受试物浓度为能引起皮肤轻度刺激反应的最高浓度，激发接触受试物浓度为不能引起皮肤刺激反应的最高浓度。试验浓度水平可以通过少量动物（2—3 只）的预试验获得。

水溶性受试物可用水或用无刺激性表面活性剂作为赋形剂，其他受试物可用 80%乙醇或丙酮等作赋形剂，并设溶剂对照。

5.1.3 试验步骤

5.1.3.1 试验前约 24 h，将豚鼠背部左侧去毛，去毛范围为 4 cm²—6 cm²。

5.1.3.2 诱导接触：将受试物约 0.2mL（g）涂在实验动物去毛区皮肤上，以二层纱布和一层玻璃纸覆盖，再以无刺激胶布封闭固定 6 h。第 7d 和第 14d 以同样方法重复一次。

5.1.3.3 激发接触：末次诱导后 14—28d，将约 0.2mL 的受试物涂于豚鼠背部右侧 2cm×2cm 去毛区（接触前 24h 脱毛），然后用二层纱布和一层玻璃纸覆盖，再以无刺激胶布固定 6h。

5.1.3.4 激发接触后 24h 和 48h 观察皮肤反应，按表 1 评分。

5.1.3.5 试验中需设阴性对照组，使用 5.1.3.2 和 5.1.3.3 的方法，在诱导接触时仅涂以溶剂作为对照，在激发接触时涂以受试物。对照组动物必须和受试物组动物为同一批。在实验室开展变态反应试验初期，或使用新的动物种属或品系时，需同时设阳性对照组。

表 1 变态反应试验皮肤反应评分

皮肤反应	积分
红斑和焦痂形成	
无红斑	0
轻微红斑（勉强可见）	1
明显红斑（散在或小块红斑）	2
中度—重度红斑	3
严重红斑（紫红色）至轻微焦痂形成	4
水肿形成	
无水肿	0
轻微水肿（勉强可见）	1
中度水肿（皮肤隆起轮廓清楚）	2
重度水肿（皮肤隆起约 1mm 或超过 1mm）	3
最高积分	7

5.1.4 结果评价

5.1.4.1 当受试物组动物出现皮肤反应积分≥2 时，判为该动物出现皮肤变态反应阳性，按表 3 判定受试物的致敏强度。

5.1.4.2 如激发接触所得结果仍不能确定，应于第一次激发后一周，给予第二次激发，对照组作同步处理或按 5.2 的方法进行评价。

5.2 豚鼠最大值试验 (Guinea Pig Maximinativ Test , GPMT)

采用完全福氏佐剂 (Freund Complete Adjuvant, FCA) 皮内注射方法检测致敏的可能性。

5.2.1 动物数

试验组至少用10只，对照组至少5只。如果试验结果难以确定受试物的致敏性，应增加动物数，试验组20只，对照组10只。

5.2.2 剂量水平

诱导接触受试物浓度为能引起皮肤轻度刺激反应的最高浓度，激发接触受试物浓度为不能引起皮肤刺激反应的最高浓度。试验浓度水平可以通过少量动物（2—3 只）的预试验获得。

5.2.3 试验步骤

5.2.3.1 诱导接触（第0d）

受试物组：将颈背部去毛区（2cm×4cm）中线两侧划定三个对称点，每点皮内注射0.1mL下述溶液。

第1点 1: 1（V/V）FCA/水或生理盐水的混合物

第2点 耐受浓度的受试物

第3点 用1: 1（v/v）FCA/水或生理盐水配制的受试物，浓度与第2点相同

对照组：注射部位同受试物组

第1点 1: 1（V/V）FCA/水或生理盐水的混合物

第2点 未稀释的溶剂

第3点 用1: 1（v/v）FCA/水或生理盐水配制的浓度为 50%（w/v）的溶剂

5.2.3.2 诱导接触（第7d）：

将涂有0.5g(mL)受试物的2cm×4cm滤纸敷贴在上述再次去毛的注射部位，然后用两层纱布，一层玻璃纸覆盖，无刺激胶布封闭固定48h。对无皮肤刺激作用的受试物，可加强致敏，于第二次诱导接触前24h在注射部位涂抹10%十二烷基硫酸钠（SLS）0.5mL。对照组仅用溶剂作诱导处理。

5.2.3.3 激发接触（第21d）

将豚鼠躯干部去毛，用涂有0.5g(mL)受试物的2cm×2cm滤纸片敷贴在去毛区，然后再用两层纱布，一层玻璃纸覆盖，无刺激胶布封闭固定24h。对照组动物作同样处理。如激发接触所得结果不能确定，可在第一次激发接触一周后进行第二次激发接触。对照组作同步处理。

5.2.4 观察及结果评价

激发接触结束，除去涂有受试物的滤纸后24、48和72h，观察皮肤反应，（如需要清除受试残留物可用水或选用不改变皮肤已有反应和不损伤皮肤的溶剂）按表2评分。当受试物组动物皮肤反应积分≥1时，应判为变态反应阳性，按表3对受试物进行致敏强度分级。

表 2 变态反应试验皮肤反应评分

评分	皮肤反应
0	未见皮肤反应
1	散在或小块红斑
2	中度红斑和融合红斑
3	重度红斑和水肿

表 3 致敏强度

致敏率%	致敏强度
0—8	弱

致敏率%	致敏强度
9—28	轻
29—64	中
65—80	强
81—100	极强

注：当致敏率为 0 时，可判为未见皮肤变态反应。

6 试验结果的解释

试验结果应能得出受试物的致敏能力和强度。这些结果只能在很有限的范围内外推到人类。引起豚鼠强烈反应的物质在人群中也可能引起一定程度的变态反应，而引起豚鼠较弱反应的物质在人群中也许不能引起变态反应。