

附件 4

皮肤变态反应：局部淋巴结试验:DA Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA (LLNA:DA)

1 范围

本方法规定了局部淋巴结试验 (LLNA:DA) 的基本原则和试验要求。

本方法适用于化妆品用化学原料皮肤变态反应的检测。

2 试验目的

确定重复接触化妆品用化学原料对哺乳动物皮肤局部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

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 皮肤刺激性 dermal irritation

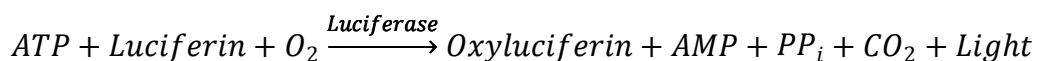
皮肤涂抹受试物后局部产生的原发可逆性炎性变化。

3.3 刺激指数 stimulation index

评价受试物皮肤致敏能力的值，是试验组与溶剂对照组增殖率的比值。

4 试验原理

过敏原引起染毒部位回流淋巴结内淋巴细胞增殖，其增殖程度与过敏原的剂量和效力成比例。通过生物发光法测定耳廓淋巴结内淋巴细胞ATP含量（与活细胞数相关）从而评价其增殖程度。生物发光法利用荧光素酶（*luciferase*）催化ATP和荧光素（*luciferin*）反应同时发光，其发光强度与ATP浓度线性相关。通过计算受试物组与溶剂对照组ATP含量比值即刺激指数评价受试物的皮肤致敏性。



5 试验的基本原则

5.1 实验动物和饲养环境

选用SPF级BALB/c或CBA/J小鼠，8~12周龄，雌性，未孕或未曾产仔的。体重差异应不超过平均体重的20%。其他品系或雄性小鼠如经验证LLNA:DA反应不存在明显品系或性别间差异亦可使用。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。

5.2 动物试验前准备

试验前动物应在实验动物房环境中至少适应5d。将动物随机分组标记（不要做任何形式的耳朵标记），检查皮肤应健康无损伤。试验开始和结束时应记录动物体重。

5.3 可靠性检查

每次试验均需设置阳性对照组，阳性物一般采用25%己基肉桂醛（CAS号101-86-0）或25%丁子香酚（CAS号97-53-0），溶剂为丙酮：橄榄油（AOO，4:1，v/v）。当阳性物与受试

物的溶剂不同时，需另单独设置阳性物的溶剂对照组。

5.4 试验期间每天观察动物临床症状及耳朵局部刺激症状，并做完整记录。

6 试验方法

进行本试验前，需通过预试验（每组 1~2 只动物）排除受试物引起全身毒性和（或）局部皮肤中度刺激性。筛选最大剂量水平要求：液体受试物达到 100%浓度，固体或悬浮液达到最大可能浓度。

6.1 动物与分组

动物随机分为阴性（溶剂）对照组、阳性对照组和受试物组（至少3个浓度），每组至少4只动物。

6.2 受试物配制

固体受试物应溶于或悬浮于适当溶剂中并稀释，液体受试物可以直接或稀释用。受试物应现用现配。

6.3 溶剂的选择

常用溶剂为丙酮：橄榄油（AOO，v/v 4:1）、N,N-二甲基甲酰胺（DMF）、甲乙酮（MEK）、丙烯乙二醇、二甲基亚砷（DMSO）等。

6.4 剂量水平

受试物最高浓度应不引起动物全身毒性和（或）局部皮肤中度刺激性，通过预试验按合适浓度梯度如100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%等选择三个连续的试验浓度。

6.5 试验步骤

6.5.1 第1d

动物随机分组、标记、称重、记录临床症状。将1%十二烷基硫酸钠（SLS）均匀涂抹到小鼠双侧耳朵背部皮肤。刷子或棉签应浸泡在SLS溶液中，并在小鼠每个耳朵背部重复涂抹4~5次。1h后再涂抹受试物或对照25μL/耳。

6.5.2 第2d、第3d、第7d

操作同第1d，重复1%SLS溶液预处理和受试物或对照涂抹。

6.5.3 第4~6d

不做任何处理。

6.5.4 第8d

记录小鼠体重和出现的任何临床症状，第7d染毒后约24~30h人道处死动物，摘取小鼠双侧颌下淋巴结，同时分离耳廓打孔称重。

试验期间每天观察记录小鼠临床症状及耳朵局部刺激症状并按表1进行评分，任何时候局部刺激红斑评分≥3和（或）耳廓厚度（耳廓重）≥25%，为中度皮肤刺激性。在整个实验过程中，不应出现中度皮肤刺激性反应。

表1 红斑评分

症状	分值
无红斑	0
轻微红斑（勉强可见）	1
明显红斑	2
中度-重度红斑	3
严重红斑（紫红色）至轻微焦痂形成	4

6.5.5 淋巴细胞悬液的制备

将每只小鼠分离的淋巴结夹在两片载玻片之间，施加轻微压力压碎，拉动两个载玻片使之分开。将每片载玻片在培养皿上固定一定的角度，用磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗，同时用细胞刮刀将载玻片上组织轻轻刮下，每只小鼠淋巴结制成 1mL 细胞悬液。吸取 20 μ L 淋巴细胞悬液加到 1.98mL PBS 中混匀制成 2mL 样品，注意不要吸取肉眼可见的膜。用相同方法制备第二个 2mL 样品（每只小鼠制备两份平行样品）。

6.5.6 细胞增殖测定（淋巴细胞 ATP 含量测定）

用 ATP 测定试剂盒荧光素/荧光素酶法测定淋巴结中 ATP 含量，以相对发光单位（RLU）表示生物发光。由于动物处死后其 ATP 含量随时间逐渐下降，因此每只动物从处死到 ATP 含量测定时间应保持一致，约 30min 内。每只动物从分离颌下淋巴结到 ATP 测定系列操作务必在 20min 内完成，且每只动物处理时间保持一致。每只动物测定 2 份 2mL 细胞样品，取其 ATP 发光均值用于后续计算。

7 数据处理

刺激指数（stimulation index, SI）为受试物组或阳性对照组 RLU 均值与溶剂对照组 RLU 均值比值，计算公式如下：

$$\text{刺激指数 (SI)} = \frac{\text{受试物组或阳性对照组RLU均值}}{\text{溶剂对照组RLU均值}}$$

EC1.8(estimated concentration needed to produce SI =1.8) 为 SI=1.8 时受试物的浓度。当受试物 3 个浓度分别为 SI > 1.8 和 SI < 1.8 时，计算公式如下：

$$EC1.8 = c + \left[\frac{(1.8 - d)}{(b - d)} \times (a - c) \right]$$

当受试物3个浓度均为SI≥1.8时，计算公式如下：

$$EC1.8_{ex} = 2^{\left\{ \log_2(c) + \frac{(1.8-d)}{(b-d)} \times [\log_2(a) - \log_2(c)] \right\}}$$

注：a、c为相邻两点受试物的浓度，b、d为相应SI值。

数据应以表格形式显示每只小鼠的RLU值、每组的RLU均值与标准差、每个受试物各剂量组的平均SI值，计算每个受试物的EC1.8值并判定致敏强度。对所有数据应采用SPSS软件或其他适当合理的统计学方法进行评价。

8 结果判定

刺激指数SI≥1.8，受试物为致敏阳性。对于1.8≤SI≤2.5临界值是否判断为阳性，应结合考虑剂量-效应关系、统计显著性、系统毒性或皮肤刺激性、溶剂对照与阳性对照反应一致性、与已知致敏物的结构关系等。按表2对受试物进行致敏强度分级。

表2 皮肤致敏强度分级

EC1.8(%)值范围	致敏强度
EC1.8(%) < 0.1	极强
0.1 ≤ EC1.8(%) < 1	强
1 ≤ EC1.8(%) < 10	中
10 ≤ EC1.8(%) < 100	弱

9 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。