

附件 6

口腔黏膜刺激试验方法

Oral mucous irritation test

1 范围

本方法适用于评价牙膏对口腔黏膜组织潜在的刺激作用。

2 试验目的

确定和评价牙膏对动物口腔黏膜组织是否有刺激作用及其程度。

3 定义

口腔黏膜刺激 oral mucosa irritation

口腔黏膜组织接触受试物后所产生的水肿、炎性变化及组织损伤等反应。

4 试验的基本原则

将受试物置于受试动物的一侧颊囊内，对照物置于另一侧颊囊内，在规定的时间内多次接触，肉眼观察并记录动物颊囊接触部位的刺激程度，并于末次接触后 24 小时取材进行组织学评价。

5 试验方法

5.1 试样

5.1.1 受试物：受试物直接使用，单次放置量为 0.4 g 或 0.4 mL。

5.1.2 对照物：0.9%氯化钠注射液（生理盐水），用量同受试物，直接使用。

5.2 实验动物和饲养环境

5.2.1 健康的 SPF 级金黄地鼠（拉丁学名：Mesocricetus auratus），6~8 周龄。同一品系，雌雄不限，雌性动物应未孕。

5.2.2 至少使用 3 只动物。

5.2.3 试验前动物应在实验动物房环境内至少适应 3 天。实验动物及实验动物房应符合国家相关规定。选用标准配合饲料，饮水不限制。

5.3 试验步骤

5.3.1 动物准备与麻醉

用适当的麻醉剂麻醉动物，检查动物双侧颊囊有无异常（剔除颊囊黏膜异常的动物）。翻转动物颊囊用生理盐水或蒸馏水清洗干净后进行试验。

5.3.2 试样接触

5.3.2.1 将受试物置于动物一侧颊囊底部，对照物置于另一侧颊囊底部。试样与黏膜接触 5

min，接触时间结束后将颊囊翻出，去除试样，用生理盐水或蒸馏水清洗接触部位，清洗时间一般为 1 min~2 min，直至将试样完全清除。重复上述操作 4 次，每次操作间隔 1 h（含接触与清洗时间）。每次重复放置试样前肉眼检查颊囊，并记录异常情况。末次接触后的 24 h 肉眼观察颊囊并取与试样接触的颊囊组织进行组织学评价。

5.3.2.2 在 5.3.2.1 试验过程中，根据表 1 判定肉眼观察结果。在试验周期内的任意时间点，3 只动物中如有 1 只及以上出现重度水肿、红斑、糜烂或溃疡现象，可直接判定为重度口腔黏膜刺激反应，无需再进行组织学评价。

5.4 结果观察

5.4.1 临床观察

5.4.1.1 试验期间观察动物，记录异常表现，包括局部、全身及异常行为等。

5.4.1.2 肉眼观察试验部位，根据表 1 判定有无红斑、水肿、糜烂及溃疡等情况，并比较同一动物的试验侧颊囊和对照侧颊囊，记录每侧颊囊的状况，注意试验侧与对照侧的差异。

表 1 口腔黏膜临床观察评价表

临床表现	反应程度
红斑	
无红斑	无
极轻微红斑（勉强可见）	极轻
清晰红斑	轻度
中度红斑	中度
重度红斑（紫红色）至焦痂形成、糜烂、溃疡	重度
水肿	
无水肿	无
极轻微水肿（勉强可见）	极轻
清晰水肿（肿起边缘清晰）	轻度
中度水肿（肿起约 1 mm）	中度
重度水肿（肿起超过 1 mm，并超出接触区）	重度

5.4.2 组织学观察

5.4.2.1 组织切片制作

末次接触后 24 h，取试样接触部位的颊囊，10%中性福尔马林缓冲液固定，常规石蜡包埋，半连续切片，间隔取片 5 张，H-E 染色。

5.4.2.2 组织学观察及记分

对黏膜组织进行组织病理学观察，并根据口腔黏膜组织反应记分表（表 2）计算每只动物得分。其中白细胞浸润情况应至少在 20 倍物镜下选取 3~5 个有代表性的视野观察，每只动物的得分为所有观察视野的平均分。将试验组中所有动物的组织反应记分相加之和，再除

以试验动物总数，得出试验组平均记分，对照组同法计算。

表 2 口腔黏膜组织反应记分表

组织反应	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	
无	0
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
极少	1
轻度	2
中度	3
重度伴血管破裂	4
水肿	
无	0
极少	1
轻度	2
中度	3
重度	4

6 结果评价

6.1 临床观察评价

在试验周期内的任意时间点，3 只动物中如有 1 只及以上出现重度红斑、水肿、糜烂或溃疡现象，则可直接判定该受试物为重度口腔黏膜刺激反应，其它情况以下述组织学评价为准。

6.2 组织学评价

6.2.1 若 1 只动物对照侧颊囊组织学评价记分之和大于 9 时，则考虑认为是试验操作时造成

的损伤，有必要进行重复试验。

6.2.2 试验组平均记分减去对照组平均记分得出刺激指数，并根据表 3 对口腔黏膜组织反应程度进行分级。

表 3 口腔黏膜组织反应分级

刺激指数 (X)	反应程度
0	无
$0 < X \leq 4$	极轻
$4 < X \leq 8$	轻度
$8 < X \leq 11$	中度
$11 < X \leq 16$	重度

7 结果判定

根据临床观察评价进行结果判定，临床观察为重度口腔黏膜刺激反应是不可接受的（见 6.1）；依据 6.2.2 口腔黏膜组织反应分级，认为中度、重度口腔黏膜刺激反应是不可接受的。

8 试验结果的解释

本结果通过评估受试物对口腔黏膜的刺激性的，旨在为理解其对人体的潜在影响提供了初步数据。鉴于动物与人类生理反应的差异，试验结果外推到人的可靠性有限，必要时建议在适当情况下进行临床验证。