

指导原则编号：

【	H	】	G	P	T	4	-	1
---	---	---	---	---	---	---	---	---

# 化学药物刺激性、过敏性和溶血性 研究技术指导原则

二〇〇五年三月

# 目 录

一、概述.....	1
二、总则.....	1
（一）刺激性试验.....	2
1、目的.....	2
2、刺激性试验设计中应考虑的问题.....	3
3、皮肤刺激性试验.....	4
4、注射给药部位的刺激性试验.....	4
5、眼刺激性试验.....	5
6、其他途径给药部位刺激性试验.....	5
（二）过敏性试验.....	5
1、目的.....	5
2、过敏性试验设计中应考虑的问题.....	6
3、经皮给药过敏性试验.....	7
4、注射给药过敏性试验.....	7
5、其他途径给药过敏性试验.....	7
6、试验方法.....	7
（三）溶血性试验.....	7
1、目的.....	7
2、适用范围.....	8
3、溶血性试验设计中应考虑的问题.....	8
4、试验方法.....	8
（四）试验报告.....	8
（五）结果评价.....	8
（六）关注的几个问题.....	9

三、参考文献.....	9
四、附录.....	10
1、刺激性试验方法.....	10
2、过敏性试验方法.....	18
3、溶血性试验方法.....	25
五、著者.....	27

# 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则

## 一、概述

化学药物刺激性、过敏性和溶血性是指化学药物制剂经眼、耳、鼻、口腔、呼吸道、关节腔、皮肤、直肠、阴道、静脉、动脉、肌肉、皮下、静脉旁和鞘内等非口服途径给药，对用药局部产生的毒性（如刺激性和过敏性等）和/或对全身产生的毒性（如过敏性和溶血性等）。它是临床前安全性评价的组成部分。

药物的活性成分及其代谢物、辅料、有关物质及理化性质（如 pH 值、渗透压等）均有可能引起刺激性和/或过敏性和/或溶血性的发生，因此药物在临床应用前应研究其制剂在给药部位使用后引起的局部和/或全身毒性，以提示临床应用时可能出现的毒性反应、毒性靶器官、安全范围、临床研究监测指标并为临床解毒或解救措施提供参考，保障临床用药的安全、有效。

本指导原则适用于化学药物，主要内容包括化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究和评价的总体原则、一般原则和常用试验方法。

## 二、总则

根据《药品注册管理办法》（试行）的规定，化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究必须执行《药物非临床研究质量管理规范》（GLP）。

试验设计应遵循随机、对照、重复的原则。

化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究试验设计应结合毒性的发生机制、影响因素、临床意义和药物临床应用的适应症和给药方法来考虑。

动物种属的选择应依据拟采用的试验模型和观察的指标。动物的性别、年龄和生理状态应符合拟采用试验动物模型的要求。受试物应与临床应用制剂一致。给药方案应根据所采用的试验模型和拟定的临床应用情况来决定。观察部位除给药部位外，同时应考虑周围组织或可能暴露于受试物的部位。

如果受试物与拟进行临床研究的制剂相同或具有可比性，其他非临床安全性（如长期毒性）研究结果可充分反映受试物的刺激性、过敏性和溶血性中的某一毒性时，则可不单独进行相应的毒性研究。

化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究时应采用与临床应用制剂一致，符合临床用质量标准规定的受试物，并注明其名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等，其中辅料和杂质等的名称和量应尽可能明确，并附有研制单位的自检报告。所用辅料、溶剂等应标明批号、规格和生产厂家，并符合试验要求。

进行研究时应采用合理的方法和手段，以避免假阴性或假阳性试验结果的出现。

受试物的刺激性和/或过敏性和/或溶血性研究提示有一定毒性时，应与上市的相同给药途径制剂进行比较研究，比较研究的样本例数的确定应遵循统计学的基本原理。

评价受试物的刺激性、过敏性和溶血性时，应结合药学、药理、毒理及临床应用进行综合考虑，明确受试物是否能进行临床试验及临床应用时应关注的问题等。

## （一）刺激性试验

### 1、目的

刺激性是指非口服给药制剂给药后对给药部位产生的可逆性炎症反应，若给药部位产生了不可逆性的组织损伤则称为腐蚀性。刺激性试验是观察动物的血管、肌肉、皮肤、粘膜等部位接触受试物后是否引起红肿、充血、渗出、变性或坏死等局部反应。

## 2、刺激性试验设计中应考虑的问题

### 2.1 实验动物的选择

依据拟采用的试验模型和观察指标选择试验动物，一般每个试验选择一种动物进行评价。

### 2.2 给药的频率与期限

给药频率和期限应依据拟定临床应用的情况来决定。重复给药的制剂，一般每天给药一次，给药期限最长不超过 4 周。单次给药的制剂可用单次给药的方法进行试验。

### 2.3 可逆性观察

为明确毒性反应的性质，建议进行停药后恢复期的观察。局部毒性反应的可逆性评价应包括局部及相关部位的反应。

### 2.4 受试物

受试物应与临床应用制剂一致。

### 2.5 对照组

以溶媒和/或赋形剂作为阴性对照。必要时采用已上市制剂作对照。

### 2.6 剂量

剂量设计主要应该考虑受试物浓度和总剂量。一般采用与临床制剂相同浓度，设一个剂量组，可以通过改变给药频率进行剂量的调整，必要时

应该进行不同浓度的刺激性试验。对于皮肤刺激性试验，在给药面积不变的情况下，不应通过增加厚度来满足增加给药量的目的。

## 2.7 给药方案

给药方案原则上应与临床用药方案一致，但设计给药容积、速率和频率时，应考虑所选用动物模型给药部位的解剖和生理特点。

## 2.8 统计处理

根据实验模型和试验方法选择合适的统计方法。

# 3、皮肤刺激性试验

3.1 经皮给药制剂及可能接触皮肤的非口服给药制剂应考虑进行皮肤刺激性试验。

3.2 在急性毒性试验、长期毒性试验或皮肤过敏性试验中已经评价过皮肤刺激性，其受试物与拟进行临床研究的制剂相同或具有可比性，可不必进行单独的皮肤刺激性试验。

## 3.3 试验方法

参见附录中刺激性试验常用方法和相关文献。

# 4、注射给药部位的刺激性试验

4.1 注射剂应考虑进行注射给药部位刺激性试验。

4.2 在急性毒性试验、长期毒性试验中已经评价过注射给药部位刺激性，其受试物与拟进行临床研究的制剂相同或具有可比性，可不必进行单独的注射给药部位刺激性试验。

## 4.3 试验方法

参见附录中刺激性试验常用方法和相关文献。

## 5、眼刺激性试验

5.1 眼用药物及可能接触眼睛的受试物均应考虑进行眼刺激性试验。

5.2 在急性毒性试验、长期毒性试验中已经评价过眼刺激性，其受试物与拟进行临床研究的制剂相同或具有可比性，可不必进行单独的眼刺激性试验。

5.3 试验方法

参见附录中刺激性试验常用方法和相关文献。

## 6、其他途径给药部位刺激性试验

可在总则和刺激性试验设计中应考虑的问题的指导下参考皮肤、注射给药部位和眼刺激性试验进行。

### (二) 过敏性试验

#### 1、目的

过敏性又称超敏反应，指机体受同一抗原再刺激后产生的一种表现为组织损伤或生理功能紊乱的特异性免疫反应，是异常或病理性免疫反应。其分类采用目前普遍接受的分类法：I型又称快发或速发过敏型，由IgE介导，主要表现为荨麻疹、过敏性休克、支气管哮喘、变应性鼻炎、胃肠道与皮肤过敏反应等；II型又称细胞毒型或溶细胞型，由IgG介导，主要表现为库姆斯试验阳性的溶血性贫血，粒细胞减少和血小板减少性紫癜；III型又称免疫复合物型或血管炎型，由IgG、IgM介导，主要表现为局限性肺炎、血管炎、狼疮样反应、肾小球肾炎等；IV型又称迟发型或结核菌素型，由T淋巴细胞介导，主要表现为接触性皮炎。

光敏性包括光毒性（光刺激性）和光过敏性（光变态反应）两类，光

毒性是由光诱导的非免疫性的皮肤对光的反应，药物可通过直接作用或通过血循环间接作用。光过敏性是获得性的免疫性介导的由光激活的皮肤对光的反应，系光感物质经皮吸收或通过循环到达皮肤后与吸收的光线在表皮细胞层发生的反应，为IV型过敏反应的特殊类型。过敏性试验是观察动物接触受试物后是否产生全身或局部过敏反应。

## 2、过敏性试验设计中应考虑的问题

2.1 进行何种过敏性研究应根据药物自身特点（如化学结构等）、其他药理毒理的实验结果，特别是长期毒性试验的结果、临床适应症及给药方式等确定。

2.2 具体试验方法的选择应根据给药途径，以及需考察的过敏性可能的发生机制确定，并应阐明合理性。如经皮给药需考虑做豚鼠最大化试验（Guinea-Pig Maximization Test, GPMT）、Buehler 试验（BT）；注射给药需考虑做全身主动过敏试验（ASA）和皮肤被动过敏试验（PCA）；吸入给药需考虑做豚鼠吸入诱导和刺激试验。

2.3 剂量设计应合理，建议选择多个剂量以①进行剂量与过敏反应的数量效关系研究，争取找出无过敏反应的剂量；②避免因剂量过低而导致假阴性结果的出现；③帮助判断阳性结果是否因强刺激反应引起。应设立阳性和阴性对照组。

2.4 由于实验动物模型的局限性，如目前仍无理想的II和III型过敏反应的动物模型；光过敏性动物模型的临床意义尚不明确等，因此一些药物的过敏性临床前评价可采取灵活的方式，但应有充分的理由，并应在医师使用手册和说明书中详细描述其可能的毒性，临床研究时进行相应的考察。

2.5 统计处理：根据实验模型和试验方法选择合适的统计方法。

### 3、经皮给药过敏性试验

应考察皮肤过敏性反应，通常采用 BT 或 GPMT 或其他合理的试验方法。若受试物的化学结构与文献报道产生其他过敏反应的化合物相同或相似者，尚应考虑采取适当的试验方法以考察其是否能引起其他过敏反应（如全身过敏性反应等）。

### 4、注射给药过敏性试验

通常采用 ASA 和 PCA 或其他合理的方法考察全身过敏性反应，采用其他方法应阐明合理性。若受试物的化学结构与文献报道产生其他过敏性反应的化合物相同或相似者，尚应考虑采取适当的试验方法以考察其是否能引起其他过敏性反应（如皮肤过敏性反应等）。

### 5、其他途径给药过敏性试验

吸入途径药物应采用豚鼠吸入诱导和刺激试验。粘膜给药应结合受试物的自身特点参照经皮给药过敏性试验方法进行。若受试物的化学结构与文献报道产生其他过敏反应的化合物相同或相似者尚应考虑采取适当的试验方法以考察其是否能引起其他过敏反应（如光过敏性反应等）。

## 6、试验方法

参见附录中过敏性试验常用方法和相关文献。

### （三）溶血性试验

#### 1、目的

溶血性是指药物制剂引起的溶血和红细胞凝聚等反应。溶血性反应包括免疫性溶血与非免疫性溶血。免疫性溶血是药物通过免疫反应产生抗体

而引起的溶血，为Ⅱ型和Ⅲ型过敏反应；非免疫性溶血包括药物为诱发因素导致的氧化性溶血和药物制剂引起血液稳态的改变而出现的溶血和红细胞凝聚等。溶血性试验是观察受试物是否能够引起溶血和红细胞凝聚等反应。

## 2、适用范围

凡是注射剂和可能引起免疫性溶血或非免疫性溶血反应的其他药物制剂均应进行溶血性试验。

## 3、溶血性试验设计中应考虑的问题

3.1 溶血反应发生机制复杂，目前尚无标准的临床前体内试验方法以全面评价药物制剂的溶血反应，因此推荐未有相同给药途径上市制剂在长期毒性研究中兼顾考察制剂的溶血性。试验时应注意观察溶血反应的有关指标及体征（如网织红细胞、红细胞数、胆红素、尿蛋白、肾炎和脾脏淤血等），如出现溶血时，应进行进一步研究。

3.2 对于已有相同给药途径上市注射剂常可采用常规体外试管法评价药物的溶血性，若体外试管法试验结果为阳性，建议与相同给药途径上市制剂进行比较性研究，必要时进行动物体内试验。

## 4、试验方法

参见附录中溶血性试验常用方法和相关文献。

### （四）试验报告

试验报告应根据 GLP 的要求进行撰写。

### （五）结果评价

说明方法、受试物和动物选用的合理性并分析其对实验结果的可能影

响。

正确分析实验结果并理解实验结果的意义，判断毒性反应和毒性作用靶器官。

分析毒性试验的完整性，判断该毒性研究是否能较全面地反映药物给药后产生的毒性，并分析引起毒性作用的可能原因。

结合药学、药理、毒理及临床应用进行综合评价，明确药物是否能进入临床试验及临床应用时应关注的问题等。

## （六）关注的几个问题

对于化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究，有以下几个方面值得关注。

### 1、应体现整体性、综合性的原则

实际工作中应根据受试物自身特点，结合其药学、药理、毒理和临床研究工作进行刺激性、过敏性和溶血性研究和评价。

### 2、具体情况具体分析

目前已有试验方法仍存在一定的局限性，因此可采用本文推荐以外的其他方法以提供更有价值的试验结果，提高刺激性、过敏性和溶血性研究预测的灵敏性和准确性。但采用其他方法时应阐明其合理性并说明具体方法及操作流程。

## 三、参考文献

1、FDA Guidance for Industry Skin irritation and sensitization testing of generic transdermal drug products

2、FDA Guidance for Industry Photosafety testing

3、FDA Guidance for Industry Immunotoxicology evaluation of investigation new drug

4、EPA Health effects test guidelines OPPTS 870.7800 Immunotoxicity

5、EPA Health effects test guidelines OPPTS 870.2500 Acute dermal irritation

6、EPA Health effects test guidelines OPPTS 870.2600 Skin sensitization

7、OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No 406, July 1992)

8、EPA Health effects test guidelines OPPTS 870.2400 Acute eye irritation

9、EMA Non-clinical local tolerance testing of medicinal products

10、ISO 10993-10:2002(E) Biological evaluation of medical devices- Part 10- Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity

11、日本厚生省日本新药毒性试验指导原则 1989 版

12、中华人民共和国卫生部药政局 新药（西药）临床及临床前研究指导原则汇编

13、徐叔云 卞如濂 陈修 药理实验方法学

14、陈奇 中药药理研究方法学

#### 四、附录

本附录中收录的试验方法仅供参考，研究者应根据所研究药物的自身特点采用国内外公认的科学合理的试验方法，而并不仅限于附录中所收录的试验方法。

##### （一）刺激性试验方法

##### 1、皮肤刺激性试验

###### 1.1 实验动物

首选家兔，每组动物数 4—8 只，一般雌、雄各半，也可选用其他种属的动物（如小型猪等），选择家兔和小型猪以外的动物应阐明合理性。应设赋形剂对照，采用自体左右侧自身对比法。试验前 24 小时对给药区（通常在背部）进行脱毛处理（可剪、剃或用适宜的脱毛剂）。去毛范围左、右各 3 cm×3 cm。给药前应检查去毛皮肤是否因去毛而受损伤，有损伤的皮肤不宜进行试验。进行破损皮肤的刺激性研究时，在用药部位用砂纸磨或划“井”字并以渗血为度。

### 1.2 给药方法

取受试物 0.5 ml 直接涂布于一侧已去毛的皮肤上，然后用二层纱布（2.5 cm×2.5 cm）和一层玻璃纸或类似物覆盖，再用无刺激性胶布和绷带加以固定；另一侧涂布赋形剂作对照。贴敷时间至少 4 小时。贴敷结束后，除去受试物并用温水或无刺激性溶剂清洁给药部位。多次给药皮肤刺激性试验应连续在同一部位给药，每次给药时间相同，贴敷期限一般不超过 4 周。

### 1.3 结果观察

在自然光线或全光谱灯光下观察皮肤反应。按表 1 给出的评分标准对皮肤红斑和水肿进行评分。

单次给药皮肤刺激性试验，在去除药物后 30-60 分钟，24、48 和 72 小时肉眼观察并记录涂敷部位有无红斑和水肿等情况。如存在持久性损伤，有必要延长观察期限以评价上述变化的恢复情况和时间。但延长期一般不超过 14 天。对出现中度及以上皮肤刺激性的动物应在观察期结束时对给药局部进行组织病理学检查。

多次给药皮肤刺激性试验，在每次去除药物后 1 小时以及再次贴敷前

观察及记录红斑及水肿、涂敷部位是否有色素沉着、出血点、皮肤粗糙或皮肤菲薄情况及其发生时间及消退时间，并对红斑及水肿进行评分。末次贴敷后，在去除药物后 30-60 分钟，24、48 和 72 小时肉眼观察并记录涂敷部位有无红斑和水肿等情况。如存在持久性损伤，有必要延长观察期限以评价上述变化的恢复情况和时间。但延长期一般不超过 14 天。对出现中度及以上皮肤刺激性的动物应在观察期结束时对给药局部进行组织病理学检查。

#### 1.4 结果评价

单次给药皮肤刺激性试验，计算每一观察时间点各组受试物及赋形剂皮肤反应积分的平均分值，按表 2 进行刺激强度评价。多次给药皮肤刺激性试验，首先计算每一观察时间点各组积分均值，然后计算观察期限内每天每只动物积分均值，按表 2 进行刺激强度评价。

表 1.皮肤刺激反应评分标准

刺激反应	分值
<b>红斑</b>	
无红斑	0
轻度红斑（勉强可见）	1
中度红斑（明显可见）	2
重度红斑	3
紫红色红斑到轻度焦痂形成	4
<b>水肿</b>	
无水肿	0
轻度水肿（勉强可见）	1
中度水肿（明显隆起）	2
重度水肿（皮肤隆起 1mm，轮廓清楚）	3
严重水肿（皮肤隆起 1mm 以上并有扩大）	4
<b>最高总分值</b>	<b>8</b>

表 2.皮肤刺激强度评价标准

分值	评价
0-0.49	无刺激性
0.5-2.99	轻度刺激性
3.0-5.99	中度刺激性
6.0-8.0	强刺激性

## 2、注射给药部位刺激性试验

### 2.1 实验动物

首选家兔，每组动物数不少于 3 只。应设生理盐水对照，可采用同体左右侧自身对比法。用药部位根据药物的给药途径确定，可选用耳缘静脉，耳中心动脉（其它动物可选用前、后肢静脉及股动脉等），股和背部肌肉，侧胸壁皮下组织，静脉旁组织等。

### 2.2 给药方法

为最大可能地暴露毒性，应根据受试物的特点采用最可能暴露毒性的给药方法。一般而言按临床给药方案给予受试物，给药容积和速率应根据动物情况进行相应的调整。给药期限应根据受试物拟用于临床应用的情况来决定，多次给药一般不超过 7 天。

### 2.3 结果观察

应根据受试物的特点和刺激性反应情况来选择适当的观察时间。通常单次给药刺激性试验，在给药后 48-96 小时对动物和注射部位进行肉眼观察；多次给药刺激性试验，每天给药前以及最后一次给药后 48-96 小时对动物和注射部位进行肉眼观察。观察期结束时应对部分动物进行给药部位组织病理学检查。留下的动物根据受试物的特点和刺激性反应情况，继续观察 14—21 天再进行组织病理学检查，以了解刺激性反应的可逆程度。

## 2.4 结果评价

根据肉眼观察和组织病理学检查的结果进行综合判断。

# 3、眼刺激性试验

## 3.1 实验动物

首选家兔，每组动物数不少于 3 只。应设置生理盐水对照组，可采用同体左右侧自身对比法。试验前 24 小时内对每只动物的双眼进行检查（包括使用荧光素钠检查）。有眼睛刺激症状、角膜缺陷和结膜损伤的动物不能用于试验。

## 3.2 给药方法

每只眼睛滴入 0.05-0.1ml 或涂敷 0.1g 受试物，然后轻合眼睑约 10 秒。一般不需冲洗眼睛。给药期限应根据受试物拟用于临床的情况来决定，多次给药时每天给受试物的次数应与临床用药频率相同，连续给受试物 2-4 周，一般不超过 4 周。

## 3.3 结果观察

应根据受试物的特点和刺激性反应情况来选择适当的观察时间。通常单次给药眼刺激试验，在给药后 1、2、4、24、48 和 72 小时对眼部进行检查，也可根据受试物的特点适当调整观察时间；多次给药眼刺激试验，每天给药前以及最后一次给药后 1、2、4、24、48 和 72 小时对眼部进行检查，也可根据受试物的特点适当调整观察时间。如果在 72 小时未见任何刺激症状，试验则可结束。如存在持久性损伤，有必要延长观察期限，但一般不超过 21 天。

一般采用裂隙灯（或手持裂隙灯）进行眼刺激反应检查，也可根据刺

激性反应情况采用其他的合适器械（如放大镜、生物显微镜等）。在整个观察过程中应进行荧光素染色检查。每次检查，都应记录眼部反应的分值（见表 3）。除了观察所列出的结膜、角膜和虹膜损伤外，其他所观察到的损伤也应记录和报告。

### 3.4 结果评价

按表 3 的要求，将每一个观察时间每一动物的眼角膜、虹膜和结膜的刺激反应分值相加得总积分，将一组的积分总和除以动物数，即得最后分值。按表 4 判断其刺激程度。

表 3 眼刺激反应分值标准

眼刺激反应	分值
<b>角膜</b>	
无混浊	0
散在或弥漫性混浊，虹膜清晰可见	1
半透明区易分辨，虹膜模糊不清	2
出现灰白色半透明区，虹膜细节不清，瞳孔大小勉强可见	3
角膜不透明，虹膜无法辨认	4
<b>虹膜</b>	
正常	0
皱褶明显加深、充血、肿胀，角膜周围轻度充血，瞳孔对光仍有反应	1
出血/肉眼可见坏死/对光无反应（或其中一种）	2
<b>结膜</b>	
<b>充血（指睑结膜和球结膜）</b>	
血管正常	0
血管充血呈鲜红色	1
血管充血呈深红色，血管不易分辨	2
弥漫性充血呈紫红色	3
<b>水肿</b>	
无水肿	0
轻微水肿（含眼睑）	1
明显水肿伴部分眼睑外翻	2

眼刺激反应	分值
水肿至眼睑近半闭合	3
水肿至眼睑超过半闭合	4
<b>分泌物</b>	
无分泌物	0
少量分泌物	1
分泌物使眼睑和睫毛潮湿或粘着	2
分泌物使整个眼区潮湿或粘着	3
<b>最大总积分</b>	<b>16</b>

表 4 眼刺激性评价标准

分值	评价
0-3	无刺激性
4-8	轻度刺激性
9-12	中度刺激性
13-16	强度刺激性

#### 4、皮肤光毒性试验

光毒性反应是指药物吸收的紫外光能量在皮肤中释放导致皮肤损伤的作用，即皮肤或全身接触或应用化学物质后，继而暴露于紫外线照射下所引起的一种皮肤毒性反应。光毒性反应是光敏反应中最常见的一种反应。具有剂量依赖性，其临床表现与晒伤相似，表现为红斑、水肿、皮肤瘙痒和色素沉着。严重者可产生局部坏死、溃烂或表皮脱落。

##### 4.1 实验动物

成年白色豚鼠，雌雄各半。

##### 4.2 试验分组

应设阴性、阳性对照组和受试物不同剂量组。阴性对照组应给予赋形剂或溶媒，阳性对照组给予 8-甲氧基补骨脂素，受试物低剂量组给予临床用药浓度，高剂量组给予不引起皮肤刺激反应的浓度。正式试验的每组动物数至少 6 只。

### 4.3 UV 光源

4.3.1 UV光源：波长为 320-400nm的UVA，如含有UVB，其剂量不得超过  $0.1\text{J}/\text{cm}^2$ 。

4.3.2 强度的测定：用前需用辐射计量仪在实验动物背部照射区设 6 个点测定光强度 ( $\text{mw}/\text{cm}^2$ )，以平均值计。

4.3.3 照射时间的计算：照射剂量为  $10\text{J}/\text{cm}^2$ ，按下式计算照射时间。

照射时间 (秒) = 照射剂量 ( $10000\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) / 光强度 ( $\text{mJ}/\text{cm}^2 \cdot \text{sec}$ )

说明：  $1 \text{mw}/\text{cm}^2 = 1 \text{mJ}/\text{cm}^2 \cdot \text{sec}$

### 4.4 试验步骤

4.4.1 进行正式光毒试验前 18-24 小时，将动物脊柱两侧皮肤去毛，试验部位皮肤需完好，无损伤及异常。备四块去毛区，每块去毛面积约为  $2\text{cm} \times 2\text{cm}$ 。

4.4.2 将动物固定，按表 5 所示，在动物去毛区 1 和 2 涂敷 0.2 ml (g) 受试物或阳性对照药，3 和 4 涂敷同体积 (量) 的赋形剂或溶媒。给药 30 分钟后，左侧用铝箔覆盖，胶带固定，右侧用 UVA 进行照射。

4.4.3 结束后分别于 1、24、48 和 72h 观察皮肤反应，根据表 6 判定每只动物皮肤反应评分。

表 5 动物去毛区的试验安排

去毛区编号	试验处理
1 (左上区)	涂受试物或阳性对照药，不照射
2 (右上区)	涂受试物或阳性对照药，照射
3 (左下区)	涂赋形剂或溶媒，不照射
4 (右下区)	涂赋形剂或溶媒，照射

表 6 皮肤反应的评分标准

红斑和焦痂形成	分值	水肿形成	分值
无红斑	0	无水肿	0
非常轻的红斑，勉强可见	1	非常轻度水肿，勉强可见	1
明显的红斑	2	轻度水肿（边缘清晰）	2
中度至重度的红斑	3	中度水肿（皮肤隆起约 1mm）	3
重度红斑（鲜红色）至轻度焦痂形成（深层损伤）	4	重度水肿（皮肤隆起大于 1mm，并超过涂受试物的区域）	4

#### 4.5 结果评价

单纯涂受试物而未经照射区域未出现皮肤反应，而涂受试物后经照射的区域出现皮肤反应分值得之和为 2 或 2 以上的动物数为 1 只或 1 只以上时，判为受试物具有光毒性。

## （二）过敏性试验方法

### 1、被动皮肤过敏试验（PCA）

将致敏动物的血清（内含丰富的 IgE 抗体）皮内注射于正常动物。IgE 与皮肤肥大细胞的特异受体结合，使之被动致敏。当致敏抗原激发时，引起局部肥大细胞释放过敏介质，从而使局部血管的通透性增加，注入染料可渗出于皮丘，形成蓝斑。根据蓝斑范围判定过敏反应程度。

#### 1.1 实验动物

PCA 反应常用的动物是大鼠，亦用小鼠，有时根据试验需要用豚鼠，选择动物时应考虑 IgE 的出现时间。

#### 1.2 试验分组

应设立阴性、阳性对照组和受试物不同剂量组。阴性对照组应给予同体积的溶媒，阳性对照组给予 1-5mg/只牛血清白蛋白或卵白蛋白或已知致

敏阳性物质，受试物低剂量组给予临床最大剂量（/kg或m<sup>2</sup>），受试物高剂量组给予低剂量的数倍量。每组动物数至少 6 只。

### 1.3 致敏

#### 1.3.1 抗体的制备

选择容易产生抗体的给药方法，如静脉、腹腔或皮下注射等，隔日一次，共 3-5 次。末次致敏后 10-14 天左右采血，2000 转/分离心 10 分钟，分离血清，-20℃ 保存，2 周内备用。

#### 1.3.2 被动致敏

上述各组抗血清应根据反应特点决定稀释倍数，一般用生理盐水稀释成 1: 2、1: 4、1: 8、1: 16 或 1: 32 等。在动物背部预先脱毛 3×4cm<sup>2</sup> 的皮内注射各对应组的抗血清 0.1mL，进行被动致敏。

### 1.4 激发

被动致敏 24 或 48 小时后，各组静脉注射与致敏剂量相同的激发抗原加等量的 0.5-1%伊文思兰染料共 1mL，进行激发。由于不同种属动物接受含 IgE 抗体血清后，至能够应答抗原攻击产生过敏反应的时间不同，因此需注意激发时间选择的合理性。

### 1.5 结果测定

30 分钟后麻醉处死各组动物，剪取背部皮肤，测量皮肤内层的斑点大小，直径大于 5mm 者判定为阳性。不规则斑点的直径为长径与短径之和的一半。

## 2、全身主动过敏试验（ASA）

对致敏成立的动物体内，静脉注射抗原，观察抗原与 IgE 抗体结

合后导致肥大细胞、嗜碱性细胞脱颗粒、释放活性介质而致的全身性过敏反应。

## 2.1 实验动物

通常选用体重为 300-400 克的豚鼠。

## 2.2 试验分组

应设立阴性、阳性对照组和受试物不同剂量组。阴性对照组应给予同体积的溶媒，阳性对照组给予 1-5mg/只牛血清白蛋白或卵白蛋白或已知致敏阳性物质，受试物低剂量组给予临床最大剂量（/kg或m<sup>2</sup>），受试物高剂量组给予低剂量的数倍量。每组动物数至少 6 只。

## 2.3 致敏

选择容易产生抗体的给药方法，如静脉、腹腔或皮下注射等，隔日一次，共 3-5 次。

## 2.4 激发

2.4.1 激发途径：一次快速静脉内给药。

2.4.2 激发次数：末次注射后第 10-14 日一次激发。

2.4.3 激发剂量：一般为致敏剂量的 2-5 倍量，给药容积 1-2ml。

## 2.5 观察指标

2.5.1 致敏期间：每日观察每只动物的症状。初次，最后一次致敏和激发当日测定每组每只动物的体重。

2.5.2 激发：静脉注射后立刻至 30 分钟，按表 7 症状仔细观察每只动物的反应，症状的出现及消失时间。最长观察 3 小时。

## 2.6 结果评价

可按表 8 判断过敏反应发生程度。计算过敏反应发生率。根据过敏反应发生率和发生程度进行综合判断。

激发注射后，若发现有过敏反应症状时，可取健康未致敏豚鼠 2 只，自静脉注射激发剂量的受试物，观察有无由于受试物作用引起的类似过敏反应症状，以供结果判断时参考。

表 7 过敏反应症状

0 正常	7 呼吸急促	14 步态不稳
1 躁动	8 排尿	15 跳跃
2 竖毛	9 排粪	16 喘息
3 颤抖	10 流泪	17 痉挛
4 搔鼻	11 呼吸困难	18 旋转
5 喷嚏	12 哮鸣音	19 潮式呼吸
6 咳嗽	13 紫癜	20 死亡

表 8 全身致敏性评价标准

0	-	过敏反应阴性
1-4 症状	+	过敏反应弱阳性
5-10 症状	++	过敏反应阳性
11-19 症状	+++	过敏反应强阳性
20	++++	过敏反应极强阳性

### 3、豚鼠最大化试验（GPMT）和 Buehler 试验（BT）

试验动物皮内或涂皮给予诱导剂量，经过 10—14 天的诱导期，此时免疫反应发生，然后给予激发剂量，以观察是否出现了过敏反应。在诱导期和攻击期的皮肤反应及其程度均应进行对比，并与赋形剂组进行比较。

#### 3.1 实验动物

选择成年豚鼠，雌雄不拘。受试物组不少于 20 只、对照组不少于 10 只。

#### 3.2 对照

应设立阴性对照组和阳性对照组。推荐的阳性对照物有巯基苯并噻唑，苯佐卡因，二硝基氯苯，331 环氧树脂等，也可以使用其它的阳性对照物，但轻—中度的致敏剂在加佐剂的试验中至少 30%和不加佐剂试验中至少 15%应有反应。

### 3.3 剂量

取决于所选择的方法。在 Buehler 试验中，致敏剂量应当足够高，以产生轻微的刺激性，激发剂量为不产生刺激性的最高剂量。在 GPMT 试验中，致敏剂量应足够高，以产生轻—中度的皮肤刺激性且能很好地全身耐受，激发剂量为不产生刺激性的最高剂量。

### 3.4 试验步骤

3.4.1 Buehler 试验在第 0，6-8 和 13-15 天用封闭片局部给药以诱导，在第 27-28 天在未给药的肋腹部贴 6 小时以局部激发。去除封闭片 24 和 48 小时后读取结果。如果结果难以判定，一周后再次激发，可采用原来的对照组或新的对照组。可采用剪、刮或脱毛的手段去除给药部位的毛发。采用水或适当溶剂去除受试物，以不改变已经存在的皮肤反应和表皮的完整性为宜。

3.4.2 GMPT 试验采用皮内注射给药，加和不加佐剂进行诱导，5—8 天后再局部诱导，第 20—22 天给予激发剂量 24 小时，在去除激发剂量 24 和 48 小时后读取结果。同 Buehler 试验一样，如果结果难以判定，一周后再次激发。

### 3.5 观察指标

3.5.1 一般在致敏后 1 和 24 小时及激发后 24 和 48 小时观察皮肤红斑、

水肿和其他异常反应，按表 9 对红斑和水肿进行评分。可根据毒性反应情况适当调整观察时间。

3.5.2 测定开始和结束时的动物体重。

### 3.6 结果评价

计算过敏反应发生率。根据表 10 判断过敏反应发生程度。

表 9.皮肤过敏反应评分标准

皮肤反应强度	分值
<b>红斑</b>	
无红斑	0
轻微可见红斑	1
中度红斑	2
严重红斑	3
水肿性红斑	4
<b>水肿</b>	
无水肿	0
轻度水肿	1
中度水肿	2
严重水肿	3
<b>总分值</b>	7

表 10.皮肤过敏性评价标准

过敏反应发生率 (%)	分级	过敏反应强度
0-8	I	弱致敏
9-28	II	轻度致敏
29-64	III	中度致敏
65-80	IV	强致敏
81-100	V	极强致敏

\*当过敏反应发生率为 0 时，可判为未见皮肤过敏反应。

## 4、皮肤光过敏性试验

光过敏性系药物吸收光能后成激活状态，并以半抗原形式与皮肤中的蛋白结合成为药物-蛋白质结合物（全抗原），经表皮的郎格罕氏细胞传递

给免疫活性细胞，引起过敏反应的作用。光过敏性属 IV 型迟发型过敏反应。其发生时间相对较长，且有一定的潜伏期。通常 5~10 天的连续用药和光照射可诱导免疫系统产生光过敏反应。再次给药时，药物和光照作用 24~48 小时之内即会有光过敏性反应发生。

#### 4.1 实验动物

原则上使用健康白色豚鼠，每组不少于 5 只。

#### 4.2 试验分组

应设阳性对照药组、阴性对照组和受试物组。

#### 4.3 试验方法

4.3.1 Adjuvant and Strip 本法是先皮内注射 FCA，用透明胶带擦伤皮肤角质层，涂敷受试物，照射紫外线，以上操作反复 5 次进行致敏，2 周后再次涂敷受试物，照射紫外线激发。

4.3.2 Harber 涂敷受试物，照射紫外线，此操作隔日进行一次共 3 次致敏。3 周后再次涂敷受试物的稀释液，30 分钟后照射紫外线激发。

4.3.3 Horio 涂敷 20% 的月桂醇硫酸钠，再涂敷受试物，立即照射紫外线，此操作每日一次共 3 次致敏。14 天后再次涂敷受试物，照射紫外线激发。

4.3.4 Jordan 本法是用尼龙刷子损伤皮肤后，涂敷受试物，1 小时后照射紫外线，此操作每周 5 次，连续 3 周进行致敏，2 周后再涂敷受试物，6 小时后照射紫外线，此操作连续 2 日进行激发。

4.3.5 Maurer 涂敷受试物，1 小时后照射紫外线及可见光线进行致敏。6 周和 9 周后，各 3 日连续涂敷受试物，30 分钟后照射紫外线进行激发。

4.3.6 Morikawa 本法是 Harber 改良法，涂敷受试物，30 分钟后照射紫外线，本操作每周连续 5 天，共 2 周进行致敏，致敏 2 周后，涂敷受试物，30 分钟后照射紫外线进行激发。

4.3.7 Vinson 涂敷受试物，照射紫外线，本操作每日一次，连续 5 次进行致敏，7-10 天后，再次涂敷受试物，照射紫外线进行激发。

#### 4.4 结果评价

皮肤光敏性试验是根据比较对照组和给药组的反应进行评价的。在分析结果时，必须遵守各试验方法所记载的判定标准，对受试物的皮肤光敏性反应进行评价。阳性结果时，应追加试验，如：与已知阳性物质的比较试验及用其他方法（不加佐剂）进行试验，其中非损伤性试验方法，有利于光敏性反应评价。另外，光敏性是光毒性和光过敏性两类混合难分的反应。必要时，应追加光毒性试验。

### （三）溶血性试验方法

#### 1、常规的体外试管法（肉眼观察法）

##### 1.1 血细胞悬液的配制

取兔血（或羊血）数毫升，放入含玻璃珠的三角烧瓶中振摇 10 分钟，或用玻璃棒搅动血液，除去纤维蛋白原，使成脱纤血液。加入 0.9%氯化钠溶液约 10 倍量，摇匀，1000-1500r/min 离心 15 分钟，除去上清液，沉淀的红细胞再用 0.9%氯化钠溶液按上述方法洗涤 2-3 次，至上清液不显红色为止。将所得红细胞用 0.9%氯化钠溶液配成 2%的混悬液，供试验用。

##### 1.2 受试物的制备

除另有规定外，临床用于非血管内途径给药的注射剂，以各药品使用

说明书规定的临床使用浓度，用 0.9%氯化钠溶液 1：3 稀释后作为供试品溶液；用于血管内给药的注射剂以使用说明书规定的临床使用浓度作为供试品溶液。

### 1.3 试验方法

取洁净试管 7 只，进行编号，1-5 号管为供试品管，6 号管为阴性对照管，7 号管为阳性对照管。按下表所示依次加入 2%红细胞悬液、0.9%氯化钠溶液或蒸馏水，混匀后，立即置  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  的恒温箱中进行温育，开始每隔 15 分钟观察 1 次，1 小时后，每隔 1 小时观察 1 次，一般观察 3 小时。

按下列顺序加入各种溶液：

试管编号	1	2	3	4	5	6	7
2%红细胞悬液(ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
生理盐水(ml)	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	
蒸馏水 (ml)							2.5
受试物 (ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1		

### 1.4 结果观察

若试验中的溶液呈澄明红色，管底无细胞残留或有少量红细胞残留，表明有溶血发生；如红细胞全部下沉，上清液体无色澄明，表明无溶血发生。若溶液中有棕红色或红棕色絮状沉淀，振摇后不分散，表明有红细胞凝聚发生。如有红细胞凝聚的现象，可按下法进一步判定是真凝聚还是假凝聚。若凝聚物在试管振荡后又能均匀分散，或将凝聚物放在载玻片上，在盖玻片边缘滴加 2 滴 0.9%氯化钠溶液，置显微镜下观察，凝聚红细胞能被冲散者为假凝聚，若凝聚物不被摇散或在玻片上不被冲散者为真凝聚。

### 1.5 结果判断

当阴性对照管无溶血和凝聚发生，阳性对照管有溶血发生时，若受试

物管中的溶液在 3 小时内不发生溶血和凝聚，则受试物可以注射使用；若受试物管中的溶液在 3 小时内发生溶血和（或）凝聚，则受试物不宜注射使用。

## 五、著者

《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》课题调研组