

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 240.7—2011

化学品毒理学评价程序和试验方法 第7部分：皮肤致敏试验

Procedures and tests for toxicological evaluations of chemicals—
Part 7: Skin sensitization test

2011-08-19 发布

2012-03-01 实施



中华人民共和国卫生部 发布

前 言

根据《中华人民共和国职业病防治法》制定本部分。

GBZ/T 240《化学品毒理学评价程序和试验方法》现分为以下四十四部分：

- 第1部分：总则；
- 第2部分：急性经口毒性试验；
- 第3部分：急性经皮毒性试验；
- 第4部分：急性吸入毒性试验；
- 第5部分：急性眼刺激性/腐蚀性试验；
- 第6部分：急性皮肤刺激性/腐蚀性试验；
- 第7部分：皮肤致敏试验；
- 第8部分：鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验；
- 第9部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验；
- 第10部分：体外哺乳动物细胞基因突变试验；
- 第11部分：体内哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验；
- 第12部分：体内哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验；
- 第13部分：哺乳动物精原细胞/初级精母细胞染色体畸变试验；
- 第14部分：啮齿类动物显性致死试验；
- 第15部分：亚急性经口毒性试验；
- 第16部分：亚急性经皮毒性试验；
- 第17部分：亚急性吸入毒性试验；
- 第18部分：亚慢性经口毒性试验；
- 第19部分：亚慢性经皮毒性试验；
- 第20部分：亚慢性吸入毒性试验；
- 第21部分：致畸试验；
- 第22部分：两代繁殖毒性试验；
- 第23部分：迟发性神经毒性试验；
- 第24部分：慢性经口毒性试验；
- 第25部分：慢性经皮毒性试验；
- 第26部分：慢性吸入毒性试验；
- 第27部分：致癌试验；
- 第28部分：慢性毒性/致癌性联合试验；
- 第29部分：毒物代谢动力学试验；
- 第30部分：皮肤变态反应试验-局部淋巴结法；
- 第31部分：大肠杆菌回复突变试验；
- 第32部分：酵母菌基因突变试验；
- 第33部分：果蝇伴性隐性致死试验；
- 第34部分：枯草杆菌基因重组试验；
- 第35部分：体外哺乳动物细胞程序外DNA合成(UDS)试验；
- 第36部分：体内哺乳动物外周血细胞微核试验；

GBZ/T 240.7—2011

- 第 37 部分:体外哺乳动物细胞姊妹染色单体交换试验;
- 第 38 部分:体内哺乳动物骨髓细胞姊妹染色体交换试验;
- 第 39 部分:精子畸形试验;
- 第 40 部分:繁殖/生长发育毒性筛选试验;
- 第 41 部分:亚急性毒性合并繁殖/发育毒性筛选试验;
- 第 42 部分:一代繁殖试验;
- 第 43 部分:神经毒性筛选组合试验;
- 第 44 部分:免疫毒性试验。

.....

本部分为 GBZ/T 240 的第 7 部分。

本部分由卫生部职业卫生标准专业委员会提出。

本部分由中华人民共和国卫生部批准。

本部分起草单位:贵阳医学院、中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本部分主要起草人:洪峰、潘雪莉、李朝林、孙金秀、侯粉霞、刘海龙。

化学品毒理学评价程序和试验方法

第7部分:皮肤致敏试验

1 范围

GBZ/T 240 的本部分规定了动物皮肤致敏试验的目的、试验概述、试验方法、评价报告和结果解释。

本部分适用于检测化学品对皮肤的变态反应性。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GBZ/T 224 职业卫生名词术语

GBZ/T 240.1 化学品毒理学评价的程序和试验方法 第1部分:总则

3 术语和定义

GBZ/T 240.1 界定的术语和定义适用于本文件。

3.1

诱导接触 induction exposure

机体通过接触受试样品以达到诱导产生过敏状态目的的试验性暴露。

3.2

诱导期 induction period

机体通过接触受试样品而诱导出过敏状态所需的时间。

3.3

激发接触 challenge exposure

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

4 试验目的

确定重复接触化学品对哺乳动物是否可引起皮肤变态反应及其程度。

5 试验概述

实验动物通过多次皮肤涂抹诱导接触受试样品 0 d、7 d、14 d(诱导期)后,给予激发剂量的受试样品,观察实验动物,并与对照动物比较对激发接触受试样品的皮肤反应强度。

6 试验方法

6.1 实验动物和饲养环境

6.1.1 动物种属

首选健康、成年的白色豚鼠,体重 250 g~300 g。如选择其他种属,试验者需提供选择的依据。

6.1.2 动物实验室和饲养

动物实验室应符合国家相应规定。动物自由饮食和饮水。需提供富含维生素 C 的食物。

6.1.3 动物数量和性别

动物数量和性别依赖于选择的试验方法。两种性别均可用于局部封闭涂皮法(Buehler test)和豚鼠最大反应试验(GPMT)。雌性动物应该是未生育过和未怀孕的。Buehler 试验要求试验组至少 20 只豚鼠,对照组至少 10 只豚鼠。GPMT 要求试验组至少 10 只豚鼠,对照组至少 5 只豚鼠,如果试验结果难以确定受试样品的致敏性,应增加动物数,试验组至少 20 只豚鼠,对照组至少 10 只豚鼠。

6.2 试验方法可靠性的检查

使用已知的能引起轻度/中度致敏的阳性物并每隔 6 个月检查一次。局部封闭涂皮法至少有 30% 动物出现皮肤过敏反应;GPMT 至少有 60% 动物出现皮肤过敏反应。阳性物一般采用:

- 己苯乙醛(hexylcinnamaldehyde);
- 巯基苯并噻唑(2-mercaptobenzothiazole);
- 氨基苯甲酸乙酯(ethyl-4-aminobenzoate);
- 二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene);
- DER 331 环氧树脂(DER 331 epoxyresins)。

6.3 剂量设计

试验剂量水平可以通过少量动物(2 只~3 只)的预试验获得。诱导剂量为能足以引起皮肤轻度刺激反应的浓度,激发剂量为不能引起皮肤刺激作用的最高剂量。

水溶性受试样品可用水或无刺激性表面活性剂作为介质,其他受试样品可用 80% 乙醇(诱导接触)或丙酮(激发接触)作介质。

6.4 试验步骤

6.4.1 局部封闭涂皮法(Buehler test)

动物数:试验组至少 20 只,对照组至少 10 只。

6.4.1.1 剂量水平

在试验中设阴性对照组,在诱导接触时该组仅涂以溶剂作为对照;在激发接触时该组涂以受试样品。对照组动物应与受试样品组动物为同一批。在实验室开展致敏反应试验初期、或使用新的动物种属或品系时,需同时设阳性对照组。

6.4.1.2 诱导接触

试验前 24 h 实验动物背部左侧去毛,去毛范围为 3 cm×3 cm。

于第0天、第7天、第14天分别将0.2 mL~0.4 mL新配制的受试样品(最小刺激浓度)涂布在背部左侧2 cm×2 cm的区域,以2层纱布和1层玻璃纸覆盖,再以无刺激胶带封闭固定6 h后,移去敷贴物,清除残留受试样品。

6.4.1.3 激发接触

末次诱导2周后,即第28天,将0.2 mL~0.4 mL受试样品(最大无刺激浓度,建议为诱导浓度的1/2)敷贴于豚鼠右侧背部2 cm×2 cm的脱毛区(试验前24 h去毛),然后用2层纱布和1层玻璃纸覆盖,后者紧贴皮肤,再以无刺激胶带封闭固定6 h后,移去敷贴物,清洗方法同前。

6.4.1.4 结果观察与评价

在24 h、48 h后分别观察局部皮肤反应。用盲法观察对照组和试验组。按表1对局部皮肤反应评分。当受试样品组动物出现皮肤反应积分 ≥ 2 时,判为该动物出现皮肤致敏反应阳性,并计算致敏率,按表2判定受试样品的致敏强度。

6.4.1.5 如果结果可疑,该动物可以1周后重新激发,用最初的对照组或新的对照组进行比较。

表1 皮肤致敏反应试验评分标准

反 应		评 分
红斑和焦痂形成	无反应	0
	轻微的红斑(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
	严重水肿(皮肤隆起约1 cm或以上)	3
最高积分		7
注:皮肤致敏程度分级同表2		

表2 皮肤致敏反应试验分级标准

致敏率/%	等 级	致 敏 程 度
<9	I	弱
9~	II	轻度
29~	III	中度
65~	IV	强
≥ 81	V	极强
注:致敏率是反应评分为1或以上的动物数占该组动物总数的百分比,I级致敏度没有意义,在实际使用下无致敏危险。		

6.4.2 豚鼠最大反应试验(Guinea Pig Maximization 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。

6.4.2.1 动物数

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

6.4.2.2 剂量水平

试验剂量水平可以通过少量动物(2 只~3 只)的预试验获得。诱导剂量为能足以引起皮肤轻度刺激反应的浓度, 激发剂量为不能引起皮肤刺激作用的最高剂量。

6.4.2.3 试验步骤

6.4.2.3.1 诱导接触(第 0 天)

诱导接触应按如下步骤操作:

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

第 1 点 1:1(体积比)FCA/水或生理盐水的混合物;

第 2 点 耐受浓度的受试样品;

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

b) 对照组: 注射部位同受试样品。

第 1 点 1:1(体积比)FCA/水或生理盐水的混合物;

第 2 点 未稀释的介质;

第 3 点 用 1:1(体积比)FCA/水或生理盐水配制的质量浓度为 50% 的介质。

6.4.2.3.2 诱导接触(第 7 天)

将涂有 0.5 g(mL)受试样品的 2 cm×4 cm 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 48 h。对无皮肤刺激作用的受试样品, 可加强致敏, 于第二次诱导接触前 24 h 在注射部位涂抹 10% 十二烷基硫酸钠(SLS)0.5 mL。对照组仅用介质作诱导处理。

6.4.2.3.3 激发接触(第 21 天)

将豚鼠躯干部去毛, 用涂有 0.5 g(mL)受试样品的 2 cm×2 cm 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 24 h。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。

6.4.2.3.4 观察及结果评价

激发接触结束, 除去涂有受试样品的滤纸后 24 h、48 h 和 72 h, 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 3 评分。当受试样品组动物皮肤反应积分 ≥ 1 时, 应判为皮肤致敏反应阳性, 按表 2 对受试样品进行致敏强度分级。

表3 皮肤致敏反应试验评分标准

反 应	评 分
无反应	0
散在或小块红斑	1
中度弥漫的红斑、轻度水肿	2
严重的红斑、水肿	3

7 评价报告

除 GBZ/T 240.1 规定的一般项目外,评价报告还应包括以下方面:

- a) 阳性试验信息,包括阳性对照物、试验方法和试验时间;
- b) 评分等级系统的简要描述;
- c) 诱导和激发使用的介质,如果不是水和生理盐水,说明使用的理由。任何可能与受试样品反应、或增强、或妨碍吸收的原料均应报告;
- d) 诱导和激发使用受试样品的总量,每次使用的技术;
- e) 结论。

8 结果解释

试验结果应能得出受试样品的致敏能力和强度,这些结果只能在很有限的范围内外推到人类。