



中华人民共和国国家标准

GB/T 21608—2008

化学品皮肤致敏试验方法

Test method of skin sensitization for chemicals

2008-04-01 发布

2008-09-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
化学品皮肤致敏试验方法
GB/T 21608—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 11 千字
2008 年 7 月第一版 2008 年 7 月第一次印刷

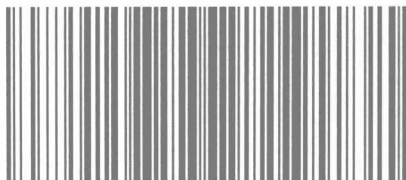
*

书号: 155066 · 1-32030 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 21608—2008

前 言

本标准修改采用联合国经济合作与发展组织(OECD)化学品测试方法 No. 406《皮肤致敏试验》(1992.7)(英文版)。

本标准与 OECD 化学品测试方法 No. 406 相比,存在以下差异:

- 对 OECD 化学品测试方法 No. 406 进行了编辑性修改;
- 增加了前言部分;
- 增加了试验方法可靠性的检查中所用的部分阳性物[见美国环境保护局(USEPA)的《健康影响试验指导 OPPTS 870.2600 皮肤致敏试验》(1998.8)]。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准负责起草单位:中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所。

本标准参加起草单位:天津市检验检疫科学技术研究院、贵阳医学院。

本标准主要起草人:孙金秀、李朝林、林铮、侯粉霞、吴维皓、刘海龙、张园、于智睿、李宁涛、洪峰、潘雪莉。

化学品皮肤致敏试验方法

1 范围

本标准规定了动物皮肤致敏试验的试验目的、术语定义和缩略语、试验基本原则、试验方法、试验报告和结果解释。

本标准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

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 14925—2001 实验动物 环境及设施

美国环境保护局(USEPA)的《健康影响试验指导 OPPTS 870.2600 皮肤致敏试验》(1998.8)(英文版)

美国化学文摘登记号 CAS No. 94-09-07

美国化学文摘登记号 CAS No. 97-00-7

美国化学文摘登记号 CAS No. 101-86-0

美国化学文摘登记号 CAS No. 149-30-4

3 术语、定义和缩略语

3.1

皮肤致敏反应/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。对于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

机体通过接触受试样品以达到诱导产生致敏状态目的的试验性暴露。

3.3

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。

3.4

激发接触 challenge exposure

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

3.5

最大反应试验(GPMT) guinea pig maximisation test

3.6

完全福氏佐剂(FCA) freunds complete adjuvant

3.7

十二烷基硫酸钠(SDS) sodium dodecyl sulfate

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 试验基本原则

实验动物通过多次皮肤涂抹诱导剂量受试样品 10 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、成年的白化豚鼠,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 动物饲养和环境

动物饲养环境应符合 GB 14925—2001 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敷贴法(buehler test)和豚鼠 GPMT。雌性动物应该是未生育过和未怀孕的。局部封闭敷贴法要求试验组至少 20 只豚鼠,对照组至少 10 只。GPMT 要求试验组至少 10 只豚鼠,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,试验组至少 20 只,对照组至少 10 只。

6.2 试验方法可靠性的检查

使用已知的能引起轻度/中度致敏的阳性物每隔 6 个月做一次阳性对照。局部封闭敷贴法至少有 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:

- a) 己苯乙醛(hexylcinnamic aldehyde, CAS No. 101-86-0);
- b) 巯基苯并噻唑(2-mercaptobenzothiazole, CAS No. 149-30-4);
- c) 氨基苯甲酸乙酯(ethyl-4-aminobenzoate, CAS No. 94-09-7);
- d) 2,4-对-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene, CAS No. 97-00-7);或
- e) DER 331 环氧树脂(DER 331 epoxy resin)。(引用 USEPA《健康影响试验指导 OPPTS 870.2600 皮肤致敏试验》(1998.8))。

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。在受试物存在皮肤刺激性时,诱导剂量为能足以引起皮肤轻度刺激反应的剂量(最小刺激剂量),激发剂量为不引起皮肤刺激反应的最大剂量(最大无刺激剂量)。

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

6.4 试验步骤

6.4.1 局部封闭敷贴法(buehler test)

6.4.1.1 动物数

试验组至少 20 只,对照组至少 10 只。

6.4.1.2 剂量水平

用 2 只~3 只动物进行预试验,寻找能引起皮肤轻度刺激反应的最高浓度(剂量)。

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。对照组动物必须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。

6.4.1.3 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 日、第 7 日、第 14 日分别将 0.4 mL 新配制的受试样品涂布在背部左侧 2 cm×2 cm 的区域,以二层纱布和一层玻璃纸覆盖,再以无刺激胶带封闭固定 6 h 后,移去敷贴物,清洗残留受试样品。

6.4.1.4 激发接触

末次诱导 14 d 后,即第 28 日,将 0.5 g(或 0.5 mL)受试样品敷贴于豚鼠右侧背部 2 cm×2 cm 的脱毛区(试验前 24 h 去毛),然后用二层纱布和一层玻璃纸覆盖,再以无刺激胶带封闭固定 6 h 后,移去敷贴物,清洗方法同前。

6.4.1.5 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不小于 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。

6.4.1.6 如果结果可疑,该动物可以一周后重新激发,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(1)

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(2)

致敏率/%	等级	致敏程度
小于 9	I	弱
9~	II	轻度
29~	III	中度
65~	IV	强
不小于 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

采用 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 只,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

诱导接触受试样品浓度为能引起皮肤轻度刺激反应的最高浓度,激发接触受试样品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 只~3 只)的预试验获得。

6.4.2.3 试验步骤

6.4.2.3.1 诱导接触(第 0 日)

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。

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 未稀释的赋形剂;

第 3 点 用 1:1(体积比)FCA/水或生理盐水配制的浓度为 50%(质量分数)的赋形剂。

6.4.2.3.2 诱导接触(第 7 日)

将涂有 0.5 g(或 0.5 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% SDS 0.5 mL。对照组仅用赋形剂作诱导处理。

6.4.2.3.3 激发接触(第 21 日)

将豚鼠躯干部去毛,用涂有 0.5 g(或 0.5 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。

6.4.2.4 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不小于 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(3)

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 试验报告

7.1 受试样品名称、理化性状、配制方法、所用浓度等。

7.2 体内试验需包括:实验动物的种属、品系和来源(注明合格证号和动物级别)、性别、体重范围和(或)周龄、喂养方式;实验动物饲养环境,包括饲料来源(对非标准饲料应注明饲料的配方)、室温、相对湿度,动物实验室和饲料的合格证号;剂量设计和动物分组方法,每组所用动物性别、数量及初始体重范围。

- 7.3 主要操作步骤。
- 7.4 各项检测指标的测定方法及主要检测仪器的名称和型号。
- 7.5 评分等级系统的简要描述。
- 7.6 诱导和激发使用的赋形剂,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。
- 7.7 诱导和激发使用受试样品的总量,每次使用的技术。
- 7.8 阳性试验信息,包括阳性对照物、试验方法和试验时间。
- 7.9 检测结果数据统计学处理方法以及各项参数的计算方法。
- 7.10 列表报告各项指标测定结果,并列出具计算所得的毒理学参数。
- 7.11 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。
