



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 16886.10—XXXX/ISO 10093-10:2021

## 医疗器械生物评价 第10部分:皮肤致敏试验

Biological evaluation of medical devices—Part 10: Tests for skin sensitization

(ISO 10993-10:2021, IDT)

(工作组讨论稿)

(本草案完成时间: 2022年4月)

在提交反馈意见时, 请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会

# 目 次

前 言	III
引 言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 一般原则—逐步方法	3
5 试验前的考虑	3
5.2 材料类型	3
5.2.1 基本考虑	3
5.2.2 陶瓷、金属和合金	3
5.2.3 聚合物	4
5.2.4 生物衍生材料	4
5.3 化学成分方面的信息	4
5.3.1 总则	4
5.3.2 现有的数据源	4
6 皮肤致敏试验	4
6.1 试验方法的选择	4
6.2 小鼠局部淋巴结试验	5
6.2.1 原则	5
6.2.2 试验样品的制备	5
6.2.3 动物和管理	5
6.2.4 试验步骤	6
6.2.5 试验组	6
6.2.6 细胞增殖测定和组织制备	7
6.2.7 结果与解释	7
6.2.8 试验报告	7
6.3 豚鼠皮肤致敏试验方法	8
6.3.1 原则	8
6.3.2 试验样品浓度的选择	8
6.3.3 诱导	8
6.3.4 激发	8
6.4 影响试验结果的重要因素	8
6.5 豚鼠最大化试验	9
6.5.1 原理	9
6.5.2 试验样品制备	9
6.5.3 动物与管理	9
6.5.4 试验步骤	10

6.5.5 动物观察.....12

6.5.6 结果评价.....12

6.5.7 试验报告.....12

6.6 封闭贴敷试验(Buehler 试验).....13

6.6.1 原则.....13

6.6.2 试验样品制备.....13

6.6.3 动物与管理.....13

6.6.4 试验步骤.....13

6.6.5 动物观察.....14

6.6.6 结果评价.....14

6.6.7 试验报告.....14

7 解释试验结果的关键因素.....15

附 录 A （规范性） 皮肤致敏试验材料的制备.....16

附 录 B （资料性） 高分子试验材料浸提物的制备方法.....18

附 录 C （资料性） 皮肤致敏的非动物方法.....20

附 录 D （资料性） 关于皮肤致敏试验的背景资料.....31

参 考 文 献.....33

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是GB/T（Z）16886《医疗器械生物学评价》的第10部分。GB/T（Z）16886已经发布了以下部分：

- 第1部分：风险管理过程中的评价与试验；
- 第2部分：动物福利要求；
- 第3部分：遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验；
- 第4部分：与血液相互作用试验选择；
- 第5部分：体外细胞毒性试验；
- 第6部分：植入后局部反应试验；
- 第7部分：环氧乙烷灭菌残留量；
- 第9部分：潜在降解产物的定性和定量框架；
- 第10部分：皮肤致敏试验；
- 第11部分：全身毒性试验；
- 第12部分：样品制备与参照材料；
- 第13部分：聚合物医疗器械降解产物的定性和定量；
- 第14部分：陶瓷降解产物的定性与定量；
- 第15部分：金属与合金降解产物的定性与定量；
- 第16部分：降解产物与可沥滤物毒代动力学研究设计；
- 第17部分：可沥滤物允许限量的建立；
- 第18部分：材料化学表征；
- 第19部分：材料物理化学、形态学和表面特性表征；
- 第20部分：医疗器械免疫毒理学试验原则和方法；
- 第22部分：纳米材料指南；
- 第23部分：刺激试验。

本文件代替GB/T 16886.10—2017《医疗器械生物学评价 第10部分：刺激与皮肤致敏试验》，与GB/T 16886.10—2017相比，除结构调整和编辑性改动以外，主要技术变化如下：

- a) 删除了刺激试验相关内容（刺激试验内容见GB/T 16886.23），仅包含皮肤致敏试验的相关内容。

本文件等同采用ISO 10093-10:2021《医疗器械生物学评价 第10部分：皮肤致敏试验》。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会（SAC/TC 248）归口。

本文件起草单位：山东省医疗器械和药品包装检验研究院。

本文件主要起草人：。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2000年首次发布为GB/T 16886.10—2000，2005年第一次修订，2017年第二次修订；
- 本次为第三次修订。

## 引 言

本文件评价了医疗器械释放的化学物可能导致的可能引起的接触性皮肤敏感危害。

医疗器械中包含的某些材料已经进行过试验，其潜在的皮肤致敏已被确认。特别是对于齿科材料，已有报告其具有致敏特性。其他材料及其化学成分尚未进行试验，并且在与人体组织接触时可能会产生不良反应。因此，制造商有义务在上市前评价每种器械的潜在不良影响。

传统上，小动物试验是在对人类进行试验之前进行的，以帮助预测人类的反应（背景信息见附录D）。自2015年以来，一些化学和体外试验已经得到了验证，并发布了经济合作与发展组织(OECD)试验指南，以评价化学物的皮肤致敏潜力。<sup>[75][79][104]</sup>附录C中概述了纯化学物的可用的皮肤致敏的替代试验。这些测试方法，每一种都是为解决特定的关键事件而开发的，单独可能不足以得出化学品是否存在皮肤致敏潜力的结论，宜在综合方法的背景下考虑，例如综合方法测试和评估（IATA），将它们与其他补充信息相结合。注意到目前为止，在附录C中的体外和化学试验中的皮肤致敏性试验，只被验证用于纯化学物，而不适用于医疗器械。为了确认它们适用于对医疗器械的皮肤致敏潜力的评价，需要对其分析方法进行评价和验证。

在适当的情况下，鼓励在动物试验之前初步使用体外方法进行筛选。为了减少使用的动物数量，本文件提出了一种逐步评价的方法，并在每个阶段审查和分析试验结果。为了提交注册资料，应使用适用于各自国家的良好实验室管理规范（GLP）或ISO/IEC17025进行皮肤致敏研究，并遵守与动物福利相关的法规。建议对数据进行统计分析，并酌情使用这些统计分析。本文件包括开发安全产品的重要工具，旨在供经过培训和有经验的专业人员使用，他们可以解释其要求并判断每个医疗器械的评估结果，同时考虑与器械相关所有因素，通过审查科学文献和以前的临床经验提供的医疗器械的预期用途和当前知识。

本文件基于许多标准和导则为基础，包括OECD导则、美国药典和欧洲药典。本文件旨在成为选择和进行试验的基础文件，以便评价与医疗材料和器械的安全有关的皮肤致敏反应。

《医疗器械生物学评价》拟由二十一个部分构成。

——第1部分：风险管理过程中的评价与试验。目的是保护人类由于使用医疗器械所产生的潜在生物学风险，在风险管理过程中描述医疗器械生物学评价，并将其作为医疗器械总体评价和开发过程的一个组成部分。

——第2部分：动物福利要求。目的在于最大限度利用科学合理的非动物试验，确保用于评价医疗器械所用材料的生物学性能动物试验符合认可的伦理和科学原则。

——第3部分：遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验。目的是为已确定具有潜在的遗传毒性、致癌性或生殖毒性的医疗器械提供评价指南和方法。

——第4部分：与血液相互作用试验选择。目的是为医疗器械与血液相互作用评价提供通用要求。

——第5部分：体外细胞毒性试验。目的是为评估医疗器械体外细胞毒性提供试验方法。

——第6部分：植入后局部反应试验。目的是为评估医疗器械所用生物材料植入后局部反应提供试验方法。

——第7部分：环氧乙烷灭菌残留量。目的是为经环氧乙烷(E0)灭菌的单件医疗器械上E0及2-氯乙醇(ECH)残留物的允许限量、E0及ECH提供检测步骤以及确定器械是否可以出厂提供检测方法。

——第9部分：潜在降解产物的定性和定量框架。目的是为系统评价医疗器械潜在的和已观察到的生物降解以及生物降解研究的设计与实施提供基本原则。

——第10部分：皮肤致敏试验。目的是为医疗器械及其组成材料潜在皮肤致敏提供评价步骤。

——第11部分：全身毒性试验。目的是为评价医疗器械材料导致潜在不良全身反应时提供试验步骤指南。

——第12部分：样品制备与参照材料。目的是为医疗器械生物学评价中样品制备方法和参照材料提供选择指南。

——第13部分：聚合物医疗器械降解产物的定性和定量。目的是为用于临床的成品聚合物医疗器械模拟环境的降解产物定性与定量试验设计提供通用要求。

——第14部分：陶瓷降解产物的定性与定量。目的是为从陶瓷材料获取降解产物定量用的溶液提供方法。

——第15部分：金属与合金降解产物的定性与定量。目的是为金属医疗器械或可供临床使用的相应材料样品的降解产物提供定性与定量试验设计的通用要求。

——第16部分：降解产物与可沥滤物毒代动力学研究设计。目的是为提供与医疗器械相关的设计和实施毒代动力学研究的原则。

——第17部分：可沥滤物允许限量的建立。目的是为医疗器械可沥滤物允许限量的建立提供方法。

——第18部分：风险管理过程中医疗器械材料的化学表征。目的是为医疗器械成分的定性和定量（必要时）以识别生物危险以及估计和控制材料成分中的生物学风险提供框架。

——第19部分：材料物理化学、形态学和表面特性表征。目的是为识别与评价最终医疗器械材料的物理特性，如物理化学、形态学和表面特性（PMT）的各种参数和试验方法。

——第20部分：医疗器械免疫毒理学试验原则和方法。目的是为医疗器械潜在免疫毒性方面提供免疫毒理学综述以及为检验不同类型医疗器械的免疫毒性提供方法指南。

——第22部分：纳米材料指南。目的是为包含、产生或由纳米材料组成的医疗器械生物学评价提供指南。

——第23部分：刺激试验。目的是为医疗器械及其组成材料潜在刺激提供评价步骤。

## 医疗器械的生物评价 第10部分:皮肤致敏试验

### 1 范围

本文件规定了医疗器械及其组成材料的诱导潜在皮肤致敏反应的评价步骤。

本文件适用于:

- 详细的体内皮肤致敏试验步骤;
- 结果解释的关键因素。

注:与上述试验有关材料准备说明见附录A。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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。

ISO 10993-1 医疗器械的生物评价 第1部分:风险管理过程中的评价和试验

ISO 10993-2 医疗器械的生物评价 第2部分:动物福利要求

ISO 10993-12 医疗器械的生物评价 第12部分:样品制备和参考材料

ISO 10993-18 医疗器械的生物评价 第18部分:风险管理过程中的医疗器械材料的化学表征

### 3 术语和定义

ISO 10993-1界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

ISO和IEC负责维护用于标准化的术语数据库,网址如下:

- IEC 电子百科:可在 [http:// www.electropedia.org/](http://www.electropedia.org/)
- ISO 在线浏览平台: [http:// www.iso.org/obp](http://www.iso.org/obp)

#### 3.1

**致敏原 sensitizer**

在反复接触后能引起某一类特异性超敏反应的物质或材料。

#### 3.2

**变应性接触性皮炎 allergic contact dermatitis**

基于对某种物质引起的免疫介导的观察到的皮肤反应的临床诊断。

#### 3.3

**空白 blank**

不加试验材料的浸提介质,置于与试验材料相同的容器中,并经受与试验材料相同的浸提条件。

注:空白对照的目的是评价浸提容器、浸提介质和浸提过程可能的干扰作用。

#### 3.4

**激发 challenge**

诱导阶段后的过程,在这一阶段检验个体后续接触诱导材料的免疫学反应。

## 3.5

**诱导 elicitation**

先前致敏个体接触于致敏剂的免疫反应。

## 3.6

**红斑 erthema**

皮肤或黏膜发红。

## 3.7

**浸提液 extract**

某一试验材料或对照材料在控制条件下与溶剂接触后获取到的液体或悬浮液。

[来源: ISO 10993-12:2021, 3.6]

## 3.8

**诱导 induction**

导致个体对某一特定材料重新形成免疫学活性增强状态的过程。

## 3.9

**刺激物 irritant**

引起刺激的物质(3.10)。

## 3.10

**刺激 irritation**

一次、多次或持续与一种物质/材料接触所引起的局部非特异性炎症反应。

注: 皮肤刺激是一种可逆反应, 主要以皮肤局部红斑(3.6)(发红)为特征。

## 3.11

**阴性对照 negative control**

当按规定步骤试验时, 在试验系统中证明试验步骤适宜性的出现可再现的适当的阴性、无反应或最小反应的经充分表征的材料或物质。

注: 实际操作中, 阴性对照包括空白(3.3)、介质(3.17)/溶剂和参照材料。

[来源: ISO 10993-12:2021, 3.10, 有修改]

## 3.12

**水肿 oedema**

液体向组织内异常渗透引起的肿胀。

## 3.13

**阳性对照 positive control**

当按规定试验方法评价时, 在试验系统中证明试验步骤适宜性的出现可再现的适当的阳性或反应性应答、的经充分表征的材料或物质。

## 3.14

**皮肤致敏 skin sensitization**

免疫介导的对某种物质的皮肤反应。

注: 这种反应在人体上以瘙痒、红斑(3.6)、水肿(3.12)、丘疹、大(小)水泡、或此类综合症状为特征, 其他种属表现可能不同, 仅出现红斑和水肿。

## 3.15

**试验材料 test material**

取样供生物学或化学试验用的材料、器械、器械的一部分或其组件。



## 3.16

**试验样品 test sample**

供生物学或化学试验或评价用的材料、器械、器械的一部分、组件、浸提液或浸提液的一部分。

## 3.17

**溶媒介 vehicle**

用于湿化、稀释、悬浮、浸提或溶解试验物质/材料的液体。

## 4 一般原则-逐步方法

现有的检验刺激与致敏的试验方法特别设定为测定潜在的皮肤致敏作用，这些试验一般不预示其他类型的不良作用。

本文件要求逐步评价法，因为任何阶段都可以得出结论，即不需要进一步的皮肤致敏试验：

- a) 文献和供应商信息审查，包括化学和物理特性，以及任何医疗器械成分的皮肤致敏潜力以及结构 相关化学物和材料的信息；详情见 ISO 10993-1；根据现有信息进行风险评估，以确定皮肤致敏风险是否可接受或是否需要进一步试验
- b) 如果需要，对器械材料进行额外的表征和风险评估，包括根据 ISO 10993-18 中所述的一般原则对试验样品的化学表征和分析；
- c) 根据 ISO 10993-2，应优先考虑体外试验而不是体内试验，并在新的体外试验经过科学验证并变得合理和切实可行时替换后者；

注：目前有一些经过国际认可和接受的体外试验，以试验化学物的皮肤致敏潜力；然而，这些体外试验尚未在医疗器械上得到验证。目前正在进行其中一些试验，以使其能够用于医疗器械。

- d) 只有在试验材料不能确定特征，且不能使用 a)、b) 和 c) 中规定的方法获得的信息进行风险评估时，才适合进行体内动物试验。

## 5 试验前的考虑

## 5.1 总则

需要强调的是试验前的考虑是非常重要的，其可以得出无需进行致敏试验的结论。

GB/T 16886.1—2022的第5章中给出的和下列条款的要求是适用的。

非无菌样品只应通过局部试验进行研究，因为试验样品微生物污染的可能性会干扰最终试验解释。对不能保证无菌但仍认为是无污染的试验样品，皮内试验可能要进行论证。

## 5.2 材料类型

## 5.2.1 基本考虑

应考虑在医疗器械制造和装配期间可能用做加工助剂（如润滑剂或脱模剂）的其他化学成分。除了原材料和制造加工助剂的化学成分外，装配粘合剂/溶剂残留物以及灭菌残留物或灭菌过程所致的反应性产物可能存在于终产品中，这些成分是否产生健康危害（风险）取决于终产品的渗漏或降解性能，应考虑这些成分潜在的致敏活性。

## 5.2.2 陶瓷、金属和合金

这些材料在化学成分数量方面一般比聚合物和生物衍生材料简单。

### 5.2.3 聚合物

这类材料在化学成分方面一般要比5.2.2中复杂一些，可能有若干反应性产物/杂质/添加剂，而且聚合反应的完全程度可能会有不同。

### 5.2.4 生物衍生材料

这类材料在其成分方面特别复杂，也常含有加工残留物，如交联剂和抗生素。生物材料样品之间的成分可能是不一致的。

本文件中的方法不是为检验生物衍生材料而设计，因此不足以检验该类材料，例如本文件中的试验未考虑跨物种致敏作用。

## 5.3 化学成分方面的信息

### 5.3.1 总则

应确立材料化学成分方面的完整的定性数据，也应获取与生物安全性相关的信息及定量数据。如没有定量数据，说明应形成文件并进行论证。

### 5.3.2 现有的数据源

应尽可能获取原料供应商的定性和定量信息。

对于聚合物，这通常需要获取专有信息；应规定传输和使用这些机密信息。

还应从产品制造的制造链的适宜成员中（包括半成品和零件制造商）索取其他任何生产过程中的添加剂（如脱模剂）的定性信息。

如果有关成分的信息不完整，建议进行文献研究，以确定起始材料和任何添加剂的可能性质，以协助为有关材料选择最合适的分析方法。

应按照ISO10993-18测定最终产品的化学成分。

注：可依据ISO或美国试验材料协会（ASTM）标准和/或用户的要求规定陶瓷、金属和合金的成分，但为了获取完整的成分定性与定量资料，可能还需要要求原材料供应商或制造厂以及零件制造厂提供这些信息，以保证还能鉴别加工助剂。能够获取这些数据的另一来源是主管部门掌控的材料文件。

## 6 皮肤致敏试验

### 6.1 试验方法的选择

在体外和化学中，已经开发了纯化学物的替代方法，使用不同的分析方法来识别皮肤致敏剂。其中一些方法已被纳入OECD（OECD）的试验指南（TG 442C<sup>[75]</sup>，TG 442D<sup>[79]</sup>和TG 442E<sup>[104]</sup>）或在OECD试验指南计划<sup>[121]</sup>（见附录C）。

总之，这些试验指南中描述的分析涵盖了目前确定的皮肤致敏有害结局途径（AOP）的三个关键事件，包括分子起始事件（蛋白结合）、炎症诱导和树突状细胞的激活。这些针对特定关键事件而开发的试验方法，单独可能并不足以得出关于化学物质是否存在皮肤致敏潜力的结论，应在检测与评估的整合方案（IATA）等综合方法的背景下加以考虑，并将其与其他补充信息相结合加以考虑。

根据ISO 10993-2的标准，在评价纯化学物的皮肤致敏潜力时，应考虑到这种综合方法。这些方法是否也适用于医疗器械或医疗器械的浸提液，目前尚不清楚。附录C概述了纯化学物的替代皮肤致敏试验。

目前有三种测定化学物潜在皮肤致敏性的动物试验，其中包括两个豚鼠试验和一个小鼠试验。迄今为止，用于检验皮肤致敏反应最常用的两个方法是豚鼠最大剂量试验 (GPMT) 和封闭式贴敷试验 (Buehler 试验)。最大剂量试验为最敏感的方法，见参考文献[9]。封闭式贴敷试验适用于局部应用产品。

小鼠局部淋巴结试验 (LLNA) 已被国际公认的OECD试验指南2010<sup>[33]</sup>为试验单一化学物作为豚鼠试验的唯一替代试验，并且目前是化学物的首选体内试验，见参考文献[19]和[32]。有些试验样品可能需要豚鼠试验来评价潜在的致敏性。这对于某些金属（见参考文献[44]）是适用，这些金属可能会在LLNA或皮肤中产生假阴性结果或者可能产生假阳性结果的刺激物，以及不穿透皮肤的高分子量物质，或在推荐的介质中不溶解的物质。

注：所有三种动物试验方法都是用于试验化学物质的皮肤致敏潜力，即接触性皮炎、迟发性型（IV型）过敏。

鉴于ISO 10093-2中关于动物福利要求的规定，在进行体内试验时，应考虑到LLNA。除了动物福利的考虑，LLNA具有提供客观定量数据的优势。

## 6.2 小鼠局部淋巴结试验

### 6.2.1 原则

某一试验样品处置小鼠耳背局部后，测定鼠耳应用部位引流淋巴结内淋巴细胞的增殖程度。确定某种试验材料为致敏物时，其临界值是是与对照活性比较细胞增殖应答为3倍或更多。

在用物质进行LLNA时，应采用剂量反应方法。对最终产品/医疗器械，只采用未稀释浸提液可以满足试验要求。

注：参考文献[15]到[44]中包含有代表性的LLNA文献。鼓励实验室在进行LLNA时对这些文献和其他现有相关文献进行评审。

### 6.2.2 试验样品的制备

试验样品应为液体、悬浮液、凝胶或膏状物，此类样品可应用于小鼠的耳部。可能的情况下，应检验系列剂量（稀释液）。否则，宜采用所制备的最高浓度的化学溶液、悬浮液或浸提液。当用浸提液试验到LLNA的强烈反应时，可能需要一项评价多剂量的后续研究，以评价浸提液可能的皮肤致敏效力。全身毒性和重度局部皮肤刺激会使试验结果无效；因此，应避免这些反应。在某些情况下，可能需要进行预试验。

物质/化学物最常用的介质是丙酮橄榄油(AOO)4:1的混合物。亲水性和/或不能充分附着在耳朵皮肤上的液体样品宜加以改良，使其附着在试验部位。这可以通过添加增稠剂如羧基甲基纤维素或羟乙基纤维素（密度为0.5%）或表面活性剂如聚基甲酰胺®（体积分数为1%）L92<sup>1)</sup>来获得。对于水溶性化学物，二甲亚砜(DMSO)或二甲基甲酰胺(DMF)优于表面活性剂聚基甲酰胺®L92。见参考文献[34]。或者，如前所述，还可以使用其他浸提介质。参见参考[33]。添加到浸提介质和/或介质成分变化的影响应进行确认并形成文件。这可以通过使用弱到中度皮肤致敏剂作为阳性对照。此外，可以对试验样品进行阳性对照的峰值试验，以证明LLNA仍然能够试验到所制备的浸提液中是否存在潜在的皮肤致敏剂。供试品浸提的其他基本信息详见ISO 10093-12。

每次试验给予应分别制备浸提液。

注：对于聚合物材料，一种可选的浸提方法见附录B。

### 6.2.3 动物和管理

1) ® L92是合适的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对这一产品的认可。

应使用CBA/Ca菌株、CBA/J或BALB/c品系的健康雌性非妊娠小鼠，除非有其他品系得到验证，见参考文献[33]、[41]和[42]。已有报道几个小鼠品系是被认可的（DBA/2、B6C3F1），见参考文献[35]。小鼠年龄为7周至12周；每项研究的小鼠年龄匹配（在一周年龄范围内）。

饲养和选择动物应符合ISO 10993-2的规定，使小鼠适应实验室环境，应单独识别。对于某些试验样品，可能需要单独的饲养。对此应提供合理证明并形成文件。

应通过不包括打耳孔或耳标的方法对动物进行唯一识别。

当进行群养时，宜考虑到交叉污染和不必要的经口摄入。

#### 6.2.4 试验步骤

对于化学物，LLNA通常以剂量-反应的方式进行。对于固体医疗器械，应待测样品进行浸提。医疗器械供试样品可能为浸提液，这种情况下仅有单剂量用于试验，一般可检验未稀释的浸提液。不过，当浸提液含有高毒性成分时，毒性在LLNA中可导致阴性反应。因此在LLNA中检验高毒性浸提液（见ISO10993-5）时，推荐采用剂量反应方式和稀释浸提液。此外，当在LLNA中检测到强烈反应时，可以进行剂量反应跟踪以评估浸提物可能的致敏效力。

为确保重现性和敏感性，每一试验应包括皮肤致敏阳性对照物质的试验，以验证试验系统并显示阳性反应。众所周知的弱到中度的接触性过敏原（例如：巯基苯并噻唑、己基肉桂醛或苯佐卡因）应作为阳性对照。上述例子可能不适合用于样品制备的每种介质（例如：水基质）；在这种情况下，可以选择另一个阳性对照。ASTM F2148表明，在这种情况下，福尔马林和2,4-二硝基氯苯(DNCB)应作为阳性对照。这应提供合理证明和文件。

虽然建议同时包含一个阳性对照组，但在某些情况下，阳性对照试验物质仅定期检测（即间隔 $\leq 6$ 个月）就足够了。定期进行LLNA的实验室就是这种情况（即以不少于每月一次的频率进行LLNA）并拥有已建立的历史阳性对照数据库，该数据库证明实验室能够通过阳性对照获得可重复和准确的结果。在合理时间内进行的至少10次独立试验中，通过产生与阳性对照产生一致的阳性结果，可以成功地证明对LLNA的适当熟练程度（例如：至少一年）。

在研究开始和结束时，应记录每只动物体重。为检验试验样本的潜在毒性，应在研究期间进行临床观察并进行记录。

当每6个月仅采用一次的阳性对照出现阴性结果时，可能会影响之前6个月期间获取的试验结果。参考文献[88]中指出，常规进行LLNA（即每个月进行LLNA不少于一次）和进行过LLNA并有形成文件的获取阳性对照物试验一致性结果能力的实验室可考虑阳性对照物定期试验（即 $\leq 6$ 个月间隔）。重要的是要了解，在每次定期阳性对照试验之间的周期内，仅有定期阳性对照而非平行阳性对照的情况下，在判定无平行阳性对照得出的阴性结果的适当性和可接受性方面可能会有分歧。例如，如在定期阳性对照试验期间内获取到假阴性结果，则在最后一次可接受的与不可接受的阳性对照试验之间的周期内获取到的全部阴性试验物的结果可能会被质疑。为了证实之前的阴性试验物的结果是可接受的，实验室可能要重复进行全部阴性结果的试验，这样需要额外的费用并增加动物使用。

#### 6.2.5 试验组

当进行LLNA时，每组至少有5只小鼠的数据用于评价。淋巴结反应可以通过单独测量或通过测量合并的淋巴结样本来确定。对于统计学分析，优先采用动物个体测定方式。

当仅有单剂量用于评价时（如浸提液），每组至少采用5只小鼠，测定每只动物的反应。

试验组应设置为：

—— 所用每种介质空白组（见附录A）；

- 所用每种介质阳性对照组，适宜时；
- 所用每种介质浸提液试验组。

在检验单一化学物或物质时，应采用剂量反应方式进行 LLNA。对其他试验类型和浸提液类的样品，剂量反应评价可能是不可行的。当仅有一个试验组时，应进行论证并形成文件。

注：在采集到充分的数据以证实阳性对照剂量反应的一致性时，可能包含有显示试验敏感性的单剂量。见参考文献[32]。

应将适宜的样品应用于指定小鼠双耳的背侧，剂量为25μL/d，连续三天。每天观察双耳可能会干扰结果解释的刺激迹象。见参考文献[23]、[27]和[29]。

#### 6.2.6 细胞增殖测定和组织制备

引流淋巴结内的增殖细胞可通过放射性或荧光标记物进行标记。通常使用的放射性标记物是3H-胸腺嘧啶脱氧核苷和125 I-碘脱氧尿苷，有时也可使用荧光氟脱氧尿苷。

最后一次处置（72±2）h后，记录每只小鼠体重并静脉注射标记物以测定细胞增殖。全部试验和对照小鼠经尾静脉注射0.25mL含3H-胸腺嘧啶脱氧核苷 740KBq（20 μCi）放射单位的磷酸盐缓冲液（PBS），对125 I-碘脱氧尿苷则注射0.25mL含74KBq（2 μCi）放射单位的PBS，或注射0.25mL含10-5mol/L荧光氟脱氧尿苷的PBS。见参考文献[33]。

经论证也可使用其他不需要放射性标记的替代步骤[例如：三磷酸腺苷（ATP）（OECD TG 442A<sup>[122]</sup>）测定（DA法）、溴脱氧尿苷BrdU（OECD TG442B<sup>[123]</sup>）测定（ELISA或FCM法）]。

注1：有关更多信息，见参考文献[33]、[36]、[42]、[43]和[49]。

根据ISO 10993-2标准注射标记液（5±0.75）h后，对小鼠实施安乐死。移除小鼠耳引流淋巴结，应小心操作避免组织样品交叉污染。可以将每组动物的淋巴结合并，也可以将每只小鼠的两只淋巴结并到一起。首选从每只动物个体采集的数据，因为这种数据可提供一组中每只动物之间的变异性轻柔按压淋巴结通过一个200 μm不锈钢丝网或尼龙网制备单细胞制备物。用冷冻的 PBS将过滤器冲洗入容器，从网状过滤器中去除细胞。容器内进行细胞准备。细胞制剂离心洗涤两次，用PBS重悬。细胞用5%三氯乙酸(TCA)在（4±2）℃下沉淀（18±1）h。最终离心后，微球在1mL三羧酸中重悬于1mL TCA中并移至含有10mL闪烁液的闪烁管中进行<sup>3</sup>H计数，或直接移至伽马计数器进行<sup>125</sup>I计数。见参考文献[21]、[35]和[36]。

注2：也可采用半体内方法标记并测定细胞增殖。见参考文献[37]和[38]。

#### 6.2.7 结果与解释

测定每只小鼠每分钟淋巴结细胞计数（cpm）的放射活性水平。转换每分钟计数（cpm）为每分钟衰变数（dpm），计算每只动物或每组小鼠至少三个计数的 dpm 的平均值和标准偏差。每一结果减去本底值。

当使用个体样品方法时，继续计算每组5只小鼠的dpm的平均值和标准差。通过将平均试验组dpm除以空白的dpm来确定刺激指数(SI)。供试试验样品SI为3或大于3（≥3.0）应考虑阳性，为致敏物。见参考文献[16]。

阳性对照样品产生的SI应大于或等于3.0。

对于验证试验，应同时或试验前6个月内采用阳性对照。见参考文献[33]。

#### 6.2.8 试验报告

试验报告应包括：

- a) 对试验材料或器械的描述；
- b) 试验样品或材料的预期用途/应用；
- c) 所使用的标准（包括其出版年份）；
- d) 对制备试验样品或试验材料或器械所用方法的详细说明；
- e) 实验动物的描述；
- f) 耳部应用方法；
- g) 细胞增殖测定方法的描述；
- h) 与程序之间的任何偏差；
- i) 观察记录，包括临床和体重观察；
- j) 结果评价，包括阳性对照；
- k) 试验日期。

### 6.3 豚鼠皮肤致敏试验方法

#### 6.3.1 原则

目前有两种豚鼠检验法用于测定化学物和医疗器械的皮肤致敏活性，为Buehler试验和GPMT。两种方法由诱导和激发两个阶段组成，涉及到超敏反应的全过程。

#### 6.3.2 试验样品浓度的选择

目前检验单一化学物潜在致敏性的导则推荐试验中仅采用一种浓度。

注：对于聚合物材料，一种可选的浸提方法见附录B。

#### 6.3.3 诱导

致敏率很大程度上取决于诱导剂量，可能的情况下豚鼠试验应采用轻度到中度刺激的诱导剂量。如达不到刺激限值，则应采用最高可能浓度，但不应影响动物的健康。豚鼠试验的诱导剂量一般依据具体豚鼠试验中描述的预试验进行选择（见 6.5.4.2）。用常用溶剂制备的未稀释浸提液的胃肠外剂量不必进行预试验。

#### 6.3.4 激发

豚鼠试验的激发剂量也基于在之前未接触试验材料的动物体上进行的预试验。应采用预试验评价中确定的最高无刺激剂量。为了有助于结果评价，建议激发阶段采用一种以上浓度。

### 6.4 影响试验结果的重要因素

最大剂量试验需要皮内注射，因此试验样品的生物化学和物理性能可能影响试验的选择。试验样品如不能皮内注射，应采用替代方法（例如：局部应用）。应在无菌条件下制备浸提溶液，非无菌溶液不宜用于皮内应用。非无菌样品只能通过局部研究，因为试验样品的微生物污染的可能性可能会混淆最终的分析解释。如果不能保证试验样品的无菌性，但该样品仍被认为是未受污染的，则皮内给药可能是合理的。

介质的选择会影响试验材料的生物利用度。虽然没有一种介质是对所有的材料都是最理想的，但宜选择通过溶解和渗透达到最佳接触的介质。在不影响结果解释的前提下，试验材料的浓度宜采用尽可能高的浓度。大部分研究者更愿意试验样品为一种溶液，因为分散剂易于形成沉淀，使浸提液给药困难。用于皮内注射的介质包括盐溶剂、丙二醇和植物油。

不同实验室结果之间的变异性可有几种来源，下列因素在试验步骤中是很重要的：

- 环境试验条件；
- 动物试验部位；
- 毛发去除方法（剪/剃或化学脱毛法）；
- 敷贴设计类型；
- 试验材料数量；
- 封闭程度；
- 接触时间和动物读数。

动物应答性也取决于遗传因素和饲养条件。

虽然反应的严重程度有助于结果解释，但是与适宜对照比较在激发阶段具有阳性反应的实验动物的数量对预示某一阳性试验结果是必要的。激发阶段的临界反应最好通过再激发来证实。尚未发现组织病理学有助于试验结果的评价。

为确保再现性和敏感性，试验实验室应包括皮肤致敏阳性对照物质的试验，以验证试验系统并显示阳性反应。阳性对照最好是弱到中度的接触性变应原（例如：巯基苯并噻唑、己基肉桂醛和苯佐卡因）。然而，当证明一致性超过6个月或更长时间时，不需要在每次试验中包括阳性对照；但可以定期进行，不应超过6个月。在豚鼠试验中，通常用10只动物作为阳性对照。当每6个月进行阳性对照物质的试验的频率超过一次时，可使用更少数量的豚鼠。宜使用至少5只含有阳性物质的实验动物和5只对照组动物。见参考文献[1]。

**注：**为得到阳性反应，可对中度和强致敏剂（如甲醛和DNCB）进行稀释。但这不能保证同时能识别出医疗器械浸提液中的弱致敏剂。

## 6.5 豚鼠最大化试验

### 6.5.1 原理

单一化学物采用豚鼠最大剂量试验，对材料在试验条件下使豚鼠产生皮肤致敏反应的潜能做出评估。

### 6.5.2 试验样品制备

试验样品应按附录 A 的规定进行制备。试验样品的浓度在不影响结果解释的情况下应尽可能的高（见 7.5.4.2）。

**注：**附录 B 中给出了聚合物浸提液特定制备浸提方法。

### 6.5.3 动物与管理

应使用健康、初成年的白化豚鼠，雌雄不限，同一远交品系，试验开始时体重应为 300g～500g。雌鼠应未产并无孕。

应使动物适应环境，并按 ISO10993-2 的规定饲养。为了确定最佳的试验浓度（见 6.5.4.2），必要时宜用一组动物进行预试验。

试验材料如为粉剂或液体，应至少使用 10 只动物接触试验样品，至少使用 5 只动物作为对照组。如需要进行预试验应另取动物。

对于浸提液试验，应至少使用 10 只动物接触试验样品，至少使用 5 只动物作为溶剂对照组。如需要进行预试验应另取动物。

10只实验动物和5只对照动物如全部呈阴性反应，则再进行10只实验动物加5只对照动物试验也未必会出现阳性结果。但是，如出现任何疑似反应时，应进行再激发（见6.5.6），如仍有疑似反应，则要重新进行试验，最少采用20只实验动物和10只对照动物。

6.5.4 试验步骤

6.5.4.1 准备

在试验开始之前除去动物全部试验部位的被毛。

6.5.4.2 预试验

预试验是为了确定 6.5.4.3 主试验中所用试验样品的浓度。

用通用溶剂制备的未稀释的浸提液(例如：生理盐水或植物油)不需要进行预试验。

对于局部应用，将适宜的滤纸或吸水性纱布块（4cm<sup>2</sup>~8cm<sup>2</sup>）浸透试验样品，贴敷于除毛皮肤上，再用封闭式包扎带缠绕动物躯干固定。

用封闭式包扎带固定动物时，宜注意使动物能正常呼吸。首选采用弹性包扎带，宜由经过培训的专业人员进行操作。

将试验样品的系列稀释物局部应用于动物腹侧部位，至少采用2只动物。24h后除去封闭性包扎带和敷贴片，按表1给出的Magnusson 和Kligman分级标准评价贴敷部位的红斑与水肿反应程度。当使用非常用溶剂时，也可以探索皮内注射稀释物。

根据 ISO 10993-2，为主试验的局部诱导阶段所选择的最高浓度可导致轻度至中度红斑，但不对动物产生其他不良作用。医疗器械浸提液有可能达不到刺激限值，这种情况应采用尽可能高的浓度，例如未稀释浸提液。对于最终产品/医疗器械来说，只用未稀释浸提液可能足以满足试验。

为主试验的激发阶段选择的最高浓度不产生红斑(见表1)。

表 1 Magnusson 和 Kligman 分级

敷贴试验反应	等级
无明显改变	0
散发性或斑点状红斑	1
中度融合性红斑	2
重度红斑和/或水肿	3

应考虑通过注射弗氏完全佐剂(FCA)对所有动物进行预处理。

6.5.4.3 主试验

6.5.4.3.1 皮内诱导阶段

按图 1 所示(A、B 和 C)，在每只动物去毛的肩胛骨内侧部位成对皮内注射 0.1mL。

——部位 A：注射弗氏完全佐剂与选定的溶剂以 50:50(体积比)比例混合的稳定性乳化剂。选用生理盐水(符合 BP、USP 或中国药典要求)或浸提介质/溶剂。

——部位 B：注射试验样品（未经稀释的浸提液）；对照组动物仅注射相应溶剂。

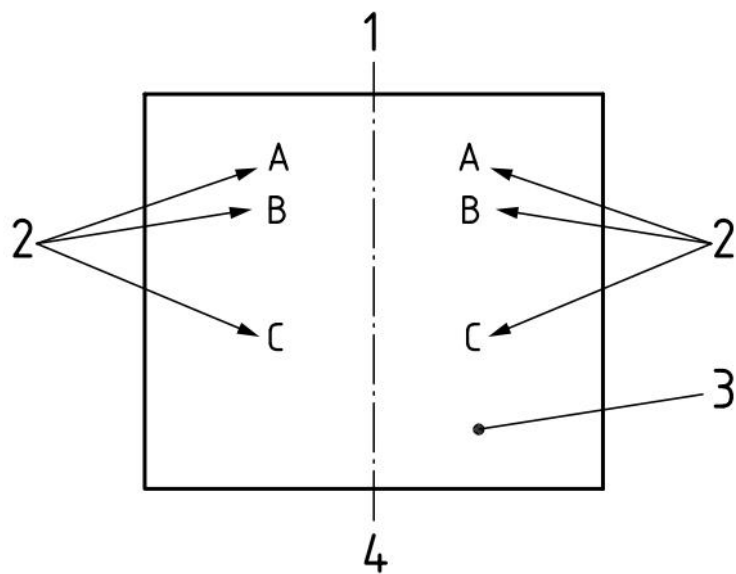
——部位 C：试验样品（部位 B 中采用的浓度）以 50：50 的体积比与弗氏完全佐剂和溶剂和溶剂/浸提液（A 部位使用的溶液）配制成的乳化剂；对照组注射含有佐剂的空白液的乳化剂。

6.5.4.3.2 局部诱导阶段



在皮内诱导阶段后（7±1）d，通过局部应用使用预试验中选择的浓度（若进行，见 6.5.4.2），局部使用约 8cm 的贴片，采用面积约 8cm<sup>2</sup> 的敷贴片（滤纸或吸水性纱布块）局部贴敷于每只动物的肩胛骨内侧部位，覆盖诱导注射点（见图 1）。如按 6.5.4.3.1 的最大浓度未产生刺激反应，应在局部敷贴应用前（24±2）h，试验区用 10% 十二烷基硫酸钠进行预处理，按摩导入皮肤。在局部诱导阶段之前，应去除任何剩余的 SDS，因为剩余的 SDS 会影响浸提液的吸收。用封闭式包扎带固定敷贴片，并于（48±2）h 后除去包扎带和敷贴片。

最好新鲜制备浸提液，浸提液贮存如超过（24±2）h，浸提液在贮存条件下的稳定性宜进行验证。对照组动物使用空白液同法操作。



标引序号说明：

- 1——头端；
- 2——0.1mL 皮内注射点（见 6.5.4.3.1）；
- 3——肩胛骨内侧部位；
- 4——尾端。
- A、B、C 的注射部位

图 1 皮内注射部位点部位

6.5.4.3.3 激发阶段

对于激发阶段的试验，应遵循以下程序：

- a) 所有试验和对照动物应在局部诱导阶段结束后（14±1）d 进行激发；
- b) 对于使用标准浸提介质的未稀释的试验浸提液（例如生理盐水或植物油）：
  - 1) 实验动物和对照动物均应使用试验样品和对照样品的浸提液；或
  - 2) 对照动物应使用未稀释的浸提介质。

在激发阶段，建议使用最高无刺激性浓度的试验样品。使用医疗器械浸提液进行试验时，一般不进行确定最高无刺激性浓度的浸提液的预试验。6.5.4.2 中规定使用常用溶剂的未稀释的浸提液不需要进行预试验。

对于选项b), 1) 允许人们确定在实验动物中观察到的任何皮肤反应是否是由于刺激而不是致敏。根据选项b), 1), 实验动物和对照动物都使用试验样品和对照样品浸提液。如果在对照组动物中观察到对试验浸提物的任何皮肤反应, 该反应可能是由于刺激而不是致敏, 因为对照组动物之前没有接触过试验浸提液。

根据选项b), 2), 对照动物不使用试验浸提液, 且实验动物不使用对照浸提液。如果在实验动物中观察到皮肤反应, 而没有进行预试验来确定浸提液的最高非刺激浓度, 则需要额外的试验来排除假阳性。

- c) 当使用非标准溶剂时, 所有试验和对照动物应同时使用试验样品和对照样品浸提液。
- d) 浸提液应局部应用于诱导阶段未处理的剃毛部位, 如每只动物的上腹侧, 使用适当的贴片或浸泡在 6.5.4.3.1 中选择的部位 B 试验样品的浓度。如果浓度是在 6.5.4.3.1 中选择的部位 B 并不是最高的无刺激性浓度, 则应使用预试验中确定的应使用的最高的无刺激性浓度(见 6.5.4.2)。应规定并论述用于浸透敷贴/腔室的浸提液的体积。
- e) 应使用封闭敷贴/腔室固定。
- f) 包扎带和敷贴片应在  $(24 \pm 2)$  h 后去除。

#### 6.5.5 动物观察

除去敷贴片后  $(24 \pm 2)$ h 和  $(48 \pm 2)$ h 观察试验组和对照组动物激发部位皮肤情况, 特别推荐在自然光或全光谱光线下观察皮肤反应。按表 4 给出的 Magnusson 和 Kligman 分级标准对每一激发部位和每一观察时间皮肤红斑和水肿反应进行描述并分级。为了将结果评价偏差降至最低, 特别推荐在不知试验处置信息的情况下进行读数。

宜在试验程序的每个步骤之前进行脱毛(见 6.5.4.1)。然而, 当动物已在前一天脱毛, 在激发或再激发后可能没有必要再次脱毛。

#### 6.5.6 结果评价

按 Magnusson 和 Kligman 分级标准, 对照组动物分级小于 1, 而试验组中分级大于或等于 1 时一般提示致敏。如对照组动物分级大于或等于 1 时, 试验组动物反应超过对照组中最严重的反应则认为致敏。如为疑似反应, 推荐进行再激发以确认首次激发结果。试验结果显示为试验和对照动物中的阳性激发结果的发生率。

偶而, 试验组动物出现反应的动物数量多于对照组动物, 但反应强度并不超过对照组, 在此情况下, 可能需要在首次激发后 1 周~2 周进行再次激发, 以明确反应。所用方法与首次激发相同, 采用动物未试验的一侧部位。

#### 6.5.7 试验报告

试验报告应包括:

- a) 对试验材料或器械的描述;
- b) 试验样品或材料的预期用途/应用;
- c) 所使用的标准(包括其出版年份);
- d) 对制备试验样品或试验材料或器械所用方法的详细说明;
- e) 实验动物的描述;
- f) 试验部位的接触方法;
- g) 与程序之间的任何偏差;

- h) 试验部位标记和读数;
- i) 观察记录;
- j) 结果评估;
- k) 试验的日期。

## 6.6 封闭贴敷试验(Buehler 试验)

### 6.6.1 原则

对材料在试验条件下产生豚鼠皮肤致敏反应的潜在性做出评估。

### 6.6.2 试验样品制备

试验样品应按附录A的规定进行制备。在不影响结果解释的情况下试验样品浓度应尽可能的高(见 7.6.4.2)。如试验样品的形状和尺寸适宜,局部应用器械(如电极)可原样贴敷。

### 6.6.3 动物与管理

应使用健康、初成年的白化豚鼠,雌雄不限,同一远交品系,试验开始时体重为 300g~500g。如使用雌鼠,应未产并无孕。

应使动物适应环境,并按 ISO10993-2 的规定饲养。为了确定试验样品的浓度(见 6.5.4.2),宜用一组动物进行预试验。

粉剂或液体试验时,应至少使用 10 只动物接触试验样品,至少使用 5 只动物作为对照组。如需要进行预试验应另取动物。

浸提液试验时,应至少使用 10 只动物接触每一浸提液,至少使用 5 只动物作为每一溶剂对照组。如需要进行预试验应另取动物。

10 只实验动物和 5 只对照动物如全部呈阴性反应,则再进行 10 只实验动物加 5 只对照动物试验也未必会出现阳性结果。但是,如出现任何疑似反应时,应进行再激发(见 6.5.6),如仍有疑似反应,则要重新进行试验,最少采用 20 只实验动物和 10 只对照动物。

### 6.6.4 试验步骤

#### 6.6.4.1 准备

在试验开始之前彻底剪除或剃除动物全部试验部位被毛。

#### 6.6.4.2 预试验

预试验是为了确定 6.6.4.3 主试验中所用试验样品的浓度。

预期局部使用的医疗器械和采用通用溶剂制备未经稀释的浸提液不需要进行预试验。

对于局部应用,将适当尺寸的敷贴片(滤纸或吸水性纱布)浸透试验材料或浸提液,贴敷于动物的除毛部位,再用封闭性包扎带固定(6±0.5)h。可能要对每只动物采用固定方法以保证试验部位的封闭性,试验中如使用缠绕法固定时宜评价其适宜性。除去敷贴片后(24±2)h 和 (48±2)h,按表 1 给出的 Magnusson 和 Kligman 分级标准评估试验部位皮肤红斑和水肿反应程度。

每种试验样品局部贴敷采用 4 种浓度,使用合适的敷贴片贴敷于至少 2 只动物的两腹侧部。(6±0.5)h 后除去包扎带和敷贴片。除去敷贴片后(24±2)h 和 (48±2)h,按表 4 给出的 Magnusson 和 Kligman 分级标准评估试验部位皮肤红斑和水肿反应程度。。

选择:

- a) 最高浓度在主试验的诱导阶段仅出现轻微红斑，但不对动物产生其他不良作用；
- b) 最高浓度在主试验的激发阶段不出现红斑。

#### 6.6.4.3 主试验

##### 6.6.4.3.1 诱导阶段

按7.6.4.2 a)选定的试验样品浓度，将合适的敷贴片浸透试验样品，局部贴敷于每只动物的左上背部位。 $(6 \pm 0.5)$ h后除去任何封闭式包扎带类的固定物和敷贴片。1周中连续3d重复该步骤，同法操作3周。对照动物仅使用空白液同法操作。

##### 6.6.4.3.2 激发阶段

最后一次诱导贴敷后 $(14 \pm 1)$  d，用试验样品对全部实验动物和对照动物进行激发。按 7.6.4.2 b)选定的试验样品浓度，将合适的敷贴片浸透试验样品单独局部贴敷于每只动物去毛的未试部位。 $(6 \pm 0.5)$ h后除去固定物、封闭包扎带和敷贴片。

#### 6.6.5 动物观察

如有必要，首次激发后或再次激发接触后 $(24 \pm 2)$ h，

- a) 用市售脱毛剂给动物脱毛，按制造商的说明书将脱毛剂涂到试验和周围部位；或
- b) 剃去激发部位及其周围部位的动物被毛。

用温水彻底清洗脱毛区，并用毛巾擦干动物后放回笼中。在去除试验敷贴后 $(24 \pm 2)$  h 和脱毛后至少 2h，按表 1 给出的分级标准对试验部位评分，并在除去激发敷贴片后 $(48 \pm 2)$ h 再进行评分。特别推荐使用自然或全光谱照明，以充分显示皮肤反应。为了将结果评价偏差降至最低限度，特别推荐在不知试验处置信息的情况下进行读数。

#### 6.6.6 结果评价

表1给出的Magnusson 和Kligman分级标准适用。

对照组动物分级小于 1，而试验组中分级大于或等于 1 时一般提示致敏。如对照组动物分级大于或等于 1 时，实验动物反应超过对照动物中最严重的反应则认为致敏。推荐进行再激发以确认首次激发结果。试验结果表现为试验和对照动物中的阳性激发结果的发生率。

偶而，试验组中出现反应的动物数量多于对照组，但反应的强度不超过对照组。在此情况下，可能有必要进行再次激发以明确判定其反应。再次激发应在首次激发后 1 周~2 周进行，方法与首次激发相同，只是应贴敷于动物腹侧未试验部位。

这种情况下推荐采用新的阴性对照组。

#### 6.6.7 试验报告

试验报告应包括:

- a) 对试验材料或器械的描述；
- b) 所使用的标准（包括其出版年份）；
- c) 试验材料或器械的预期用途或应用情况；
- d) 制备试验样品和材料所用方法的详细描述；
- e) 实验动物的描述；

- f) 试验部位接触方法;
- g) 程序之间的任何偏差;
- h) 试验部位标记和读数;
- i) 观察记录;
- j) 结果评估, 包括统计学方法;
- k) 试验日期。

## 7 解释试验结果的关键因素

本文件中的试验是开发安全性产品的重要手段, 并应按照适当的质量保证措施(例如: ISO/IEC 17025或 GLP), 并由受过培训的人员进行解释。应提供证据表明, 计划、进行和解释试验的人员通过对所承担任务的培训和经验具有适当的资格。

由于试验步骤中使用的试验材料总量可能比实际应用量要大, 因此用任何方法检验出的刺激和皮肤致敏迹象时不一定表明试验材料或器械不能使用。用任何描述过的步骤检验出不良反应表明需进行进一步分析, 即允许预期人体接触的风险评估。

本文件中所述程序所产生的预测性试验结果不能独立存在, 需要与其他信息一起进行解释, 以评估致敏反应或其他形式的免疫毒性的风险。一个阴性的试验结果并不排除一种产品会引起皮肤过敏反应的可能性。这些结果宜与其他信息来源进行比较, 例如:

- 行业和消费者抱怨数据;
- 包含相似组件器械方面的经验;
- 皮肤病诊所的诊断试验结果;
- 回顾性流行病学数据。

**附 录 A**  
**(规范性)**  
**皮肤致敏试验材料的制备**

**A.1 总则**

在进行试验以及解释刺激/致敏试验数据时,应考虑医疗器械在人体应用时的接触性质、程度、频率、时间和条件等因素,对这些试验最关键的因素之一就是试验材料的制备。

**A.2 直接接触材料****A.2.1 固体试验材料**

有一定适宜物理形态的固体材料(如片材和薄膜)应不加改变直接用于试验。可制成 2.5cm×2.5cm 的样品,厚度近似实际使用要求但不超过 0.5cm。同法制备适用的阴性对照样品。阴性对照样品在物理性状上应与试验材料近似而且无刺激性,在没有发现更适宜的对照品的情况下,吸水性纱布可作为一种代用品。

固体也可研磨成粉状,但应谨慎操作以防止发生污染,或者用水或一种适宜的无刺激性溶剂充分湿化以保证与组织的良好接触性。陶瓷制品需要研磨成粉时应注意的是,陶瓷研磨成粉剂后,其物理化学特性可能发生了改变,对其生物学活性方面具有潜在的显著影响。

粉剂(如高吸水剂)应采用直接附着或用适当的溶剂调成糊状物后进行试验。对照应采用相同的溶剂与经湿化、稀释或悬浮的试验材料平行进行评价。

注:表面积和/或微粒尺寸是生物学反应中的重要因素,如吞噬作用,这种作用在炎症和免疫应答中扮演一种重要的角色。

**A.2.2 液体试验材料**

液体应不加稀释直接进行试验,如不可行采用适当溶剂稀释后试验。对照应采用相同的溶剂与稀释的试验液平行进行评价。

**A.3 试验材料的浸提液**

固体试验材料也可制备成浸提液进行试验。如用浸提液进行试验,应按 ISO10993-12 的规定使用极性、非极性和/或其他适宜的溶剂制备浸提液,还应给出浸提液方法适宜性的说明。

空白样品采用浸提溶剂,应与试验材料浸提液平行进行评价。

注:对于高分子材料,一种可选的浸提方法见附录B。

**A.4 溶剂**

试验材料如要进行浸提、稀释、悬浮或湿化处置,应使用适当的无刺激性溶剂。ISO10993-12中列出了适用的溶剂。

**A.5 无菌试验材料**

最终产品如出厂时为无菌状态,试验前则应采用相同程序对试验材料进行灭菌处理。用环氧乙烷灭菌的产品存在一技术问题,即环氧乙烷及其反应产物在 GB/T16886 的本部分所描述的试验中会产生生物学反应。

当试验中观察到刺激反应时，为了能区别试验材料和环氧乙烷残留物所致的反应，应考虑对器械进行环氧乙烷灭菌前和灭菌后反应的评价。

## 附录 B

### (资料性)

#### 高分子试验材料浸提物的制备方法

##### B.1 总则

本附录为在GPMT中使用的聚合物试验材料的浸提液的制备提供了指导。浸提液的制备最初在参考文献[3]中描述,附加信息在ISO 10993-12:2021中D.2“在彻底浸提用于生物试验的聚合物医疗器械时应考虑的要点”中提供。

##### B.2 制备方法

###### B.2.1 预浸提

对试验样品进行预浸提步骤以确定用于GPMT的最适宜的浸提液制备。

推荐浸提溶剂采用甲醇和丙酮。试验样品切成小块(可能时),置于两个烧瓶中。每个烧瓶内加入10倍至20倍体积的溶剂(即每克试验样品加10mL至20mL溶剂),在室温下振摇烧瓶进行浸提。在24h至72h浸提期间振摇三次[即 $(4\pm1)$ h、 $(8\pm1)$ h、 $(24\pm2)$ h],每次采用同体积新鲜溶剂。采集每一浸提期的浸提液并汇集到一起,通过蒸发溶剂获取残留物。

基于获取到的残留物质量确定最适合试验的溶剂。宜测定残留物百分率,选择获取最高残留量的溶剂为致敏试验浸提溶剂。

加入橄榄油、丙酮、甲醇或二甲基亚砜(DMSO)测定残留物的溶解度,溶解大部分残留物的溶剂用做GPMT的试验介质。

注:如无法获取丙酮或甲醇中的试验样品溶解物或降解物,或无法获取足够的残留量,可采用 $n$ -正己烷或环己醇和丙醇1:1的混合物作为浸提溶剂。

###### B.2.2 最终浸提

###### B.2.2.1 概述

从有机溶剂浸提物中制备试验液有两个方法。

方法1适用于当试验样品溶剂浸提获取到的残留量与试验样品重量相对较高,由于已经获取到足够的残留量,方法1适用。此外,特别推荐方法1用于评价反复使用的医疗器械的风险,见参考文献[14]。

当试验样品溶剂浸提获取到的残留量或试验样品重量相对较低,方法2适用。试验样品重量低的产品如隐形眼镜和人工晶体。

对方法1和方法2两种方法,溶剂与试验样品浸提平行制备,溶剂总量与试验样品浸提期间所用总体积相等,采用与试验浸提液相同的浓缩步骤,这种溶剂空白用作试验各阶段的阴性对照

###### B.2.2.2 按方法1 试验样品制备

对方法1,浸提时将适宜的10倍至20倍体积的溶剂(依据预浸提试验中确定的)覆盖试验样品,并在室温下进行搅拌(振摇)。将溶剂采集到另外的烧瓶中。溶剂置换三次[如 $(4\pm1)$ h、 $(8\pm1)$ h、 $(24\pm2)$ h浸提后],并根据试验材料浸出物的沥滤和稳定性方面的情况,在24h至72h浸提期间在室温下反复搅拌。

通过蒸发采集的溶剂获取残留物,在可能的最低温下使用旋转蒸发器,在低压强下进行可控式蒸发。

如同预浸提试验中稳定性试验所确定的,将残留物溶入适宜的介质(橄榄油/丙酮/乙醇/DMSO)内,制备GPMT皮内诱导阶段和局部诱导阶段所用的10%(w/w)和20%(w/w)的试验液。



在GPMT激发阶段用介质制备10%（w/w）的试验液，再用介质稀释为1%、0.1%、0.01%和0.001%的试验液。

### B.2.2.3 按方法2 试验样品制备

对方法2，浸提时将适宜的10倍至20倍体积的溶剂（依据预浸提试验中确定的）覆盖试验样品，并在室温下振摇（ $24\pm 2$ ）h。将溶剂采集到一个烧瓶中。在24h至72h期间重复浸提步骤三次，每次采用同体积新鲜溶剂。将浸提液汇集到一个烧瓶内并对溶剂进行蒸发。

对皮内诱导阶段，蒸发获取的浸提液，直至浸提液的残留毫升数等同于或稍低于所用样品的原始克数的一半（即如果浸提10g试验样品，则混合溶剂浸提液蒸发至约5mL），或完全蒸发获取残留物。在获取到残留物时，将其溶于适宜的介质（依据预浸提试验中确定的）中至5mL，该溶液视为200%试验液。

此外，用介质稀释200%试验液以制备100%试验液。

局部诱导阶段采用100%试验液。对皮内和局部诱导两个阶段，200%和100%试验液的介质替换为橄榄油，用同体积的橄榄油混合试验液，并在一股氮气下蒸发介质。

GPMT激发阶段采用100%、50%、25%、12.5%和6.25%试验液。用介质稀释100%试验液，得到50%、25%、12.5%和6.25%试验液。激发阶段不用橄榄油替换试验液的介质。

## B.3 豚鼠最大化试验

### B.3.1 概述

除了下列描述的激发阶段，应按6.5的描述进行GPMT。采用溶剂浸提方法进行激发时不宜用封闭贴敷。

### B.3.2 试验阶段

封闭贴敷应用两周后，全部试验和对照动物用试验样品进行激发。

对方法1，将10%（w/w）、1%和0.1%试验液的等份0.1mL局部应用于每一试验和阴性对照动物的右腹侧。另外，将0.01%和0.001%试验液的等份0.1mL和阴性对照介质局部应用于每一试验和阴性对照动物的左腹侧。

对方法2，将100%、50%和25%试验液的等份0.1mL局部应用于每一试验和阴性对照动物的右腹侧。另外，将12.5%和6.25%试验液的等份0.1mL和阴性对照介质局部应用于每一试验和阴性对照动物的左腹侧。

对方法1和方法2两种方法，采用溶于乙醇的0.1%DNCB的等份0.1mL应用于阳性对照动物右腹侧，左腹侧应用乙醇。

注：可同样进行封闭激发。

## 附录 C

(资料性)

## 皮肤致敏的非动物方法

## C.1 简介

## C.1.1 关于皮肤致敏试验的替代方法的背景

为了在毒性试验中减少或替代动物的使用，现在已经发展出了很多非动物试验方法。尽管这些方法在用于检测化学物时被认可，但近年来人们逐渐有兴趣将这些方法应用于药物和医疗器械的安全性评价。对于皮肤致敏，体内试验通常选择动物或人进行试验，因为可以在活体对象中直接观察到不良反应结果（即接触性皮炎）。然而，随着深入了解皮肤致敏过程中的分子和细胞机制，已经发展出的非动物试验用于评价化学物或材料<sup>[57]</sup>的皮肤致敏潜力。这些分析方法可分为三类：

- 化学分析方法：主要涉及物理化学测量方面的研究或程序，而非生物学试验；
- 生物信息学分析方法：使用计算机模拟进行的研究或程序[例如：分子或细胞的计算机模型，精确模拟其行为，或定量结构活性关系(QSAR)评价]；
- 体外分析方法：在可控条件下的非活体的研究或程序（例如：培养于培养皿中的细胞培养物）。

迄今为止，这些类别中经过验证的方法都不能完全复制在生物体中，复杂而又精确的分子、细胞和器官运行机制的网络。因此，当单独考虑时，每种分析方法都不能完全复制最终的不良结果。所以，对一种化学物质皮肤致敏能力的预测需要运用结合多种独立试验的试验策略<sup>[66][70]</sup>。

## C.1.2 OECD关于皮肤致敏的有害结局通路

OECD已经描述出了导致皮肤致敏的连锁事件，包括诱导皮肤致敏过程中在分子、细胞、组织和器官水平上的影响<sup>[5]</sup>。这一系列事件形成结构式的框架，从中可以详细的读出诱导机体产生有害结局时（人或动物）处于路径中的细节。这一系列的事件被称为AOP。AOP以一种线性的方式将两点之间的一个或多个基于现有知识的关键事件(KE)联系起来——一个分子启动事件(MIE)和有害结局(AO)<sup>[56]</sup>。AOPs是毒理学知识库的核心元素，旨在建立化学风险评估中的机制推理。

皮肤致敏AOP由接触或吸收致敏剂开始。当致敏剂穿透皮肤角质层后，在分子、细胞和器官水平上发生一系列事件，最终导致机体的不良终点是过敏性接触性皮炎或接触性过敏。皮肤致敏AOP中的四个关键事件是：

- 关键事件 1：与皮肤蛋白的共价结合：以分子穿透角质层后不可逆的形成半抗原蛋白复合物作为起始事件。在动物中，这一事件与特定记忆 T 细胞的细胞反应有关。
- 关键事件 2：角质形成细胞反应：这一关键事件涉及生化通路的激活,包括角质形成细胞中的炎症介质反应以及与细胞信号通路相关的基因表达变化，如抗氧化/亲电反应元件(ARE)。
- 关键事件 3：树突状细胞的激活：半抗原蛋白复合物形成后的详细生化事件尚未完全阐明。然而，已知所涉及的通路炎症相关，如丝裂原活化蛋白激酶信号通路和氧化应激反应通路，特别发生在角质形成细胞和树突状细胞中。对细胞和组织水平上的影响尚不完全清楚，但涉及到的表皮反应包括：
  - 1) 角质形成细胞、特化表皮树突状细胞(即朗格汉斯细胞)和真皮树突状细胞对化学致敏剂的免疫识别；
  - 2) 特定细胞表面标志的反应性表达，如粘附分子、趋化因子和 IL-1 $\beta$ 或 IL-12p70，通常被视为树突状细胞成熟的证据。
- 关键事件 4：T 细胞增殖：在器官水平（淋巴结和皮肤），反应如下：

- 1) 树突状细胞迁移到淋巴结，随后由主要组织相容性复合体(MHC)分子将抗原呈递给幼稚 T 淋巴细胞(T 细胞)；
- 2) T 细胞分化和增殖成过敏原特异性的效应 t 细胞和记忆 t 细胞。

最终的生理反应是皮肤致敏。机体的关键反应是在接受物质后的激发阶段产生的皮肤炎症。这种反应与在诱导阶段产生的特定记忆T细胞的活化有关。对哺乳动物的影响，在人类中的表现是过敏性接触性皮炎，在啮齿动物中表现的是接触性过敏<sup>[65]</sup>。

C.1.3 整合测试与评估方法

整合测试与评估方法是一种实用的、基于科学的化学危害表征方法，它依赖于对现有信息和使用试验策略生成的新信息进行综合分析。为了预测化学物质的皮肤上致敏潜力，动物替代试验方法将与现有的相关信息相结合，以充分表征生物终点。整合方法可以利用现有的化学和材料的可靠信息并结合数据来确定致敏终点，这些数据包括通过生化（化学）、计算机（生物信息学）和/或基于细胞(体外)的方法充分预测材料或化学物质的毒性所得到的。有时，整合方法可能需要替代动物方法产生的额外数据，以被接受作为特定毒性终点的预测指标。

体外皮肤致敏试验的示例包括KeratinoSens™, LuSens, U-SENS™, the human Cell Line Activation Test (h-CLAT), and the IL-8 Luc Assay。直接肽反应性试验(DPRA)是化学物质致敏皮肤的一个例子。而QSAR Toolbox和Times MEtabolism Simulator platform是生物信息学用于预测皮肤致敏的示例<sup>[56][67]</sup>。其中的几种方法已经被结合到整合测试与评估方法中，以评价化学物或材料的皮肤致敏潜力。

为了将整合测试与评估方法的指导原则与法规标准化，OECD为报告已定义的方法(DA)和独立信息来源<sup>[57][67]</sup>提供了原则和模板。DA由一个固定的数据解释程序(DIP)组成，该程序应用于由一组已定义的信息源生成的数据，它所产生的结果既可以单独使用，也可以与IATA内的其他信息源一起使用，以满足特定的监管需求。

为了获得IATAs对皮肤致敏潜力的监管认可，整合方法包括已定义的方法(DA)，即对于每个DA，相关信息和特定的非动物方法被明确描述，并有一个解释数据的程序提供了这些确定的方法。因此，DAs是基于策略的规则，特定的方法一旦被描述、验证、标准化、接受<sup>[61]</sup>，就不需要专家进行判断。

OECD指导文件256：2017，附录I<sup>[124]</sup>（见表C.1)概述了12个关于皮肤致敏的说明性案例研究。目前OECD正在考虑将这些研究纳入将来的试验指南“明确的皮肤致敏方法”。

表 C.1 OECD 指导文件 256：2017，附录 I 的案例研究

	案例研究	目的
1	基于有害结局通路中，综合2/3试验策略来识别皮肤致敏危害的方法(BASF)	危险识别
2	皮肤致敏危害识别(RIVM)的顺序试验策略(STS)	危险识别
3	皮肤致敏的非试验方法(G.Patlewicz)	危险识别
4	用于识别皮肤致敏危害的叠加元模型（欧莱雅）	危险识别
5	用于识别皮肤致敏危害的综合决策策略(ICCVM)	危险识别
6	形成皮肤致敏危害预测分类树的共识(ECJRC)	危险识别

表C.1 OECD指导文件256：2017，附录I的案例研究（续）

案例研究	目的
------	----

案例研究		目的
7	基于关键事件1+2的皮肤致敏剂的效力预测：结合多肽动力学反应性数据和KeratinoSens®的数据(Givaudan)	效力预测
8	预测LLNAEC3的人工神经网络模型（资生堂）	效力预测
9	用于识别皮肤致敏剂危害和效力（P&G）的Bayesian network DIP (BN-ITS-3)	效力预测
10	基于化学和体外数据的致敏效力分类的顺序试验策略（STS）(Kao Corporation)	效力预测
11	基于生物信息学、化学和体外数据的致敏效力分类的综合试验策略 (ITS) (Kao Corporation)	效力预测
12	皮肤过敏风险评估DIP(Sara)（Unilever）	效力预测

## C.2 皮肤致敏的体外试验方法

### C.2.1 概述

附录C.2提供了体外皮肤致敏试验的总结，已被纳入最近的综述和国际评价研究<sup>[58][59][65][68]</sup>。

### C.2.2 试验方法

#### C.2.2.1 DPRA

DPRA是一种化学方法，通过计算包含有半胱氨酸或赖氨酸的合成肽的消耗量，定量分析化学物的反应性。计算消耗百分比值，通过预测模型将该化学物质归类为皮肤致敏剂或非致敏剂。见表C.2。

表 C.2 DPRA

关键事件1：分子共价结合蛋白	
OECD指南	OECD TG 442C <sup>[75]</sup>
表现 (是/否)	准确率80%，敏感性80%，特异性77%
试验系统	与化学物在22.5℃至30℃孵育24h后，测定合成肽中剩余的半胱氨酸或赖氨酸的浓度。为了便于检测，合成的多肽中含有苯丙氨酸。多肽浓度的测定采用高效液相色谱(HPLC)，通过梯度洗脱和220nm的紫外波长检测。
试验原理	测定半胱氨酸和赖氨酸的百分比消耗值，并用于一个预测模型。该模型将化学物质的反应性分为四个等级，并根据分级将它们归类为皮肤致敏剂或非致敏剂。
结果读数	使用高效液相色谱（HPLC），波长220nm检测多肽浓度
接触时间	24 h
适用性	不适用于检测金属化合物，因为它们可以通过共价结合以外的机制与蛋白质反应。检测的化学物质需要完全溶解在适当溶剂中，浓度为100mM。如果已知混合物的成分，则混合物也适用。
医疗器械应用	没有数据。DPRA适用于乙腈、水、异丙醇和丙酮。然而，它可能不适用于医疗器械中的非极性溶剂，如芝麻油、棉籽油或橄榄油。由于在该试验中，化学物相较于合成多肽是过量的。因此该试验可能不适用于检测医疗器械浸提液中的皮肤致敏剂。
请参见参考[74]到[76]。	

KeratiNoSens™<sup>2)</sup>

KeratiNoSens™方法通过应用一种永生的人类角质形成贴壁细胞系，该细胞系含有一个荧光素酶报告基因，由人类AKR1C2基因的抗氧化反应元件(ARE)控制，目前已知皮肤致敏剂可以上调该基因的表达。见表C.3。

表 C. 3 KeratiNoSens™

关键事件2：表皮角质形成细胞的激活	
OECD指南	OECD TG 442D <sup>[79]</sup>
表现 (是/否)	准确性77%，敏感性78%，特异性79%
试验系统	KeratiNoSens™转基因细胞系：永生化的贴壁细胞系，来源于人类角质形成细胞，可以在人类AKR1C2基因的ARE控制下，具有稳定的荧光素酶报告基因
试验原理	KeratiNoSens™细胞系包含荧光素酶基因，受到与ARE元件融合的组成型启动子的转录控制。荧光素酶信号表明亲电皮肤致敏剂可以激活内源性Nrf2依赖基因。荧光素酶基因的诱导表达是通过测定荧光素酶底物产生的荧光来定量确定的。如果待测化学物质能够诱导荧光素酶的表达在统计学上显著升高，则该待测化学物质被认为是皮肤致敏剂（增加50%），同时该化学物的浓度不会导致细胞活力的显著降低。
结果读数	荧光素酶基因诱导的定量测定（通过发光试验）
接触时间	48 h
适用性	KeratiNoSens™方法适用检测包含有多种有机官能团、反应机制、皮肤致敏能力和物理化学性质的化学物质。此外，该方法适用于可溶性化学物质或在培养基中能够形成稳定分散系的化学物质(例如悬浮液或胶体)。
医疗器械应用	没有数据。KeratiNoSens™适用于DMSO和水溶剂，但可能不适用于医疗器械中的非极性溶剂，如芝麻油、棉籽油或橄榄油，因为它们的logP值超过15.0。
请参见参考[77]到[80]。	

C. 2. 2. 2 LuSens

LuSens方法通过应用一种永生的人类角质形成细胞系，该细胞系含有荧光素酶报告基因，由大鼠NQO1基因的抗氧化反应元件(ARE)控制，目前已知皮肤致敏剂可以上调该基因的表达。见表C.4。

表 C. 4 LuSens

关键事件2：表皮角质形成细胞的激活	
OECD指南	OECD TG 442D
表现 (是/否)	准确率为74%，敏感性为74%，特异性为74%

表C.4 LuSens（续）

关键事件2：表皮角质形成细胞的激活	
试验系统	LuSens转基因细胞系：永生化的贴壁细胞系，来源于人类角质形成细胞，可以在大鼠NQO1基因的

关键事件2：表皮角质形成细胞的激活	
	ARE控制下，具有稳定的荧光素酶报告基因。
试验原理	LuSens转基因细胞系包含一个荧光素酶报告基因，受到与ARE元件融合的组成型启动子的转录控制。荧光素酶信号表明亲电皮肤致敏剂可以激活内源性Nrf2依赖基因。荧光素酶基因的诱导表达是通过测定荧光素酶底物产生的荧光来定量确定的，来作为细胞与亲电皮肤致敏剂接触后细胞中Nrf2转录因子活化的指标。
结果读数	荧光素酶基因诱导的定量测定（通过发光试验）
接触时间	48 h
适用性	LuSens方法适用检测包含有多种有机官能团、反应机制、皮肤致敏能力和物理化学性质的化学物质。此外，该方法适用于可溶性化学物质或在培养基中能够形成稳定分散系的化学物质(例如悬浮液或胶体)。
医疗器械应用	没有数据。KeratinoSens™适用于DMSO和水溶剂，但可能不适用于医疗器械中的非极性溶剂，如芝麻油、棉籽油或橄榄油，因为它们的logP值超过15.0。
请参见参考[81]到[84]。	

### C.2.2.3 SENS-IS

SENS-IS方法通过应用人的皮肤模型（Episkin® RhE或者SkinEthic™ RHE<sup>2)</sup>），根据关键事件2（KE2）评估相关基因的表达情况，检测化学物或混合物的致敏性的研究模型。SENS-IS方法按效力类别将皮肤致敏剂分类<sup>[84]</sup>。SENS-IS试验已在行业主导的环境中得到验证<sup>[86][87]</sup>目前正在由EURL-ECVAM进行评价。见表C.5。

表 C.5 SENS-IS

关键事件2：表皮角质形成细胞的激活	
OECD指南	项目4.107：新指南：用于测定皮肤致敏效力的3D重建表皮的基因毒理学方法-SENS-IS试验
表现 (是/否)	准确性为96.6%，敏感性为97.7%，特异性为95.2%
试验系统	重建的人表皮(RhE)模型Episkin®RhE或SkinEthic™ RHE <sup>3</sup> （EPISKIN）
试验原理	测定两组基因的基因表达量：其中一组（氧化还原组）有17个基因，包含抗氧化反应元件的启动子，监测氧化还原保护信号的诱导是通过皮肤致敏剂与半胱氨酸氨基酸Keap1-NRF2复合物相结合。第二组(SENS-IS组)包括21个参与炎症、危险信号和细胞迁移的基因，负责解决由化学致敏物诱发树突状细胞活化过程中的复杂级联事件。
结果读数	定量逆转录聚合酶链反应（qRT-PCR）测定64个相关基因表达
接触时间	接触15min，然后冲洗RhE组织，孵育6h。
适用性	SENS-IS方法通过应用3DRhE组织，可以更好地考虑具有不同溶解度或物理状态的产品的皮肤渗透步骤。SENS-IS不仅可以定量纯化学物，还可以定量天然产物、混合物和成品。

2) Episkin® RhE 和 SkinEthic™ RHE 是适合的市售产品的多个实例。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对这些产品的认可。

3) Episkin® RhE 和 SkinEthic™ RHE 是适合的市售产品的多个实例。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对这些产品的认可。

表C.5 SENS-IS（续）

关键事件2：表皮角质形成细胞的激活	
医疗器械应用	SENS-IS方法适用于极性（生理盐水）和非极性（芝麻油）溶剂，因此可以适用于医疗器械中的浸提介质进行试验。在一项评价医疗器械浸提液的皮肤致敏性的概念验证研究中，将五种已知的皮肤致敏剂添加至医疗级硅胶和阴性对照中，随后进行分析。所有极性（生理盐水）和非极性（芝麻油）溶剂的浸提液，均能正确识别出其中的皮肤致敏剂或非致敏剂。
请参见参考[85]到[91]。	

## C.2.2.4 IL-18 RhE

在RhE的气液界面上应用一种化学物质后，通过测量基础IL-18的释放量来评价该化学物质的皮肤致敏性，见表C.6。

表 C.6 IL-18 RhE 分析

关键事件2：表皮角质形成细胞的激活	
OECD指南	无
表现 (是/否)	在一个有限集合（<10）的化合物不同模型试验。安德烈斯以及其他人士计算了19种化学物。本文讨论了五种预测模型所给出的不同的结果。
试验系统	重建人表皮模型，SkinEthic™RHE（EPISKIN），VUmc-EE，Ep-iCS® <sup>a</sup> （CellSystem）和EpiDerm™（MatTekCorp） <sup>b</sup>
试验原理	在与化学物接触结束时，对表皮进行细胞活力试验，并用维持培养基收集IL-18进行ELISA试验。
结果读数	在RhE培养的培养基中，用ELISA定量IL-18；通过MTT试验测定细胞活力
接触时间	24 h
适用性	该试验方法适用于检测可溶性接触性过敏原和阳离子金属的皮肤致敏潜力 <sup>[94]</sup> 。
<sup>a</sup> VUmc-EE，EpiCS®（细胞系统）是合适的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不表示对这一产品的认可 <sup>b</sup> EpiDerm™ EPI—200（MatTek 公司）是合适的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不表示对这一产品的认可。	

C.2.2.5 EpiSensA<sup>4)</sup>

表皮致敏试验“EpiSensA”应用RhE组织模型。该方法基于皮肤致敏可以诱导相关标记基因的表达，该基因在皮肤致敏后可以诱导角质细胞表现出炎症反应和细胞保护机制相关反应。见表C.7。

表 C.7 EpiSensA

关键事件2：表皮角质形成细胞的激活	
OECD指南	无
表现 (是/否)	准确率为90%，敏感性为94%，特异性为78%

表C.7 EpiSensA（续）

4) EpiSensA是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对这一产品的认可。

关键事件2：表皮角质形成细胞的激活	
试验系统	重建人表皮模型, LabCyte EPI-MODEL 24 (Japanese Tissue Engineering Co.,Ltd) <sup>a</sup> 和EpiDerm™ EPI-200(MatTek Corp)
试验原理	该方法基于皮肤致敏后诱导多种标记基因的表达(ATF3、IL-8、DNAJB4和GCLM), 该类基因与角质细胞两类反应有关(炎症反应和细胞保护)。该标记基因的机制相关性已通过体外调节角质形成细胞反应的关键分子而得到证实(P2X7为炎症和Nrf2的细胞保护反应)。在人角质形成细胞中ATF3和IL-8, 或DNAJB4和GCLM基因被2,4-二硝基氯苯诱导上调表达, 被P2X7、特异性拮抗剂KN-62, 或通过Nrf2siRNA所抑制, 分别支持标记基因的机制相关性。
结果读数	通过定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)定量分析4个标记基因的表达
接触时间	接触6h
适用性	EpiSensA可以是一种基于机制的皮肤致敏试验, 适用于广泛的化学物质, 包括亲脂性化学物质和/或促半抗原。
医疗器械应用	没有数据。由于这种试验方法使用了RhE组织, 它可能适用于医疗器械中的极性和非极性浸提介质。
<sup>a</sup> LabCyteepi-24 型(日本组织工程有限公司)是适合的还是受产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件使用者, 并不表示对这一产品的认可。	

### G.2.2.6 SenCeeTox®<sup>5)</sup>

SenCeeTox®方法通过应用3DRhE组织, 评价角质形成细胞中与致敏相关的11个基因的表达。基因表达的增加, 以及反应性和细胞毒性决定了皮肤致敏效力。见表C.8。

表 C.8 SenCeeTox®

关键事件2：表皮角质形成细胞的激活	
OECD指南	无
表现 (是/否)	准确性84%, 敏感性81%, 特异性92%
试验系统	重建人表皮EpiDerm™ EPI-200(MatTek Corp)和SkinEthic™RHE (EPISKIN)
试验原理	采用定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)测定8个Nrf2/ARE、1个AhR/XRE和2个Nrf1/MRE控制基因的表达。每种浓度下的折叠诱导与反应性和细胞毒性数据相结合, 以确定致敏效力。
结果读数	采用qRT-PCR方法对11个基因的表达进行定量分析。同时, 还测定了化学反应性和细胞毒性潜能。这些单独分析的结果使用一种算法进行分析, 该算法包含了来自每种分析的所有数据, 以预测皮肤致敏效力。
接触时间	24 h
适用性	SenCeeTox®试验可用于评价不同效力的化学和金属皮肤致敏剂。
医疗器械应用	SenCeeTox®试验方法适用于极性(生理盐水)和非极性(芝麻油)溶剂, 并因此可能适用于医疗器械中的浸提介质进行试验。在文献 <sup>[98]</sup> 和 <sup>[100]</sup> 中, 据报道, SenCeeTox®试验能够准确识别某些与医疗器械相关的化学和金属皮肤致敏剂。或从医学级硅胶中使用极性和非极性溶剂如生理盐水和芝麻油浸提后的致敏剂。

### G.2.2.7 h-CLAT

5) SenCeeTox®是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件使用者, 并不表示对这一产品的认可。



h-CLAT方法可以量化单核细胞或树突状细胞接触致敏剂后，相应细胞表面标志的表达变化。通过细胞表面标志的表达水平可以识别出皮肤致敏剂和非致敏剂。见表C.9。

表 C.9 h-CLAT

关键事件3：表皮树突状细胞的激活	
OECD指南	OECD TG 442E
表现 (是/否)	准确率85%，敏感性93%，特异性66%
试验系统	hCLAT细胞系：THP-1人单核细胞白血病细胞系
试验原理	h-CLAT方法通过THP-1细胞与化学物接触24h后，测定THP-1细胞表面标志物CD86和CD54的表达变化。这些表面分子是单核细胞THP-1激活的典型标记物，可以模拟体内树突状细胞活化，在t细胞活化过程中起着重要作用。通过流式细胞术检测细胞表面标记物表达的变化。通过计算待测化学物与介质对照的相对荧光强度，来区分皮肤致敏剂和非致敏剂。
结果读数	用荧光标记抗体进行细胞染色后，用流式细胞术检测细胞表面标记物CD86和CD54的表达水平。
接触时间	24 h
适用性	h-CLAT方法适用于可溶性化学物质或在合适的介质中能够形成稳定分散系的化学物质。化学物的logP值高于3.5可能会产生假阴性结果。
医疗器械应用	没有数据。h-CLAT适用于生理盐水和DMSO溶剂中，但可能不适用于医疗器械中的非极性溶剂，如芝麻油、棉籽油或橄榄油，因为它们的logP值超过15.0。

### C.2.2.8 U-SENS<sup>TM</sup><sup>6)</sup>

U937细胞激活试验(U-SENS<sup>TM</sup>)是一种体外实验，通过流式细胞术定量人组织淋巴瘤细胞系，U937细胞表面标记物CD86的表达变化。见表C.10。

表 C.10 U-SENS<sup>TM</sup>

U-SENS <sup>TM</sup> 关键事件3：表皮树突状细胞的激活	
OECD指南	OECD TG 442E
表现 (是/否)	准确率为86%，敏感性为91%，特异性为65%
试验系统	U-SENS <sup>TM</sup> 细胞系：U937，人组织淋巴瘤细胞系
试验原理	CD86被认为是一种共刺激分子，可以模拟单核细胞的激活，在t细胞活化过程中起着关键作用。用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗体对细胞染色后，通过流式细胞术测定细胞表面标记CD86的表达变化。同时用PI染色检测细胞毒性作用，用来评价是否在亚细胞毒性的浓度下，会导致细胞表面标志CD86的上调表达。共刺激指数(SI)是通过计算相较于溶剂或介质对照，细胞表面标志CD86的变化，并应用于预测模型，以区分皮肤致敏剂和非致敏剂。
结果读数	用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗体对细胞进行染色后，通过流式细胞术检测细胞表面标记CD86的表达变化。

表C.10 U-SENS<sup>TM</sup> (续)

6) U-SENS<sup>TM</sup>是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对这一产品的认可。

U-SENS™关键事件3：表皮树突状细胞的激活	
接触时间	接触（45±3）h
适用性	适用于可溶性化学物或在合适的溶剂中能形成稳定分散系的化学物（化学物质与溶剂或介质分离形成不同的相，形成一种胶体或悬浮液）。
医疗器械应用	没有数据。U-SENS适用于生理盐水和DMSO溶剂中，但可能不适用于医疗器械中的非极性溶剂，如芝麻油、棉籽油或橄榄油，因为它们的logP值超过15.0。

### C.2.2.9 IL-8 Luc

IL-8 Luc方法通过THP-1细胞衍生出带有IL-8报告基因的细胞（THP-G8）。通过定量测定在荧光素酶基因表达相应荧光素酶与底物作用后的化学发光。该类基因的表达，是细胞在与化学致敏物接触后，诱导IL-8和GAPDH激活后控制的。见表C.11。

表 C.11 IL-8 Luc 测定法

关键事件3：表皮树突状细胞的激活	
OECD指南	OECD TG 442E
表现 (是/否)	准确率为86%，敏感性为96%，特异性为41%
试验系统	IL8Luc细胞系：THP-1细胞衍生出带有IL-8报告基因的细胞（THP-G8）
试验原理	IL-8Luc方法使用THP-1细胞衍生出带有IL-8报告基因的细胞（THP-G8），该细胞系在IL-8和甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)启动子控制下，橙色荧光素酶基因(SLO)和红色荧光素酶基因(SLR)分别可以稳定表达。这使得通过定量检测荧光素酶与底物作用后的化学发光，作为细胞接触化学致敏物后，IL-8和GAPDH活化的指标。
结果读数	IL-8表达的变化，与树突状细胞激活相关的细胞因子。
接触时间	16 h
适用性	虽然IL-8Luc方法使用X-VIVO™15作为溶剂，但它能够准确的评价正辛醇-水分配系数logK <sub>ow</sub> > 3.5，水溶性约为100µg/ml的化学物质。然而，在20mg/ml未溶解的物质的阴性结果可能是假阴性结果，因为它们不能溶解于X-VIVO™15。因此，这类化学物质的阴性结果不应采纳。在验证性研究中发现，对酸酐的假阴性率很高。此外，由于该细胞系的代谢局限性和试验条件，促半抗原（需要代谢激活的物质）和前半抗原（被空气氧化激活的物质）可能在试验中产生阴性结果。IL-8Luc试验方法可以将化学物质分类为皮肤致敏剂或非致敏剂，然而，目前它还不能提供致敏效力评价。
医疗器械应用	没有数据。适用于可以溶于X-VIVO™15培养基、DMSO或水中的化学物质。目前尚不清楚该方法是否适用医疗器械中的非极性溶剂，如芝麻油、棉籽油或橄榄油。

### C.2.2.10 基因组过敏原快速试验™<sup>7)</sup>

基因组过敏原快速试验™(GARD™)是一种基于细胞的试验方法，利用树突状细胞先天识别外来物质的能力，测定多元的基因组生物标记物。在细胞接受刺激后，根据诱导产生的基因转录谱，化学物质被分为皮肤致敏剂或非致敏剂。见表C.12。GARD试验方法已在一家工业研究中得到验证目前正在由EURL-ECVAM进行评价，并在GARD™皮肤上获得了积极的ESAC意见。

7) GARD是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对这一产品的认可。

表 C.12 GARD™

关键事件3：表皮树突状细胞的激活	
OECD指南	项目4.106：GARD™皮肤试验：一种基于化学物质作用于人树突状细胞后诱导基因转录，识别皮肤致敏剂的体外方法(AOP关键事件3)
表现 (是/否)	准确率为94%，敏感性为93%，特异性为96% 注：GARD™皮肤方法也可以作为GARD™的补充，根据欧洲分类、标签和包装(CLP)、法规进行分类。（弱的或强的皮肤致敏剂）。
试验系统	GARD™皮肤细胞系：SenzaCells™(SenzaGen)起源于人类髓系，具有与树突状细胞相似的特征。
试验原理	GARD™皮肤方法检测了SenzaCells™与化学物接触后，诱导的200个基因的表达。这200个基因被称为GARD预测特征(GPS)，包括了树突状细胞激活和成熟的生物标记物(KE3)、几种危险信号通路和模式识别受体(KE2)、抗原提呈分子和细胞增殖通路(KE4)。
结果读数	GPS包括参与皮肤致敏过程的相关机制的基因，如共刺激分子的上调和细胞氧化应激的诱导。使用Nanostring® <sup>a</sup> 分析系统测量GPS中200个基因的表达。使用机器通过参考固定样本学习算法，通过模式识别来分析得到的基因表达。每个样品被分类为皮肤致敏剂或非致敏剂，不需要主观判断。
接触时间	24 h
适用性	GARD™皮肤方法在化学物中有广泛的应用空间，包括各种有机官能团和最终用途，包括前/促半抗原和低水溶性的物质。
医疗器械应用	GARD™方法适用于极性（盐水）和非极性（芝麻油和橄榄油）的浸提介质，因此可以适用于医疗器械中的浸提介质进行试验。在一项评价医疗器械浸提液的皮肤致敏性的概念验证研究中，将四种已知的皮肤致敏剂添加至医疗级硅胶和阴性对照中，随后进行分析。所有极性（生理盐水）和非极性（芝麻油）溶剂的浸提液，均能正确识别出其中的皮肤致敏剂或非致敏剂。
<sup>a</sup> Nanostring®是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便文本使用者，并不表示对这一产品的认可。	

C.3 讨论

C.3.1 OECD已验证的方法

在OECD 442试验指南中被验证过的6个体外方法，主要是依据关键事件1、2、3来识别皮肤致敏剂，在检测医疗器械浸提液中的化学致敏剂似乎也有潜在的用途。这6个方法是DPRA、KeratinoSens™、LuSens、h-CLAT、U-SENS™和IL-8Luc。然而，由于DPRA需要用过量的化学物与多肽反应，它可能无法识别出稀释在医疗器械浸提液中较低水平的致敏剂。这些方法已使用纯化学物进行验证过，但未使用化学混合物验证。由于体外试验中使用的细胞系的代谢能力有限，促半抗原(例如：需要P450酶激活的物质)可能会产生假阴性的结果。最后，这些根据特定关键事件而开发的试验方法，每个单独的方法可能不足以得出化学物质是否存在皮肤致敏潜力的结论，应在IATA等综合方法的背景下加以考虑，并将它们与其他补充信息相结合加以考虑。

考虑到医疗器械生物相容性评价中，需要通过极性介质和非极性介质对医疗器械成品或材料进行浸提，因此这些被OECD验证过的方法需要确认其适用性。其中的很多方法在适用医疗器械的非极性浸提介质如芝麻油、棉籽油或橄榄油方面有很大的局限性。除混合物以及与溶剂不相容的问题外，这些被OECD验证过的方法可能无法检测医疗器械浸提液中潜在的皮肤致敏剂，因为它们通常以极低的浓度存在。

C.3.2 基因组学方法

C.2.2中列出的根据关键事件2和3的基因组学方法是SenCeeTox®, sens-IS, EpiSensA和GARD™。前三种是使用RhE组织,而第四种是基于专有的细胞系。它们都有所不同,但它们的共同特征是利用标记基因来识别皮肤致敏剂。此外,除EpiSensA外,所有方法都成功完成了试点项目,检测通过极性介质和非极性介质浸提添加至医疗器械聚合物中的致敏剂。该试点项目有限样本报告的结果准确性要好于OECD验证结果的准确性。其中的两种方法,SENS-IS和GARD™,目前正在OECD的试验指南第四项目组进行审核(指导影响健康的试验相关项目)。

基于这些方法的准确性、在极性和非极性溶剂中的适用性,以及独立成为医疗器械皮肤致敏试验方法的潜力,这些试验方法可能是评价医疗器械皮肤致敏潜力的方法。尽管如此,它们检测阳离子金属致敏剂的能力仍有待证实。

### C.3.3 其他方法

IL-18RhE方法是依据关键事件2开发的体外方法。该方法用于测定IL-18的释放量和细胞活力。IL-18RhE方法的试验数据是有限的。由于这种方法使用RhE组织,它可能适用于医疗器械中的极性和非极性溶剂。然而,由于该方法尚未被OECD验证,也未纳入任何主要的体外皮肤致敏试验的比较研究,其在医疗器械中的适用性还需要被证实。

### C.3.4 医疗器械体外试验方法验证的一般注意事项

目前,在OECD试验指南中,有6种被验证的体外方法(DPRA、KeratinoSens™、LuSens、h-CLAT、U-SENS™、IL-8Luc)以及两种在OECD试验指南项目中的方法(GARD™、SENS-IS)用于确定化学物的皮肤致敏潜力。这些体外致敏方法用于检测医疗器械需要有相应的验证数据的支持,而这些数据应该优于目前医疗器械的体内试验的数据。

这些方法的验证过程应设计为允许备选方法之间进行能力比较,并能够独立进行或结合测试策略共同评价的可能性。

在设计进行验证研究时,应考虑以下一般要点:

- 决定是否使用有皮肤致敏性的参照材料,或在无致敏性材料的浸提液中加入已知浓度的致敏剂;
- 识别可能存在医疗器械中的代表性类别的化学致敏剂;
- 选择一系列参照化学物用于建立验证试验数据库,包括进行体内试验的物理化学性质、历史数据、以及在OECD验证过程的数据;
- 识别用于验证过程的阴性和阳性对照材料;
- 定义经验证的体外试验方法相较于人体或动物试验的最低可靠性(重现性)和准确性(敏感性、特异性)的数值;
- 识别医疗器械材料的可能导致试验干扰、假阴性或假阳性结果的化学或物理性质;
- 定义所考虑的体外试验的适用性领域,例如适用于浸提或不适用于浸提的材料(例如,液体、凝胶、浆体、气体、蒸气、气溶胶、冷凝物、纳米材料)

## C.4 结论

世界贸易中大约有20%的化学物是致敏剂。然而,历史上只有大约1%的医疗器械的浸提液在动物皮肤致敏试验中产生阳性结果。基于这样的现实,加上复杂的体外皮肤致敏试验的可实用性,令专家相信,逐步接受医疗器械体外试验的范式转移是不可避免的。然而,为了实现这一点,精心设计对最高的体外致敏试验或联合试验的验证研究是必要的。

## 附录 D

## (资料性)

## 关于皮肤致敏试验的背景资料

一次或多次接触表皮后，在免疫系统的组分的引发和诱导下，人体会出现致敏反应。关键是半抗原(化学物)必须存在于皮肤并能向里渗透，然后与皮肤蛋白质结合后才形成免疫原性复合物。存在于表皮/真皮接缘处的朗罕氏细胞将抗原递呈给特异性淋巴细胞，而后活化的淋巴细胞引发免疫反应。这些淋巴细胞中有一小部分为长寿命的记忆细胞，它们在激发阶段作为初始激活因子，这样以后再次接触同一抗原时，活化的淋巴细胞释放淋巴因子，吸引其他炎症细胞至反应局部，从而导致一系列有害反应。

1895年，Jadassohn采用斑贴试验在一例临床病例中揭示了汞接触变态反应。这一创新的方法为以后的诊断和预测人及动物接触变态反应试验提供了科学基础。Landsteiner和Chase等人证实使用豚鼠研究皮肤致敏反应，评价化学物致敏潜能的前瞻性/预测性试验的开发即是沿续了他们的开创性研究。

1969年，Magnusson和Kligman等人探索研究了很多不同的豚鼠试验方法，提出的一种试验方法是豚鼠最大剂量法(GPMT)，首先进行皮内注射[用或不用弗氏完全佐剂(FCA)]，然后在同一部位局部应用试验材料。最初的方法要求如试验材料是非刺激性的，应对试验部位预处理。根据该方法的定义，可检测出微弱致敏物，因为“微弱”一词包括了阳性反应物的零反应在内。这是一灵敏的试验并已被广泛使用。弗氏完全佐剂的应用提高了试验方法的敏感性，但也有争论称在某些情况下，这种应用可能会导致过高估计化合物的致敏潜力。

1965年，Buehle在1965年提出封闭斑贴法为首选接触方法，该法产生封闭性，用优化接触来模拟人体使用过程(人体重复损害斑贴试验:HR IPT)。有人提出封闭性斑贴试验具有敏感性，能准确地预测出中度至重度致敏物，这样使HR IPT试验中的受试者得以避免发生有害反应。现有的数据证实封闭方法优于皮内注射和开放式局部应用方法。这种方法没有使用佐剂刺激免疫系统，目前已作为一项被认可的技术，具有足够的敏感性，能检测出大部分微弱致敏物，而且在风险评定过程中显示出充分的灵活性。但是，封闭式贴敷试验(Buehler试验)的敏感性比GPMT低。见参考文献[9]。

这两种试验在安全性评价中使用率最高，美国常用封闭性贴敷试验，欧洲则使用 GPMT。在当前的OECD 和 EU 试验指南中这两种试验也是优选的方法。豚鼠致敏试验结果取决于许多动物相关因素和有关实验室内试验结果差异性解释的技术因素，如动物品系、性别、年龄、试验环境条件、动物试验部位除毛(剪毛或剃毛)或化学脱毛方法、敷贴片设计型式、试验材料剂量、封闭程度、接触时间和组织反应的读数。正在使用和研究的还有其他许多试验，而所有这些试验都有其支持者。目前已有几种方法被法规认可接受，只要该方法由研究者以适当的文件形式提出并加以验证。在所有的试验中，均应按照原始参考资料完成试验步骤。下面给出了其他试验。

参考文献[8]给出了一种最新的皮肤致敏试验。

- a) 弗氏完全佐剂试验 (Freund's complete adjuvant test)。
- b) Split 佐剂试验 (Split adjuvant test)。
- c) 开放式表皮试验 (Open epicutaneous test)。
- d) Mauer 最优化试验 (Mauer optimization test)。
- e) 豚鼠脚垫试验 (Footpad test in guinea-pig)。
- f) 累积接触增强试验 (Cumulative contact enhancement test)。
- g) 皮肤划痕(佐剂和斑贴)试验[Scratched skin (adjuvant and patch) test]。
- h) 鼠耳肿胀试验 (Mouse ear swelling test)。

除了GPMT和Buehler封闭贴敷试验，局部淋巴结试验（LLNA）已于2010年被OECD接受作为当前豚鼠试验的唯一替代方法，该法对动物保护方面有所改善。见参考文献[88]。LLNA已被认可用于化学物致敏活性的检测。见参考文献[39]和[40]。

LLNA的科学原理是，通过测定局部接触试验样品后小鼠引流淋巴结内掺入<sup>3</sup>H甲基胸腺嘧啶核苷的量来检测致敏反应。该试验不包括激发阶段，试验所关注的终点是刺激指数，给出试验动物和对照动物淋巴结内掺入胸腺嘧啶核苷的比率。刺激指数大于3时为阳性结果（ $I_s > 3$ ）。通过实验室内部和实验室间评价，已经证实了LLNA在剂量水平关系方面具有再现性。见参考文献[16]、[17]、[21]、[25]、[26]、[28]和[32]。然而，也有报告称LLNA很难区分刺激性与变应原性物质。见参考文献[18]、[25]和[28]，因此对刺激物可能给出假阳性结果，而对同时具有刺激性和变应原性的材料则可能会过高估计了其变态反应原性。见参考文献[16]。然而，LLNA与豚鼠试验相比仍具有优势，如试验周期较短、终点更为客观、所用试验材料较少，并且免除了弗氏完全佐剂注射。细胞活性标记物分析和流式细胞仪的应用有可能改进试验步骤。见参考文献[23] [24]。但这些能否适合于补充进LLNA标准方法作为常规毒理学应用还尚未确定。从另外一方面来说，LLNA要求对试验介质进行更加局限性的选择，大部分研究者使用一种丙酮和橄榄油的混合剂。最近的研究显示在使用不同的介质时，其结果也有所不同。见参考文献[27]。此外，LLNA不可能研究挑战阶段或交叉反应模式，因为在诱导治疗后，动物在淋巴结收获前被牺牲。

淋巴结测定（PLNA）是另外一种淋巴结检验法，该法采用脚垫皮下应用（见参考文献[19]、[22]和[31]）。在后一种试验中，除了直接测定淋巴结活性作用外，指示抗原可用于进一步阐明化学物在试验条件下产生的免疫调节作用。见参考文献[15]。

风险评估过程不应仅依赖于单一模式或方法，而应进行多方面考虑，为使用者提供最大的安全性保证。一般来说，评价必须包括动物和人体试验模式，在选择模式和方法中宜具有一定的灵活性，但其理由需形成文件和/或经过确认。

在进行适当的豚鼠阴性试验时，如试验浓度比实际应用情况更具安全因素，试验结果一般是可以确定的。但是，宜避免在没有对最终产品使用应有的考虑的情况下，仅基于反应发生率和/或严重性对试验材料分级。

主要从以下四种因素来确定产品的致敏率和严重性风险：化学变应原的致敏潜能、化学变应原在产品中的总量、生物利用率和接触程度。以引发致敏反应所需的最低诱导浓度来限定化学物的致敏潜能，其诱导浓度越低说明致敏剂的致敏潜能越大。见参考文献[6]和[30]。结果表明，当产品中变应原的残留水平超过其最低诱导浓度（由GPMT中得出）时，在使用者中发现有明显的过敏接触性皮炎发病。见参考文献[14]。

另外，混合剂和产品的预测性试验很少被确认，并且可在产品成分试验后再进行，试验设计和结果解释相应地是不确定的。但有几个例子证实了预测的可能性。在采用引发人体接触性皮炎的毛线衫制备的丙酮浸提液进行的动物试验中，变应原（phosgene chlorophenylhydrazones）已被证实。见参考文献[11]。另一个例子是，橡胶长筒靴制备的丙酮/氯仿浸提液进行的动物试验引发了人体接触性皮炎，逐渐发现，巯基苯并噻唑（mercaptobenzothiazole）和二硫化二苯并噻唑(dibenzothiazylidysulfide)是诱发变应原。见参考文献[10]。试验中使用有机溶剂的重要性已得到明确的证实。在用盐水浸提液无反应的情况下，有机溶剂浸提液诱发了豚鼠皮肤致敏反应。

参考文献[4]采用有机溶剂制备样品步骤，通过溶剂蒸发方法得到残留物，在风险评估步骤中对材料残留物百分率与仍能诱发动物皮肤致敏反应的残留物（混合剂）的最小稀释百分率进行比较。

皮肤致敏试验的体外方法还没有用于常规使用，但鉴于欧洲新法规禁止化妆品使用动物试验，可能将会有新策略用于致敏物的识别。见附录C。

## 参 考 文 献

皮肤致敏试验的参考资料

[1] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guidelines for the testing of chemicals No. 406, Skin sensitization, OECD Publications, 1992

[2] de Silva O., Basketter D.A., Barratt M.D. et al. Alternative methods for skin sensitization testing, The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 19, ATLA, 24, pp. 683-705, 1996

[3] MHLW Notification by Director, MDED, Yakuseikishin-hatsu 0106 No.1, Jan. 6, 2020. Amendment of Basic Principles of Biological Safety Evaluation Required for Application for Approval to Market Medical Devices

[4] Japanese Guidelines of Basic Biological Tests of Medical Materials and Devices, 1995

皮肤致敏试验的参考文献

[5] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, OECD Series on Testing and Assessment, n° 168, Éditions OCDE, Paris, 2014, <https://doi.org/10.1787/9789264221444-en>

[6] Andersen K.E., Vølund A., Frankild S., The guinea pig maximization test with a multiple dose design, Acta Derm. Venereol., 75, pp. 463-469, 1995

[7] Buehler E.V., Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig, Arch. Dermatol., 91, pp. 171-175, 1965

[8] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre Skin sensitization testing for the purpose of hazard identification and risk assessment, Monograph 29, Brussels, Belgium, 2000

[9] Frankild S., Vølund A., Wahlberg J.E. et al., Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy, Acta Derm. Venereol., 80, pp. 256-262, 2000

[10] Kaniwa M.A., Momma J., Ikarashi Y. et al., A method for identifying causative chemicals of allergic contact dermatitis using a combination of chemical analysis and patch testing in patients and animal groups: application to a case of rubber boot dermatitis, Contact Dermatitis, 27, pp. 166-173, 1992

[11] Kojima S., Momma J., Kaniwa M.A., Phosgene (chlorophenyl) hydrazones, strong sensitizers found in yellow sweaters bleached with sodium hypochlorite, defined as causative allergens for contact dermatitis by an experimental screening method in animals, Contact Dermatitis, 23, pp. 129-141, 1990 [published erratum appears in Contact Dermatitis, 23, p. 383]

[12] Landsteiner K., Chase M.W., Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds, J. Exp. Med., 69, p. 767, 1939

[13] Magnusson B., Kligman A.M., The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test, J. Invest. Dermatol., 52, pp. 268-276, 1969

[14] Nakamura A., Momma J., Sekignchi H. et al., A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test, *Contact Dermatitis*, 31, pp. 72-85, 1994

#### LLNA的参考文献

[15] Albers R., Broeders A., Van Der Pijl A. et al., The use of reporter antigens in the popliteal lymph node assay to assess immunomodulation by chemicals, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143, pp. 102-109, 1997

[16] Basketter D.A., Lea L.J., Cooper K. et al., Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: a statistical evaluation, *Food. Chem. Toxicol.*, 37, pp. 1167-1174, 1999

[17] Basketter D.A., Roberts D.W., Cronin M. et al., The value of the local lymph node assay in quantitative structure-activity investigations, *Contact Dermatitis*, 27, pp. 137-142, 1992

[18] Basketter D.A., Scholes E.W., Kimber I., The performance of the local lymph node assay with chemicals identified as contact allergens in the human maximization test, *Food. Chem. Toxicol.*, 32, pp. 543-547, 1994

[19] De Bakker J.M., Kammüller M.E., Muller E.S.M. et al., Kinetics and morphology of chemically induced popliteal lymph node reactions compared with antigen-mitogen-, and graft-versus-host reaction-induced-responses, *Virchows Archiv. B Cell Pathol.*, 58, pp. 279-287, 1990

[20] Dean, J., Twerdok, L.E., Andersen, K.E. et al., The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds, NIH publication No. 99-494, Research Triangle Park, 1999, available at [https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf)

[21] Dearman R.J., Basketter D.A., Kimber I., Local lymph node assay: use in hazard and risk assessment, *J. Appl. toxicol.*, 19, pp. 299-306, 1999

[22] Descotes J., Patriarca C., Vial T. et al., The popliteal lymph node assay in 1996, *Toxicol.*, 119, pp. 45-49, 1997

[23] Gerberick G.F., Gruse L.W., Ryan C.A., Local lymph node assay: differentiating allergic and irritant responses using flow cytometry, *Methods*, 19, pp. 48-55, 1999(a)

[24] Gerberick G.F., Gruse L.W., Miller C.M. et al., Selective modulation of B-cell activation markers CD86 and I-AK on murine draining lymph node cells following allergen or irritant treatment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 159, pp. 142-151, 1999(b)

[25] Ikarashi Y., Tsuchiya T., Nakamura A., A sensitive mouse lymph node assay with two application phases for detection of contact allergens, *Arch. Toxicol.*, 67, pp. 629-636, 1993

[26] Kimber I., Hilton J., Dearman R.J. et al., An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures, *Toxicol.*, 103, pp. 63-73, 1995

[27] Lea L.J., Warbrick E.V., Dearman R.J. et al., The impact of vehicle on assessment of relative skin sensitization potency of 1,4-dihydroquinone in the local lymph node assay, *Am. J. Contact Dermatitis*, 10, pp. 213-218, 1999



- [28] Loveless S.E., Ladics G.S., Gerberick G.F. et al., Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial, *Toxicol.*, 108, pp. 141-52, 1996
- [29] Montelius J., Wahlkvist H., Boman A. et al., Experience with the murine local lymph node assay: inability to discriminate between allergens and irritants, *Acta Derm. Venereol.*, 74, pp. 22-27, 1994
- [30] Roberts D.W., Structure-activity relationships of skin sensitization potential of diacrylates and dimethacrylates, *Contact Dermatitis*, 17, pp. 281-289, 1987
- [31] Vial T., Carleer J., Legrain B. et al., The popliteal lymph node assay: results of a preliminary interlaboratory validation study, *Toxicol.*, 122, pp. 213-218, 1997
- [32] Warbrick E.V., Dearman R.J., Lea L.J. et al., Local lymph node assay responses to paraphenylenediamine: intra- and inter-laboratory evaluations, *J. Appl. Toxicol.*, 19, pp. 225-260, 1999 ISO 10993-10:2021(E) © ISO 2021 – All rights reserved 41
- [33] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guideline for the testing of chemicals No. 429, Skin sensitisation: Local lymph node assay, OECD Publications, 2010
- [34] Ryan C.A., Cruse L.W., Skinner R.A. et al., Examination of a vehicle for use with water soluble materials in the murine local lymph node assay, *Food Chem Toxicol.*, 40, pp. 1719-1725, 2002
- [35] Woolhiser M.R., Munson A.E., Meade B.J., Comparison of mouse strains using the local lymph node assay, *Toxicology* 146, pp. 221-227, 2000
- [36] Takeyoshi M., Noda S., Yamasaki K. et al., Advantage of using CBA/N strain mice in a non radioisotopic modification of the local lymph node assay, *J. Appl. Toxicol.*, 26, pp. 5-9, 2006
- [37] Van Och F.M.M., Slob W., De Jong W.H. et al., A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of the uncertainty margins, *Toxicology*, 146, pp. 49-59, 2000
- [38] De Jong W.H., Van Och F.M.M., Den Hartog Jager C.F. et al., Ranking of allergenic potency of rubber chemicals in a modified local lymph node assay, *Toxicol. Sc.*, 66, pp. 226-232, 2002
- [39] Dean J.H., Twerdok L.E., Tice R.R. et al., ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. II Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 34, pp. 258-273, 2001
- [40] Hanek K.E., Tice R.R., Carson B.L. et al., ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. III Data analysis completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 34, pp. 274-286, 2001
- [41] ASTM F2148-13, Standard Practice for Evaluation of Delayed Contact Hypersensitivity Using the Murine Local Lymph Node Assay (LLNA)
- [42] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Test No. 442B: Skin

Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, 2018, <https://doi.org/10.1787/9789264090996-en>

[43] Lee J.K., Park J.H., Park S.H. et al., A nonradioisotopic endpoint for measurement of lymph node cell proliferation in a murine allergic contact dermatitis model, using bromodeoxyuridine immunohistochemistry, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 48, pp. 53–61, 2002

[44] ICCVAM, 2010. ICCVAM Test Method Evaluation Report on Using the LLNA for Testing Pesticide Formulations, Metals, Substances in Aqueous Solutions, and Other Products. NIH Publication No. 10-7512. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences.

#### 体外皮肤致敏试验参考文献

[45] Basketter D., Maxwell G., In vitro approaches to the identification and characterization of skin sensitizers, *Cutaneous and Ocular Toxicol.*, 26, pp. 359–373, 2007

[46] Ashikaga T., Yoshida Y., Hirota M et al., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol, *Toxicology in vitro*, 20, pp. 767–773, 2006

[47] Sakaguchi H., Ashikaga T., Miyazawa M. et al., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT, *Toxicology in vitro*, 20, pp. 774–784, 2006

[48] Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K. et al., Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study, *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, 13, pp. 27–35, 2008  
ISO 10993-10:2021(E)

[49] EURL CVAM, European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing, <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam>

[50] Gibbs S, Kosten I, Veldhuizen R, Spiekstra S, Corsini E, Roggen E, Rustemeyer T, Feilzer AJ, Kleverlaan CJ, Assessment of metal sensitizer potency with the reconstructed human epidermis IL-18 assay. *Toxicology*. 393, pp. 62–72, 2018

[51] HAUGEN, E. and HENSTEN-PETTERSEN, A., The sensitizing potential of periodontal dressings. *J. Dent. Res.*, 57, pp. 950–953. 1978

[52] Johansson H, Gradin R., Forreryd A, Agemark M., Zeller K., Johansson A., Larne O., van Vlier E., Borrebaeck C., Lindstedt M., Evaluation of the GARD assay in a blind Cosmetics Europe study. *ALTEX*, 34, pp. 515–523. 2017

[53] Roberts D.W., Is a combination of assays really needed for non-animal prediction of skin sensitization potential? Performance of the GARD™ (Genomic Allergen Rapid Detection) assay in comparison with OECD guideline assays alone and in combination. *Regul Toxicol Pharmacol*, 98, pp. 155–160. 2018

[54] Cottrez F, Boitel E, Ourlin JC, Peiffer JL, Fabre I, Henaoui IS, Mari B, Vallauri A, Paquet A, Barbry P, Auriault C, Aeby P, Groux H, SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study. *Toxicol In Vitro*, 32, pp. 248–260, 2016

[55] Kimber I., Dearman R. J., Betts C. J., Gerberick G. F., Ryan C. A., Kern P. S., Patlewicz G. Y., Basketter D. A., The local lymph node assay and skin sensitization: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, pp. 181-185. 2006

致敏试验体外分析参考文献(一般)

[56] Ankley G. T., Bennett R. S., Erickson R. J., Hoff D. J., Hornung M. W., Johnson R. D., Mount D. R., Nichols J. W., Russom C. L., Schmieder P. K., Serrano J. A., Tietge J. E., Villeneuve D. L. 2010. , Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29:730-741

[57] Casati S. 2017. , Contact hypersensitivity: Integrated approaches to testing and assessment. *Current Opinion in Toxicology* 5:1-5

[58] Ezendam J., Braakhuis H. M., Vandebruel R. J. 2016. , State of the art in non-animal approaches for skin sensitization testing: from individual test methods towards testing strategies. *Arch Toxicol.* 90(12):2861-2883

[59] Hoffmann S., Kleinstreuer N., Alépée N., Allen D., Api A. M., Ashikaga T., Clouet E., Cluzel M., Desprez B., Gellatly N., Goebel C., Kern P. S., Klaric M., Kühnl J., Lalko J. F., Martinozzi-Teissier S., Mewes K., Miyazawa M., Parakhia R., van Vliet E., Zang Q., Petersohn D. 2018. , Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. *Crit Rev Toxicol.* 48(5):344-358

[60] Kimber I., Travis M. A., Martin S. F., Dearman R. J., Immunoregulation of skin sensitization and regulatory T cells. 2012. *Contact Dermatitis* 67(4):179-83

[61] Kleinstreuer N. C., Hoffmann S., Alépée N., Allen D., Ashikaga T., Casey W., Clouet E., Cluzel M., Desprez B., Gellatly N., Göbel C., Kern P. S., Klaric M., Kühnl J., Martinozzi-Teissier S., Mewes K., Miyazawa M., Strickland J., van Vliet E., Zang Q., Petersohn D. 2018. , Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches. *Crit Rev Toxicol.* 48(5):359-374

[62] Martin S. F., Esser P. R., Weber F. C., Jakob T., Freudenberg M. A., Schmidt M., Goebeler M. 2011. , Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* 66(9):1152-63

[63] OECD, 2017. Revised Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways. Series on Testing & Assessment No. 184. ENV/JM/MONO(2013)6. Organization for Economic Co-operation and Development. Paris. 32 pp. Available at: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2013\)6&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2013)6&doclanguage=en)

[64] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment, OECD Series on Testing and Assessment, n° 255, Éditions OCDE, Paris, 2017, Available at: <https://doi.org/10.1787/9789264274822-en>

[65] Reisinger K., Hoffmann S., Alépée N., Ashikaga T., Barroso J., Elcombe C., Gellatly N., Galbiati V., Gibbs S., Groux H., Hibatallah J., Keller D., Kern P., Klaric M., Kolle S., Kuehn J., Lambrechts N., Lindstedt M., Millet M., Martinozzi-Teissier S., Natsch A., Petersohn D., Pike I., Sakaguchi H., Schepky A., Tailhardat M., Templier M., van Vliet E., Maxwell

G.2015. , Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol In Vitro* 29(1):259–70

[66] Strickland J., Zang Q., Kleinstreuer N., Paris M., Lehmann D. M., Choksi N., Matheson J., Jacobs A., Lowit A., Allen D., Casey W.2016. , Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* 36(9):1150–62

[67] Urbisch D., Honarvar N., Kolle S. N., Mehling A., Ramirez T., Teubner W., Landsiedel R.2016. , Peptide reactivity associated with skin sensitization: The QSAR Toolbox and TIMES compared to the DPRA. *Toxicol In Vitro* 34:194—203

[68] Urbisch D., Mehling A., Guth K., Ramirez T., Honarvar N., Kolle S., Landsiedel R., Jaworska J., Kern P. S., Gerberick F., Natsch A., Emter R., Ashikaga T., Miyazawa M., Sakaguchi H.2015. , Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71(2):337–51

[69] Van der Veen J. W., Pronk T. E., Van Loveren H., Ezendam J.2013. , Applicability of a keratinocyte gene signature to predict skin sensitizing potential. *Toxicol In Vitro* 27(1):314–322

[70] Van der Veen J. W., Rorije E., Emter R., Natsch A., van Loveren H., Ezendam J.2014. , Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69(3):371–9

[71] Van der Veen J. W., Vandebriel R., Van Loveren H., Ezendam J., 2011. Keratinocytes, innate immunity and allergic contact dermatitis – opportunities for the development of in vitro assays to predict the sensitizing potential of chemicals. DOI: 10.5772/28337. In: Ro YS, (ed) *Contact dermatitis*. DOI: 10.5772/1167. ISBN: 978-953-307-577-8

[72] Safford R.J.2008. , The dermal sensitisation threshold– a TTC approach for allergic contact dermatitis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 51:195–200

[73] Myers D.K., Goldberg A.M., Poth A., Wolf M.F., Carraway J., McKim J., Coleman K.P., Hutchinson R., Brown R., Krug H.F., Bahinski A., Hartung T.2017. , From In Vivo to In Vitro: The Medical Device Testing Paradigm Shift. *ALTEX* 34(4):479–500Bibliography for in vitro assays for sensitization testing (DPRA)

[74] Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP2004. , Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol Sci.* 81(2):332–43

[75] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, 2019, Available at: <https://doi.org/10.1787/9789264229709-en>

[76] Urbisch D., Mehling A., Guth K., Ramirez T., Honarvar N., Kolle S., Landsiedel R., Jaworska J., Kern P.S., Gerberick F., Natsch A., Emter R., Ashikaga T., Miyazawa M., Sakaguchi H.2015. , Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71(2):337–351

致敏试验体外试验参考文献 (KeratinoSens™)

[77] EURL ECVAM, 2014. Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: [https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation](https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation).

[78] Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. 2013. , Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. Arch Toxicol 87(9):1683-1699

[79] OECD, 2018. Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264229822-en>

[80] Thorne N., Inglese J., Auld D. S. 2010. , Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17(6):646-657 Bibliography for in vitro assays for sensitization testing (LuSens)

[81] EURL ECVAM, 2018. The LuSens test method Validation Study Report. Accessible at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2011-10>

[82] OECD, 2018. Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264229822-en>

[83] Ramirez T., Mehling A., Kolle S.N., Wruck C.J., Teubner W., Eltze T., Aumann A., Urbisch D., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. 2014. , LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. Toxicol. In Vitro 28, 1482-1497

[84] Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K. G., Ryan C., Bader J. E., Fehr M., Burleson F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., Mehling A., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. 2016. , Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. Toxicol. In Vitro 32, 278-286

#### 致敏试验体外试验参考文献 (SENS-IS)

[85] Cottrez F., Boitel E., Auriault C., Aeby P., Groux H. 2015. , Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay. Toxicol In Vitro 29 (4):787-802

[86] Cottrez F., Boitel E., Pellevoisin C., Alonso A., Seyler S., Groux H., 2016a. Evaluation of the SkinEthic RHE model in the SENS-IS assay for prediction of skin sensitization of chemicals. Society of Toxicology Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, USA

[87] Cottrez F., Boitel E., Ourlin JC, Peiffer JL, Fabre I, Henaoui IS, Mari B, Vallauri A, Paquet A, Barbry P, Auriault C, Aeby P, Groux H. 2016b. , SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study. Toxicol In Vitro 32:248-60

[88] Cottrez F., Pellevoisin C., Coleman K., Groux H., 2018. In vitro assessment of medical device extracts potential to produce skin sensitization. Toxicology Letters Volume 295, Supplement 1, 10 October, Page S179, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.827>

[89] Uruno A., Motohashi H. 2011. , The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. *Nitric Oxide* 25(2):153–60

[90] Cottrez F., Boitel E., Berrada-Gomez M.P., Dalhuchyts H., Bidan C., Rattier S., Ferret P. J., Groux H. 2020. , In Vitro Measurement of Skin Sensitization Hazard of Mixtures and Finished Products: Results Obtained With the SENS-IS Assays. *Toxicol In Vitro* 62:104644

[91] Bergal M., Puginier M., Gerbeix C., Groux H., Roso A., Cottrez F., Milius A. 2020. , In vitro testing strategy for assessing the skin sensitizing potential of “difficult to test” cosmetic ingredients. *Toxicol In Vitro* 65:104781

致敏试验体外试验参考文献(IL-18 RHE Assay)

[92] Andres E., Barry M., Hundt A., Dini C., Corsini E., Gibbs S., Roggen E. L., Ferret P. J. 2017. , Preliminary performance data of the RHE/IL-18 assay performed on SkinEthic™ RHE for the identification of contact sensitizers. *Int J Cosmet Sci.* 39(2):121–132

[93] Galbiati V., Papale A., Marinovich M., Gibbs S., Roggen E.L., Corsini E. 2017. , Development of an in vitro method to estimate the sensitization induction level of contact allergens. *Toxicology Letters* 271:1–11

[94] Gibbs S., Kosten I., Veldhuizen R., Spiekstra S., Corsini E., Roggen E., Rustemeyer T., Feilzer A. J., Kleverlaan C. J. 2018. , Assessment of metal sensitizer potency with the reconstructed human epidermis IL-18 assay. *Toxicology* 393:62–72

[95] Gibbs S., Corsini E., Spiekstra S.W., Galbiati V., Fuchs H.W., Degeorge G., Troese M. J., Hayden P.M., Deng W., Roggen E. 2013. , An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 272(2):529–41

致敏试验体外试验参考文献(EpiSensA)

[96] Saito K, Nukada Y, Takenouchi O, Miyazawa M, Sakaguchi H, Nishiyama N 2013. , Development of a new in vitro skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) using reconstructed human epidermis. *Toxicol In Vitro* 27(8):2213–24

[97] Saito K, Takenouchi O, Nukada Y, Miyazawa M, Sakaguchi H 2017. , An in vitro skin sensitization assay termed EpiSensA for broad sets of chemicals including lipophilic chemicals and pre/pro-haptens. *Toxicol In Vitro* 40:11–25

致敏试验体外试验参考文献(SenCeeTox®)

[98] Coleman K.P., McNamara L.R., Grailer T.P., Willoughby J.A. Sr, Keller D.J., Patel P., Thomas S., Dilworth C. 2015. , Evaluation of an In Vitro Human Dermal Sensitization Test for Use with Medical Device Extracts. *Applied In Vitro Toxicology* 1(2): 118–130

[99] McKim J.M. Jr, Keller D.J. III, Gorski J.R. 2010. , A new in vitro method for identifying chemical sensitizers combining peptide binding with ARE/EpRE-mediated gene expression in human skin cells. *Cutaneous and Ocular Toxicology* 29(3):171–192

[100] McKim J.M. Jr, Keller D.J. III, Gorski J.R. 2012. , An in vitro method for detecting chemical sensitization using human reconstructed skin models and its applicability to cosmetic, pharmaceutical, and medical device safety testing. *Cutaneous and Ocular Toxicology* 31(4):292–305

致敏试验体外试验参考文献(h-CLAT)

[101] Ashikaga T., Yoshida Y., Hirota M., Yoneyama K., Itagaki H., Sakaguchi H., Miyazawa M., Ito Y., Suzuki H., Toyoda H. 2006. , Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20:767–773

[102] EC EURL ECVAM, 2015. Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>

[103] Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. 2013. , Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol* 87:1683–1969

[104] OECD, 2018. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264359-en>

[105] Takenouchi O., Miyazawa M., Saito K., Ashikaga T., Sakaguchi H. 2013. , Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol/water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38:599–609

致敏试验体外试验参考文献 (U-SENS™)

[106] Alépée N., Piroird C., Aujoulat M., Dreyfuss S., Hoffmann S., Hohenstein A., Meloni M., Nardelli L., Gerbeix C., Cotovio J. 2015. , Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30:373–382

[107] EURL ECVAM, 2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Accessible at: [https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations](https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations)

[108] OECD, 2018. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264359-en>

[109] Piroird C., Ovigne J.M., Rousset F., Martinozzi-Teissier S., Gomes C., Cotovio J., Alépée N. 2015. , The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29:901–916

致敏试验体外试验参考文献 (IL-8 Luc assay)

[110] Kimura Y., Fujimura C., Ito Y., Takahashi T., Nakajima Y., Ohmiya Y., Aiba S. 2015. , Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization, *Toxicol In Vitro* 29:1816–30

[111] OECD, 2018. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264359-en>

[112] OECD, 2017. Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for in vitro skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No. 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>

致敏试验体外试验参考文献 (GARD™)

[113] Forreryd A., Johansson H., Albrekt A. S., Lindstedt M. 2014. , Evaluation of high throughput gene expression platforms using a genomic biomarker signature for prediction of skin sensitization. BMC Genomics 15:379

[114] Forreryd A., Zeller K. S., Lindberg T., Johansson H., Lindstedt M. 2016. , From genomewide arrays to tailor-made biomarker readout – Progress towards routine analysis of skin sensitizing chemicals with GARD. Toxicol In Vitro 37:178–188

[115] Johansson H., Albrekt A. S., Borrebaeck C. A., Lindstedt M. 2013. , The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers. Toxicol In Vitro 27(3):1163–9

[116] Johansson H, Lindstedt M, Albrekt AS, Borrebaeck CA(2011) , A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. BMC Genomics. 12:399.

[117] Roberts D. W. 2018. , Is a combination of assays really needed for non-animal prediction of skin sensitization potential? Performance of the GARD™ (Genomic Allergen Rapid Detection) assay in comparison with OECD guideline assays alone and in combination. Reg. Toxicol. Pharmacol. 98:155–160

[118] Johansson H., Gradin R., Johansson A., Adriaens E., Edwards A., Zuckerstätter V., Jerre A., Burleson F., Gehrke H., Roggen E. 2019. , Validation of the GARD™skin Assay for Assessment of Chemical Skin Sensitizers: Ring Trial Results of Predictive Performance and Reproducibility. Toxicological Sciences, 170 (2): 374–381

[119] Jenvert RM., Johansson A, Larne O., Aaltonen E., Jerre A., Gradin R., Johansson H. 2019. In vitro skin sensitization testing of Medical Devices using GARD®. Toxicology Letters, volume 31, Supplement 1, 10 October, 155.

[120] ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity

[121] OECD, 2020. OECD Test Guidelines Programme, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecd-guidelines-testing-chemicals-related-documents.htm>

[122] OCDE. 2010, Test No. 442A: Skin Sensitization : Local Lymph Node Assay: DA, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264090972-en>

[123] OCDE. 2018, Test No. 442B: Skin Sensitization : Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264090996-en>

[124] OCDE. 2017, Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)



for Skin Sensitisation, OECD Series on Testing and Assessment, n° 256, Éditions OCDE, Paris,  
<https://doi.org/10.1787/9789264279285-en>

[125] ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

---