附件10

口腔黏膜刺激试验

Oral mucous irritation test

1 范围

本方法适用于评价牙膏对口腔黏膜组织潜在的刺激作用。

2 试验目的

确定和评价牙膏对动物的口腔黏膜组织是否有刺激作用及其程度。

3 定义

口腔黏膜刺激Oral mucous irritation

口腔黏膜组织接触受试样品后所产生的水肿、炎性变化及组织损伤。

4 试验的基本原则

将受试样品放置受试动物的一侧颊黏膜并多次接触，另一侧颊黏膜放入对照样品，在规定的时间间隔内，肉眼观察动物颊黏膜的接触部位刺激程度，根据刺激程度判断选择即刻和/或24小时进行组织学评价。

动物如果在试验的任何阶段出现严重抑郁、痛苦的表现，则应当给予人道地处死。依据试验情况对受试物进行适当评价。

5 试验方法

5.1 试验样品

5.1.1 受试样品

受试样品一般不需稀释，可直接使用，每次放置样品量为0.4g或0.4mL。

注：若受试样品稀释一定比例后可释放某种潜在的刺激性物质，可依照牙膏产品包装或说明书提供的稀释比例稀释受试样品，并增加稀释后样品的测试。

5.1.2 对照样品：可选用无菌的生理盐水作为对照样品，或选用其他无口腔黏膜刺激性的材料作为对照样品。

5.2 实验动物和饲养环境

5.2.1 首选健康初成年的金黄地鼠（拉丁学名：*Mesocricetus auratus*）, 同一品系, 雌雄不限。雌性动物应无孕。

5.2.2 至少使用3只动物。

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

5.3 试验步骤

5.3.1 动物准备与麻醉

用适当的麻醉剂将动物全身麻醉, 检查动物双侧颊囊有无异常（剔除颊黏膜异常动物）。翻转动物颊囊用生理盐水或蒸馏水清洗干净后进行试验。

5.3.2 试样接触

5.3.2.1 一侧颊囊放入试验样品,另一侧颊囊放入对照样品。试样与黏膜接触时间为5min，每小时1次（含接触时间）,共重复4 次。每次接触试样后及重复放置试样前肉眼检查颊囊，并记录异常情况。24h后肉眼观察颊囊并取与试样接触部位的黏膜进行组织学评价。

5.3.2.2 试验过程中根据表1肉眼观察试验部位，3只动物中如有出现轻微至中度红斑或水肿现象，应另取3只动物再次试验，方法同5.3.2.1，但接触4次完成后即刻取与试样接触部位的黏膜进行组织学评价。

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

5.4 结果观察

5.4.1 临床观察

试验期间及术后观察动物, 记录异常表现, 包括局部、 全身及异常行为。若动物因试

验影响以外的其他因素引起死亡时（如过度麻醉等）, 应替补动物再进行试验。

表 1.口腔黏膜临床观察系统

|  |  |
| --- | --- |
| 表现 | |
| 红斑 | 无红斑 |
| 极轻微红斑（勉强可见） |
| 红斑清晰 |
| 中度红斑 |
| 重度红斑（萦红色）至焦痂形成、糜烂、溃疡 |
| 水肿 | 无水肿 |
| 极轻微水肿（勉强可见） |
| 清晰水肿（肿起边缘清晰） |
| 中度水肿（肿起约1mm） |
| 重度水肿（肿起超过1mm，并超出接触区） |

5.4.2 大体观察

无痛处死动物后, 观察颊囊黏膜有无刺激、水肿、 损伤、 充血、 糜烂及溃疡等情况, 并比较同一动物的试验侧颊囊和对照侧颊囊, 记录每侧颊囊的状况, 注意试验侧与对照侧的差异。

5.4.3 组织学观察

5.4.3.1 组织切片制作

试验结束时应采用超剂量麻醉或其他无痛方法处死动物。取试样接触部位的黏膜,10%福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 半连续切片, 间隔取片5张, H.E染色。

5.4.3.2 组织学观察及记分

对黏膜组织进行组织学评价。根据表2组织反应记分系统计算每只动物组织反应记分。试验组中所有动物的组织反应记分相加, 再除以观察总数, 得出试验组平均记分。对照组同法计算。

表2. 口腔黏膜组织反应记分系统

|  |  |
| --- | --- |
| 反应 | 记分 |
| **1.上皮** |  |
| 正常，完好无损 | 0 |
| 细胞变性或变扁平 | 1 |
| 组织变形 | 2 |
| 局部糜烂 | 3 |
| 广泛糜烂 | 4 |
| **2.白细胞浸润（每个高倍视野）** |  |
| 无 | 0 |
| 极少（少于25） | 1 |
| 轻度（26~50） | 2 |
| 中度（51~100） | 3 |
| 重度（大于100) | 4 |
| **3.血管充血** |  |
| 无 | 0 |
| 极少 | 1 |
| 轻度 | 2 |
| 中度 | 3 |
| 重度伴血管破裂 | 4 |
| **4.水肿** |  |
| 无 | 0 |
| 极少 | 1 |
| 轻度 | 2 |
| 中度 | 3 |
| 重度 | 4 |

6 结果评价

6.1 临床观察评价

6.1.1 在试验周期内的任意时间点，3只动物中如有1只及以上出现重度红斑、水肿、糜烂或溃疡现象，该受试样品为重度口腔黏膜刺激反应。

6.1.2 试验周期内临床观察出现轻微至中度红斑或水肿现象时，以组织学评价较重的结果为准。

6.2 组织学评价

6.2.1 若出现动物的对照侧颊囊组织学评价记分之和大于9时, 则考虑试验操作时造成的损伤，有必要进行复试。

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

表3. 口腔黏膜组织反应分级

|  |  |
| --- | --- |
| 刺激指数 | 等级 |
| 0 | 无 |
| >0 ~ ≤4 | 极轻 |
| >4 ~ ≤8 | 轻度 |
| >8 ~ ≤11 | 中度 |
| >11 ~ ≤16 | 重度 |

7 结果判定

临床观察评价和/或组织学评价进行结果判定，临床观察为重度口腔黏膜刺激反应是不可接受的（见6.1.1）；依据6.2.2 口腔黏膜组织反应分级，认为受试样品为无或极轻的口腔黏膜刺激反应是可接受的。

8 试验结果的解释

试验结果应能得出受试样品的口腔黏膜刺激程度，这些结果只能在很有限的范围内外推到人类。引起动物强烈反应的物质在人群中也可能引起一定程度的口腔黏膜刺激反应。

口腔黏膜刺激试验起草说明

加强牙膏的监督管理，进一步提高牙膏使用安全性，中国食品药品检定研究院组织北京大学口腔医学院口腔医疗器械检验中心开展了口腔黏膜刺激试验方法的研究制定工作。现就工作有关情况说明如下：

一、起草原则

本方法主要参照北京大学口腔医学院口腔医疗器械检验中心编制并在2018年发布的医药行业标准“口腔医疗器械生物学评价 第13部分：口腔黏膜刺激试验”。写作结构框架按现行《化妆品安全技术规范》进行调整。本方法制定在充分考虑动物福利的前提下，本着科学性、合理性、规范性的指导原则，对某些内容进行具体化和明确化，在尽量提高可操作性的同时，兼顾了技术发展的前瞻性。本方法制定过程中还注意了科学性和合理性、协调性和有效性，以及通俗性和规范性之间的关系。

二、起草过程

本方法于2023年9月由化妆品标准专家委员会立项；在研究和分析国内外相关标准及文献的基础上，起草了本方法文本及编制说明，形成方法草案。

本方法由化妆品标准专家委员会立项并通过结题专家论证，形成如下意见及结论：规范文字说明，完善文本，修改后通过。修改后对外征求意见，根据反馈情况对文本进行修改。

三、与我国已有相关标准的关系

我国现已发布国家标准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》和行业标准YY/T 0127-2018《口腔医疗器械生物学评价 第13部分：口腔黏膜刺激试验》。本方法在参考上述我国已有相关标准的基础上，主要针对牙膏的特点，重点讨论牙膏是否稀释情况、放样量（试验操作时吸入注射器中，所以增加mL的单位，方便试验操作）、增加了临床观察评价（新增水肿的观察指标）、组织学观察仅给出了短期口腔黏膜刺激指标，未将慢性刺激指标（如上皮增生等）纳入，结果评价中新增临床观察评价、增加判定原则，以现行的《化妆品安全技术规范》为写作框架，本着牙膏检测适用性及可操作性的原则进行编制。

四、与国际同类标准的关系

本方法以ISO 10993-10 , 2010年发布“医疗器械生物学评价 第10部分：刺激与皮肤致敏试验”（Biological evaluation of medical devices Part 10: Tests for irritation and skin sensitization）为参考依据进行撰写，结合国内实验条件及操作的具体情况，撰写的标准，内容基本涵盖了实验对象、实验操作、结果评价和结果判定等技术要求。

五、与《规范》中原方法的对比情况

现行《化妆品安全技术规范》中尚无口腔黏膜刺激试验的相关内容，但有急性眼刺激性/腐蚀性试验和皮肤变态反应试验的相关内容，本标准以上述试验方法的写作框架为模板，重点增加了对口腔黏膜刺激相关特征指标规定。