

# 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则

二〇一四年五月

# 药物刺激性、过敏性和溶血性 研究技术指导原则

## 一、概述

刺激性、过敏性、溶血性是指药物制剂经皮肤、粘膜、腔道、血管等非口服途径给药，对用药局部产生的毒性（如刺激性和局部过敏性等）和/或对全身产生的毒性（如全身过敏性和溶血性等），为临床前安全性评价的组成部分。

药物的原形及其代谢物、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。

本指导原则适用于中药、天然药物、化学药物。

## 二、基本原则

### （一）试验管理

根据《药品注册管理办法》，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）。

### （二）随机、对照、重复

试验设计应遵循随机、对照、重复的原则。

### （三）整体性、综合性原则

应根据受试物特点，充分考虑和结合药理学、药效学、其他毒理学及拟临床应用情况等综合评价，体现整体性、综合性的原则。

### （四）具体问题具体分析

应在遵循安全性评价普遍规律的基础上，具体问题具体分析，结合受试物的特点，在阐明其研究方法或技术科学、合理的前提下进行规范性试验，对试验结果进行全面分析评价。

### 三、基本内容

#### (一) 受试物和实验动物

##### 1. 受试物

中药、天然药物：受试物应能充分代表临床试验样品或上市药品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。应注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等，由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、规格及生产单位。

化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。受试物应注明名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等，并附有研制单位的自检报告。试验中所用辅料、溶媒等应标明批号、规格和生产单位，并符合试验要求。

在药品研发的过程中，若受试物的工艺发生可能影响其安全性的变化，应进行相应的安全性研究。

化学药物试验过程中应进行受试物样品分析，并提供样品分析报告。成分基本清楚的中药、天然药物也应进行受试物样品分析。

##### 2. 实验动物

动物应符合国家有关规定的等级要求，并具有实验动物质量合格证。动物种属的选择根据观察指标和模型合理性确定，如刺激性试验应选择与人类皮肤、粘膜等反应比较相近的动物，如兔、小型猪等。

## （二）刺激性试验

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。

### 1. 给药部位

一般应选择与临床给药相似的部位，并观察对可能接触到受试物的周围组织的影响。

### 2. 给药途径

一般应与临床用药途径一致，否则应加以说明。

### 3. 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。

### 4. 给药浓度、剂量与体积

可选择几种不同浓度，至少应包括临床拟用最高浓度。如果技术上难以达到临床拟用最高浓度，如皮肤刺激性试验，在给药面积不变的情况下，可通过改变给药频次进行剂量调整，而不应通过增加厚度来达到增加给药量的目的。

设计给药浓度、剂量与体积时，应根据临床用药情况，并考虑受试动物给药部位的解剖和生理特点，保证受试物在给药部位的有效暴露。

### 5. 给药频率与周期

应根据临床用药情况，一般给药周期最长不超过4周。建议进行恢复期观察，同时评价给药局部及周围组织毒性反应的可逆性。

## 6. 观察指标

6.1 肉眼观察 应详细描述局部反应，包括红斑、水肿、充血程度及范围，计分表示。同时观察动物的一般状态、行为、体征等。

6.2 组织病理学检查 应详细描述给药部位的病理变化，并半定量分析、判断。提供相应的组织病理学照片。

## 7. 试验方法

具体可参考附录中常用方法和相关文献。

## 8. 统计方法

根据实验模型和试验方法选择合适的统计方法。

### (三) 过敏性试验

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。过敏性试验是观察动物接触受试物后的全身或局部过敏反应。

### 1. 试验方法

进行何种过敏性试验应根据药物特点、临床适应症、给药方式、过敏反应发生机制、影响因素等确定。

通常局部给药发挥全身作用的药物（如注射剂和透皮吸收剂等）需考察I型过敏反应，如注射剂需进行主动全身过敏试验（Active Systemic Anaphylaxis, ASA）和被动皮肤过敏试验（Passive Cutaneous Anaphylaxis, PCA），透皮吸收剂需进行主动皮肤过敏试验（Active Cutaneous

Anaphylaxis, ACA)。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特点参照经皮给药过敏性试验方法进行。如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建议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）。II和III型过敏反应可结合在重复给药毒性试验中观察，如症状、体征、血液系统、免疫系统及相关的病理组织学改变等。经皮给药制剂（包括透皮剂）应进行IV型过敏反应试验，包括豚鼠最大化试验（Guinea-Pig Maximization Test, GPMT）或豚鼠封闭斑贴试验（Buehler Test）或其他合理的试验方法如小鼠局部淋巴结试验（Murine Local Lymph Node Assay, LLNA）等。

## **2. 剂量设计**

建议选择多个剂量，至少应包括临床最高给药浓度。

## **3. 对照组**

应设立阳性对照组和阴性对照组，必要时采用已上市制剂作对照。

## **4. 统计方法**

根据实验模型和试验方法选择合适的统计方法。

### **（四）溶血性试验**

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。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。

## **1. 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局部用药制剂均应进行溶血性试验。

## 2. 试验方法

溶血试验包括体外试验和体内试验，常规采用体外试管法评价药物的溶血性，若结果为阳性，应与相同给药途径的上市制剂进行比较研究，必要时进行动物体内试验或结合重复给药毒性试验，应注意观察溶血反应的有关指标（如网织红细胞、红细胞数、胆红素、尿蛋白，肾脏、脾脏、肝脏继发性改变等），如出现溶血时，应进行进一步研究。

### （五）光毒性（光刺激性）试验

光敏反应是用药后皮肤对光线产生的不良反应，包括光毒性反应和光过敏反应，均由受试物所含的感光物质引起，产生光敏反应需同时满足以下条件：吸收自然光线（波长范围为 290 ~ 700nm），吸收 UV/可见光后产生活性物质，在光暴露组织（如皮肤，眼睛等）有充分的暴露。

光毒性是由光诱导的非免疫性的皮肤对光的反应，是指药物吸收的光能量在皮肤中释放导致皮肤损伤的作用。光毒性反应是光敏反应中最常见的一种反应，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。皮肤给药光毒性试验的目的是观察受试物接触皮肤或应用后遇光照射是否有光毒性反应。若受试物的化学结构或某些组成（包括药物和赋形剂）文献报道有光毒性作用，或其化学结构与已知光敏剂相似，或曾有报道其具有或可疑具有光毒性作用，建议进行皮肤给药光毒性试验。

## 四、结果分析与评价

（一）详细说明实验方法，受试物、试验分组、给药剂量、动物数、用药次数、毒性反应、持续时间、恢复情况及时间、死亡动物数

等，对不同剂量（或浓度）下某种反应发生情况及严重程度进行表述，分析毒性反应的量效关系和可能的时效关系及可逆性，判断药物相关性，提供安全范围等。

（二）刺激性试验应重视给药浓度、体积、速度、次数与有效暴露时间对结果的影响。注射剂的给药浓度、速度及次数与药物的血管刺激性密切相关，建议根据受试物的性质、临床用药情况，采用适当的方法，尽最大可能地暴露毒性，如可适当增加浓度，或通过增加给药次数等。过敏试验应注意给药剂量和给药速度对过敏反应的影响，静脉注射激发应保证足量、一次性快速地将受试物注射入动物体内。经皮给药的受试物应保证在局部的有效暴露浓度和时间。

（三）重视组织病理学检查，并提供相应的照片。

（四）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，建议采用多种方法如BT、小鼠局部淋巴结试验等。

（五）在溶血性试验中，若出现红细胞凝聚现象，应判定是真凝聚还是假凝聚。若体外出现可疑溶血现象，应采用其他方法进一步试验，以确定或排除受试物的溶血作用。利用分光光度法进行溶血性试验时，应注意离心速度及温度对结果的影响。此外，因不同的注射剂颜色及深浅不同，若其色泽对血红蛋白的最大吸收有干扰，则应注意排除非药物因素。

(六) 结合药物的制剂特点、药理作用其他毒理学试验结果、以及临床信息等综合分析和评价。

## 五、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.
15. 皮肤用药的毒性试验和粘膜用药的毒性试验. 中华人民共和国卫生部药政管理局 《中药新药研究指南》1994年 209, 213.
16. 袁伯俊 王治乔 皮肤用药毒性试验. 《新药临床前安全性评价与实践》 北京: 军事医学科学出版社, 1997年 152.
17. 刘建文 其他毒性试验. 《药理实验方法学》第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2002年 234.
18. Principles and methods of Toxicology. Fourth edition, edited by A. Wallace Hayes, Taylor & Francis, Philadelphia. 2001.
19. EMA; Note for Guidance on Non-clinical Local Tolerance Testing of Medicinal Products.
20. FDA; Guidance for Industry Botanical Drug Products .
21. FDA; Guidance for Industry Labeling Guidance for OTC Topical Drug Products for the Treatment of Vaginal Yeast Infections (Vulvovaginal Candidiasis).
22. FDA; Guidance for Industry Bacterial Vaginosis - Developing Antimicrobial Drugs for Treatment .
23. Preclinical Development Hand Book-Toxicology. Edited by Shayne Cox Gad, Copyright © 2008 by John Wiley & Sons, Inc .

## 六、附录

本附录收录的试验方法仅供参考。应根据受试物的特点采用国内外公认的科学合理的试验方法，不仅限于此附录。

## （一）刺激性试验方法

### 1. 血管刺激性试验

通常选兔，每组不少于 3 只。设生理盐水和/或溶媒对照，可采用同体左右侧自身对比法。给药部位根据临床拟用途径确定，一般选用耳缘静脉。可设多个给药浓度，至少包括临床最大拟用浓度，给药容积、速率和期限一般根据临床拟用法用量，并根据动物情况进行调整，给药体积不可太低。多次给药时间一般不超过 7 天。

根据受试药物的特点和刺激性反应情况选择观察时间和剖检时间，至少观察 72 小时。应对部分动物进行组织病理学检查。恢复期动物根据受试物的特点和刺激性反应情况，继续观察 14~21 天进行组织病理学检查。根据肉眼观察和组织病理学检查结果综合判断受试物的血管刺激性及刺激性恢复情况。

### 2. 肌肉刺激性试验

通常选兔，也可选用大鼠。每组不少于 3 只。应设生理盐水对照和/或溶媒对照组，可采用同体左右侧自身对比法。根据受试物的特点和刺激性反应情况选择观察时间，观察期结束时应对部分动物进行组织病理学检查。分别在左右两侧股四头肌内注射给药，观察给药后不同时间的局部反应，如充血、红肿等。给药后 48~72 小时剖检观察注射局部的刺

激反应，按表 1 计算相应的反应级，并进行局部组织病理学检查，提供病理照片。

根据表 1 计算肌肉刺激性总反应级，计算平均值，按表 2 判定刺激等级。若各股四头肌反应级的最高与最低之差大于 2，应另取动物重新试验。

**表 1 肌肉刺激反应分级标准**

刺激反应	反应级
无明显变化	0
轻度充血，范围在 0.5×1.0cm 以下	1
中度充血，范围在 0.5×1.0cm 以上	2
重度充血，伴有肌肉变性	3
出现坏死，有褐色变性	4
出现广泛性坏死	5

**表 2 平均分值和等级**

平均分	等级
0.0 ~ 0.4	无
0.5 ~ 1.4	轻微
1.5 ~ 2.4	轻度
2.5 ~ 3.4	中度
3.5 ~ 4.4	重度
4.5 及以上	严重

### 3. 皮肤刺激性试验

通常选兔、小型猪，否则应阐明合理性。兔每组不低于 4 只。一般应进行相同备皮面积的正常皮肤和破损皮肤局部刺激性试验。

采用同体左右侧自身对比法，将受试物直接涂于备皮处，敷料覆盖固定。贴敷时间至少 4 小时。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，给药期限一般不超过 4 周。破损皮肤试验中皮肤破损程度以损伤表皮层为限。

在自然光线或全光谱灯光下肉眼观察皮肤反应。根据受试物的特点和刺激性反应情况选择观察时间。通常单次给药皮肤刺激性试验观察时间点为去除药物后 30~60 分钟，24、48 和 72 小时。多次给药皮肤刺激性试验，为每次去除药物后 1 小时以及每次给药前，以及末次贴敷去除药物后 30~60 分钟，24、48 和 72 小时。

如存在持久性损伤，有必要延长观察期限以评价恢复情况和时间，延长期一般不超过 2 周。对出现中度及中度以上皮肤刺激性的动物应在观察期结束时进行组织病理学检查，并提供病理照片。

单次给药皮肤刺激性试验，计算各组每一时间点皮肤反应积分的平均值，按表 3 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刺激积分均值，按表 4 进行刺激强度评价。

**表 3 皮肤刺激反应评分标准**

<b>刺激反应</b>	<b>分值</b>
<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 4 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 ~ 8.00	重度刺激性

#### 4. 粘膜刺激性试验

##### 4.1 眼刺激性试验

通常选兔，每组不少于 3 只。应设生理盐水对照组，可采用同体左右侧自身对比法。动物眼睛滴入受试物，保证药物充分暴露。给药期限应根据临床拟用方法确定。多次给药时每天给药次数应不少于临床用药频率。

应根据受试物的特点和刺激性反应选择适当的观察时间。通常单次给药为给药后 1、2、4、24、48 和 72 小时；多次给药眼刺激试验为每天给药前以及最后一次给药后 1、2、4、24、48 和 72 小时。如存在持久性损伤，有必要延长观察期限，一般不超过 21 天。

一般采用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。在整个观察过程中应进行荧光素钠染色检查。每次检查都应记录眼部异常反应，根据表 5 计算分值。根据表 6 判断刺激程度。

**表 5 眼刺激反应分值标准**

<b>眼刺激反应</b>	<b>分值</b>
<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
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 6 眼刺激性评价标准**

<b>分值</b>	<b>评价</b>
0~3	无刺激性
4~8	轻度刺激性
9~12	中度刺激性
13~16	重度刺激性

#### **4.2 滴鼻剂和吸入剂刺激性试验**

可选用兔、豚鼠或大鼠。给药后观察动物全身状况（如呼吸、循环、中枢神经系统）及局部刺激症状（如哮喘、咳嗽、呕吐、窒息等状况）等。单次给药 24 小时后或多次给药停药后 24 小时处死动物，观察呼吸道局部（鼻、喉、气管、支气管）粘膜组织有无充血、红肿等现象，并进行病理组织学检查。

#### **4.3 阴道刺激性试验**

通常选用大鼠、兔或犬。给药容积可参考临床拟用情况或不同动物种属的最大给药量。给药频率根据临床应用情况，通常每天 1~2 次，至少 7 天，每次给药与粘膜接触至少 4 小时。观察内容：阴道部位、临床表现（如疼痛症状）和阴道分泌物（如血、粘液）等，给药后动物死亡和剖检结果，局部组织有无充血、水肿等现象，并进行阴道和生殖系统病理组织学检查等。

#### **4.4 直肠刺激性试验**

通常选兔或犬。给药容积可参考临床拟用情况或不同动物种属的最大可行量。给药频率根据临床拟用情况，通常每天 1~2 次，至少 7 天，每次给药与粘膜接触至少 2~4 小时，必要时可封闭一定时间。观察内

容：包括肛门区域和肛门括约肌，给药后临床表现（如疼痛症状）和粪便（如血、粘液），给药后死亡和剖检结果，局部组织有无充血、水肿等现象，并进行肛周组织的病理组织学检查。

#### 4.5 口腔用药、滴耳剂等刺激性试验

可参照上述试验，给药途径为口腔、外耳道给药，观察对口腔和喉粘膜，以及对外耳道和鼓膜等的影响。口腔用药建议用金黄仓鼠，观察受试物对颊粘膜的刺激性。

### 5. 皮肤给药光毒性试验

成年白色豚鼠，雌雄各半。每组动物数至少 6 只。应设阴性、阳性对照组和受试物不同剂量组，至少包括临床用药浓度。

试验前动物备皮涂敷药物。给药 30 分钟后覆盖固定，UV 光源照射（UVA 波长为 320-400nm，如含 UVB，其剂量不得超过 0.1J/cm<sup>2</sup>）。试验结束后分别于 1、24、48 和 72h 观察皮肤反应，根据表 7 计算评分。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之和≥2 的动物数≥1 只时，判为受试物具有光毒性。

表 7 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

## (二) 过敏性试验方法

### 1. 主动全身过敏试验 (ASA)

通常选用体重为 300~400 克的豚鼠。每组动物数至少 6 只。设阴性、阳性对照组和受试物不同剂量组, 至少包括临床拟用最高剂量或浓度。阴性对照组给予同体积的溶媒, 阳性对照组给予牛血清白蛋白或卵白蛋白或已知致敏阳性物质。

选择容易产生抗体的给药途径, 如腹腔、静脉或皮下注射, 隔日一次, 共给药 3 次, 给药体积 0.5 ml, 末次注射后第 14 天、第 21 天分别快速静脉注射致敏剂量的 2 倍进行攻击。即刻观察动物反应至 30 分钟, 包括症状的出现及消失时间, 一般应观察 3 小时。致敏期间每日观察动物的症状, 首末次致敏和激发当日测定动物体重。按表 9 判断过敏反应发生程度, 计算发生率。

**表 8 过敏反应症状**

0 正常	7 呼吸急促	14 步态不稳
1 不安宁	8 排尿	15 跳跃
2 竖毛	9 排粪	16 喘息
3 发抖	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 9 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

## 2. 主动皮肤过敏试验 (ACA)

通常选豚鼠。受试物应与临床拟用制剂一致，应为含活性成分和赋形剂或含透皮促进剂的混合制剂。若受试物为膏剂或液体，则一般不稀释；若受试物为固体粉末，则需与适量水或赋形剂混匀，以保证受试物与皮肤的良好接触。当使用赋形剂时，应考虑其对受试物透皮吸收的影响。应设阳性对照和阴性或赋形剂对照。在致敏接触阶段，应充分保证受试物在皮肤的停留时间（6 小时）和接触皮肤的范围。第 0、第 7 和第 14 天，同样方法给药。末次给药后 14 天，再次给药激发，给药 6 小时左右后，观察 72 小时内皮肤过敏反应情况，并按表 10 评分，按表 11 计算发生率。同时应观察动物是否有哮喘、站立不稳或休克等全身过敏反应。

**表 10 皮肤过敏反应程度的评分标准**

皮肤过敏反应	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，明显可见（边缘高出周围皮肤）	2
重度水肿，皮肤隆起 1mm，轮廓清楚	3

严重水肿，皮肤隆起 1mm 以上或有水泡或破溃	4
最高总分值	8

**表 11 皮肤致敏性评价标准**

致敏发生率 (%)	皮肤致敏性评价
0 ~ 10	无致敏性
11 ~ 30	轻度致敏性
31 ~ 60	中度致敏性
61 ~ 80	高度致敏性
81 ~ 100	极度致敏性

### 3. 被动皮肤过敏试验 (PCA)

通常选大鼠，可用小鼠，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。每组动物数至少 6 只。应设立阴性、阳性对照组和受试物不同剂量组，至少包括临床拟用最大剂量或浓度。阴性对照组应给予同体积的溶媒，阳性对照组给予牛血清白蛋白或卵白蛋白或已知致敏阳性物质。

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，共给药 3 ~ 5 次；末次致敏后第 10 ~ 14 天制备致敏血清。激发时动物备皮处皮内注射合适稀释度的致敏血清 0.1mL，24 或 48 小时后，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。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，需注意激发时间选择的合理性。激发注射 30 分钟后测量皮肤内层的斑点大小，直径大于 5mm 者为阳性。不规则斑点的直径为长径与短径之和的一半，并提供蓝斑照片。

### 4. 豚鼠 Buehler 试验 (BT) 和最大化试验 (GPMT)

通常选成年豚鼠。受试物组不少于 20 只、对照组不少于 10 只。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，也可以使用其他的阳性对照物，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。

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。第 0，6~8 和 13~15 天局部给药诱导，第 27~28 天在未给药部位给药 6 小时激发。GMPT 试验采用皮内注射给药，使用或者不使用佐剂进行诱导，局部诱导 5~8 天后，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。两种试验方法均在去除药物 24 和 48 小时后读取结果。如结果难以判定，一周后再次激发。

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 12 进行评分，计算过敏反应发生率。按表 13 判断过敏反应强度。可根据毒性反应情况适当调整观察时间。同时测定开始和结束时的动物体重。

**表 12 皮肤反应评分标准**

皮肤反应强度	积分
<b>(1) 红斑形成</b>	
无红斑	0
轻微可见红斑	1
中度红斑	2

重度红斑	3
水肿性红斑	4
<b>(2) 水肿形成</b>	
无水肿	0
轻度水肿	1
中度水肿	2
重度水肿	3
<b>总积分</b>	<b>7</b>

表 13 致敏强度

致敏率	分级	致敏强度
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

### 5. 皮肤光过敏反应试验

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。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。必要时追加光毒性试验。试验动物原则上选健康白色豚鼠，每组不少于 5 只。应设阳性对照药组、阴性对照组和受试物组。

Adjuvant and Strip 法：皮内注射 FCA、损伤皮肤角质层后涂敷受试物、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。

Harber 法：涂敷受试物、照射紫外线，此操作隔日一次共 3 次致敏。3 周后再次涂敷受试物，30 分钟后照射紫外线激发。

Horio 法：涂敷 20%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。

Jordan 法：破损皮肤涂敷受试物，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。

Maurer 法：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。

Morikawa 法：为 Harber 改良法，涂敷受试物，30 分钟后照射紫外线，此操作每周连续 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。

Vinson 法：涂敷受试物，照射紫外线，每日一次，连续 5 次致敏，7~10 天后，再次涂敷受试物，照射紫外线激发。