

皮肤致敏检查法

Pifu Zhimin Jianchafa

Tests for Skin Sensitization

本试验系将一定量的供试液与豚鼠皮肤接触，以检测供试品是否具有引起接触性皮肤变态反应的可能性。

供试用豚鼠应健康合格，体重 300~500g，雌鼠应未产并无孕，每组至少 10 只，对照组至少 5 只。试验前 24 小时剃除豚鼠肩背部 4cm×6cm 区域毛发。

弗氏完全佐剂 (CFA) 制备 无水羊毛脂与液体石蜡的体积比为 4:6 (如冬天，使用比例为 3:5)。将无水羊毛脂加热溶解后，取 40ml，置研钵中，稍冷却后，边研磨边加液体石蜡，直至 60ml 液体石蜡加完。置高压蒸汽灭菌器内，在 115℃ 保持 30 分钟，即制备成弗氏不完全佐剂 (IFA)，4℃ 保存备用。在 IFA 中按 4~5mg/ml 加入死的或减毒的分枝杆菌 (如卡介苗或结核杆菌)，即得弗氏完全佐剂 (CFA)。

与供试液接触的所有器具均应置高压蒸汽灭菌器内 121℃ 灭菌 30 分钟。

供试品溶液的制备 将供试品用肥皂水清洗除去油污，再用纯化水冲洗干净，滤纸吸干后切成 0.5cm×2cm 条状，置玻璃容器内，加入氯化钠注射液作为浸提液 (供试品每 3cm² 表面积加入氯化钠注射液 1ml)，使浸提液浸没供试品，置高压蒸汽灭菌器内，在 121℃ 保持 60 分钟，即得。同条件制备得阴性对照液。将供试液及阴性对照液、阳性对照液 (5% 甲醛溶液) 与弗氏完全佐剂 (CFA) 等体积混合，用力搅拌数分钟至完全乳化为止。

检查法 最大剂量法

诱导: 用 75% 乙醇清洁豚鼠背部去毛区，在每只豚鼠去毛区作 6 点对称的皮内注射，各点相距 1~2cm，每点注射量为 0.1ml。皮内注射后 7 天，在注射部位再次剃毛，用 75% 乙醇清洁。若未出现刺激反应，每一试验区用 10% 十二烷基硫酸钠石蜡液预处理，在局部斑贴前 24 小时涂抹、按摩试验区皮肤，24 小时后，将 2cm×4cm 滤纸浸入供试品溶液或阴性对照液、阳性对照液至饱和，将其贴敷于豚鼠背部注射部位，封闭固定 48 小时。

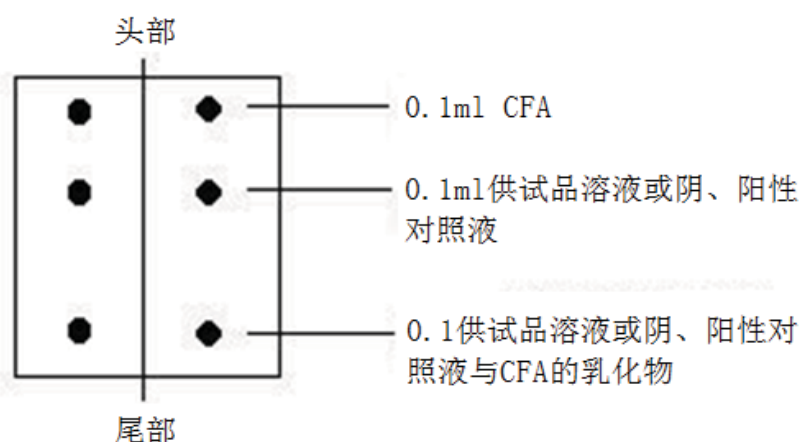


图 1 皮内注射点部位

激发: 于诱导完成 14 天，在豚鼠左右腹侧未用过处剃毛，用 75% 乙醇清洁，将 2cm×2cm 滤纸浸入供试品溶液或阴、阳性对照液中至饱和，将其贴敷于剃毛区，封闭固定 24 小时。

结果判断 将贴敷物取下后 1、24 和 48 小时，分别观察贴敷处红斑和水肿，并记分（见表 1）和分级（见表 2）。

表 1 记分

| 红斑 | 记分 | 水肿 | 记分 |
|-------------------|----|------------------------|----|
| 无红斑现象 | 0 | 无水肿现象 | 0 |
| 轻度红斑（勉强可见） | 1 | 轻度水肿（勉强可见皮肤增厚） | 1 |
| 明显红斑（淡红色） | 2 | 明显水肿（隆起而轮廓清楚） | 2 |
| 中度红斑（鲜红色） | 3 | 中度水肿（隆起近 1mm） | 3 |
| 重度红斑（紫红色伴有轻微焦痂形成） | 4 | 重度水肿（隆起大于 1mm 边界超过接触区） | 4 |

表 2 致敏反应率分级

| 致敏率，% | 分度 | 分级 |
|--------|-----|----------|
| 0~8 | I | 与阴性对照无差别 |
| 9~28 | II | 轻微反应 |
| 29~64 | III | 中度反应 |
| 65~80 | IV | 强烈反应 |
| 81~100 | V | 极强反应 |

按 1、24、48 小时情况列表，如激发部位记分为 2 或大于 2，则认为致敏；如阴性对照组或供试品组中超过 50% 的试验动物的记分为 1 分或 60% 的阳性对照动物的反应记分小于 2，应重复试验。