

# 中华人民共和国国家标准

GB/T 21827—2008

## 化学品 皮肤变态反应试验 局部淋巴结方法

Chemicals—Test method of skin sensitization—Local lymph node assay  
(LLNA)

2008-05-12 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 皮肤变态反应试验  
局部淋巴结方法  
GB/T 21827—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](http://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 0.5 字数 10 千字  
2008 年 8 月第一版 2008 年 8 月第一次印刷

\*

书号: 155066·1-32502 定价 10.00 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

## 前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试指南 No. 429(2002 年)《皮肤变态反应试验 局部淋巴结法试验》(英文版)。

本标准做了下列编辑性修改：

- 增加了“范围”一章；
- 计量单位改为我国法定计量单位；
- 删除了 OECD 的参考文献部分。

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：上海出入境检验检疫局、宁波出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：刘清君、邱璐、孙金秀、史晓祎、马中春。

## OECD 引言

1. OECD 试验指南立足从科学技术进步和动物福利的角度,对检测方法的建立和优化进行定期审查,从而决定是否对现有的方法进行更新或者建立新的方法指南。基于此目的,一种新的方法,即利用小鼠进行的判断皮肤变态反应的方法——局部淋巴结法(LLNA)已经得到充分的验证并被接受成为新的 OECD 指南。它是目前公布的第二个评估化学品对皮肤致敏作用的动物试验指南。另一个为利用豚鼠进行的最大反应试验和局部封闭涂皮试验的指南。

2. LLNA 的优点是既体现了科学的进步,又兼顾了动物福利的问题。它检测的是皮肤变态反应诱导阶段淋巴细胞的增殖,可以提供评估剂量-反应量化的数据。关于 LLNA 验证过程以及相关工作的综述已经发表。此外,值得注意的是,在豚鼠试验中推荐使用的轻-中强度的阳性对照致敏物,在 LLNA 试验中同样适用。

3. LLNA 是鉴别皮肤致敏化学品的可选择的方法之一,它既可以识别皮肤致敏化学品,也能够确定那些没有明显皮肤致敏活性的化学品。当然这不是说在所有的情况下 LLNA 都可以替代豚鼠试验,但这种方法具有一定的优点,是变态反应试验可选择的方法之一,通常也不需要对比阳性和阴性结果再进一步确认。

4. LLNA 是一种体内试验,不可避免要使用一定量动物,但 LLNA 可以减少动物使用的数量,而且优化了动物接触受试物的方法。LLNA 是基于化学品刺激下致敏反应的诱导阶段建立的。与豚鼠试验不同,LLNA 不需要激发皮肤的超敏反应;而且也不需要豚鼠试验中的最大反应,因此不使用佐剂,这样就减少了动物的痛苦。虽然 LLNA 比传统豚鼠试验具有这些优点,但同时必须认识到 LLNA 也有一定的缺陷(如:在某些金属物质的试验中发现假阴性的结果,在某些皮肤刺激物试验中出现假阳性结果),这时必须进行传统的豚鼠试验。

# 化学品 皮肤变态反应试验 局部淋巴结方法

## 1 范围

本标准规定了皮肤变态反应试验——局部淋巴结法的范围、试验基本原则、试验方法、试验数据和报告。

本标准适用于检测化学品致皮肤变态反应作用,即检测皮肤变态反应诱导阶段淋巴细胞增殖的反应,可以提供评估剂量-反应的量化数据。

## 2 试验基本原则

LLNA 的基本原则是致敏化学品在暴露后,能够诱导染毒部位的引流淋巴结内淋巴细胞的增殖。增殖反应与化学品的剂量(和致敏原的致敏力)成比例,因此可以通过简单的方法获得客观、定量的致敏试验数据。LLNA 通过比较受试样品试验组与溶剂对照组增殖的剂量-反应关系来评估增殖状况。对受试样品试验组与溶剂对照组的增殖比率即刺激指数(SI)进行比较,当该指数大于等于 3 时受试样品才能作为潜在皮肤致敏物进行进一步评估。

本文所述 LLNA 法是通过放射标记检测细胞增殖,也可以使用其他的毒性终点的检测手段评价细胞的增殖,但必须提供充足的理由和科学依据,包括完全引用和方法学的描述。

## 3 试验方法

### 3.1 受试物

受试样品可以是液态、固体和颗粒状。

赋形剂应在考虑最大试验浓度和可溶性的基础上进行选择,使形成的溶液/悬浮液适于使用。推荐赋形剂按优先顺序为:丙酮/橄榄油(4:1,体积分数)、二甲基甲酰胺、丁酮、丙二醇和二甲基亚砜,如具备充分的科学依据,也可使用其他赋形剂。在某些情况下有必要增加受试物使用的临床赋形剂或商品化制剂作为另外的对照。特别注意要使亲水物质分散在赋形剂系统中,这样既能湿润皮肤,又不会立即流失,但要避免使用只含水的赋形剂。

### 3.2 实验动物和饲养环境

#### 3.2.1 动物种属

选择未生育过和未怀孕的成年雌性小鼠(CBA/Ca 或 CBA/J 品系)。试验开始时鼠龄为 8 周~12 周,体重变异应小于平均体重的 20%。选择其他种属或雄性动物时应有充足的证据表明在该试验中不存在种属和性别的差异。

#### 3.2.2 动物饲养

动物单笼饲养,实验动物房温度应为  $23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,除了清理动物房时外,其他时间的相对湿度应在 30%~70%之间,最好保持在 50%~60%。应采用人工照明,每天 12 h 明暗交替。采用常规实验室饲料,不限制饮水。

#### 3.2.3 动物数量

每一剂量组至少应有 4 只动物,受试物至少设三个剂量组,一个赋形剂阴性对照组,还应酌情考虑设立阳性对照组。收集每只动物的资料,每组动物数至少 5 只。

### 3.3 剂量设计

剂量可以从下列浓度系列中选择:100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%等。在选择三个



连续剂量时应考虑现有的急性毒性和皮肤刺激性资料,最高剂量组应避免出现系统毒性和剧烈的局部皮肤刺激性。对照组动物除了不给予受试样品外,其余处理方法与试验组完全相同。

### 3.4 试验步骤

#### 3.4.1 试验前准备

试验前 5 d 置于饲养笼内饲养以适应实验室环境,并于试验前检查,确保动物无可见的皮肤损伤。对随机选择分组的动物进行编号(不能在耳朵上标记)。

#### 3.4.2 对照

##### 3.4.2.1 阳性对照

阳性对照的设立用于验证试验过程的合理性,以及实验室成功实施试验的能力。阳性对照应该产生阳性的试验结果,所以在进行某个剂量水平的染毒后,与阴性对照相比,其刺激指数(SI)的增加应在 3 倍以上。阳性对照剂量的选择应是能够产生明显但又不过度的致敏诱导作用。首选的阳性物为己基苯乙烯乙醛(CAS No. 101-86-0)和巯基苯并噻唑(CAS No. 149-30-4)。根据具体情况,也可以使用符合上述标准的其他阳性对照物。一般每次实验都需要阳性对照组,但如果同一实验室以往的阳性对照资料显示,在 6 个月或更长时间内的阳性反应具有良好的一致性,最长可每 6 个月进行一次阳性物对照试验。虽然阳性对照物溶解在特定的赋形剂(如:丙酮/橄榄油)中易于产生一致的实验结果,但在一些特殊规定的情况下,需要溶解在非标准的赋形剂(如临床/化学相关的试剂)中进行实验,这时应测试阳性对照物是否会与赋形剂发生化学反应。

##### 3.4.2.2 阴性对照

一般即为赋形剂对照。赋形剂必须是非致敏物,不与受试样品发生化学反应。仅以赋形剂为受试物。

#### 3.4.3 试验步骤

第 1 天:确定并记录每只动物的体重。将 25  $\mu\text{L}$  受试样品稀释液、赋形剂或阳性对照物(如需要)涂于相应组别动物的耳背。

第 2~3 天:重复第一天的操作。

第 4~5 天:不进行处理。

第 6 天:记录每只动物的体重。将 250  $\mu\text{L}$  含 20  $\mu\text{Ci}$  ( $7.4 \times 10^5 \text{ Bq}$ )  $^3\text{H}$ -甲基胸腺嘧啶脱氧核苷的 PBS 注射入所有试验组和对照组小鼠的尾静脉;或注射 250  $\mu\text{L}$  含 2  $\mu\text{Ci}$  ( $7.4 \times 10^4 \text{ Bq}$ )  $^{125}\text{I}$ -碘脱氧尿嘧啶核苷和  $10^{-5} \text{ M}$  氟脱氧尿嘧啶核苷的 PBS。5 h 后处死动物。摘取每一只试验动物耳部的引流淋巴结并浸泡于 PBS 中(以每个实验组为单位),或摘取每只动物的双侧引流淋巴结并浸泡于 PBS 中(以每只动物为单位)。

#### 3.4.4 细胞悬液的准备

用 200  $\mu\text{m}$  孔径的不锈钢网纱对上述步骤中所取的成组动物的淋巴结或单只动物的双侧淋巴结轻柔地进行机械分离,制成单细胞悬液,然后用大量的 PBS 洗涤两次,并用 5% 三氯乙酸(TCA)在 4℃ 时沉淀 18 h。沉淀物用 1 mL TCA 重新混悬转移至闪烁瓶中(内含 1.0 mL 闪烁液)进行  $^3\text{H}$ -计数,或直接转移至  $\gamma$  计数管中进行  $^{125}\text{I}$ -计数。

#### 3.4.5 细胞增殖测定(合并放射能)

用  $\beta$ -闪烁计数器测定  $^3\text{H}$ -甲基胸腺嘧啶脱氧核苷,以每分钟衰变数(DPM)计算;或用  $^{125}\text{I}$ -计数器测定  $^{125}\text{I}$ -碘脱氧尿嘧啶核苷,亦以 DPM 计算。根据计算方式的不同,检测结果分别以 DPM/试验组或 DPM/只表示。

#### 3.4.6 临床观察

仔细观察动物的任何临床症状、用药局部刺激反应及系统毒性出现情况。系统观察并记录每只动物的临床表现。

### 3.4.7 体重

在试验开始和结束时(处死动物前)均应称量并记录每只动物的体重。

### 3.4.8 结果计算

3.4.8.1 结果以  $SI$  表达。若以组为单位,则  $SI$  为试验组  $DPM$ /阴性对照组  $DPM$ ;若以每只动物为单位, $SI$  为每个受试样品试验组和阳性对照组的平均  $DPM$ /阴性对照组的平均  $DPM$ 。阴性对照组的平均  $SI$  为 1。

3.4.8.2 使用单只动物法计算  $SI$  更有利于数据的统计分析。在选择合适的统计分析方法时,应注意可能存在的方差不齐和其他相关问题,有必要对数据进行转换或者进行非参数统计分析。以适当的方法解释数据,对试验组和对照组的所有个体资料进行评价,并由最好的剂量-反应曲线计算可信限( $CI$ )。同时应注意在同组中可能存在个别异常结果,这时应该选择其他的分析方法(如用中位数而不是平均数)或删除该异常值。

3.4.8.3 阳性反应的确定。 $SI$  大于或等于 3、存在剂量-反应关系并具有统计学意义。

3.4.8.4 需要阐述结果时,应该考虑到受试样品的多种特性,包括其是否与已知的皮肤致敏物有结构关联、是否引起严重的皮肤刺激,以及观察到的剂量-反应关系的性质。

## 4 试验数据和报告

### 4.1 数据

以列表形式表示平均  $DPM$  值和每一只小鼠的  $DPM$  值以及每一剂量组的(包括阴性对照组的)  $SI$ 。

### 4.2 试验报告

报告应包括以下内容:

#### 4.2.1 受试样品

- a) 名称和识别码(如 CAS 编号、来源、纯度、已知的杂质和批号);
- b) 物理性质和理化特性(如挥发性、稳定性和溶解度);
- c) 若为混合物,其组分和相对含量。

#### 4.2.2 溶剂

- a) 溶剂名称和识别码(纯度、浓度、使用体积);
- b) 选择的依据。

#### 4.2.3 实验动物

- a) 小鼠的品系;
- b) 动物的微生物学状况(如已掌握);
- c) 数量、年龄和性别;
- d) 动物来源、饲养条件、饲料等。

#### 4.2.4 试验条件

- a) 受试样品制备和使用的详细情况;
- b) 剂量选择的依据(如果进行预试验,列出剂量及结果);
- c) 赋形剂和受试样品的浓度,以及受试物使用总量;
- d) 饲料和饮水质量的详细情况(包括饲料类型和来源、饮水来源)。

#### 4.2.5 可靠性检查

- a) 最新的可靠性检查结果的总结,包括受试物、使用浓度和赋形剂的相关信息;
- b) 实验室当前和以往阳性、阴性对照的检测结果。

#### 4.2.6 结果

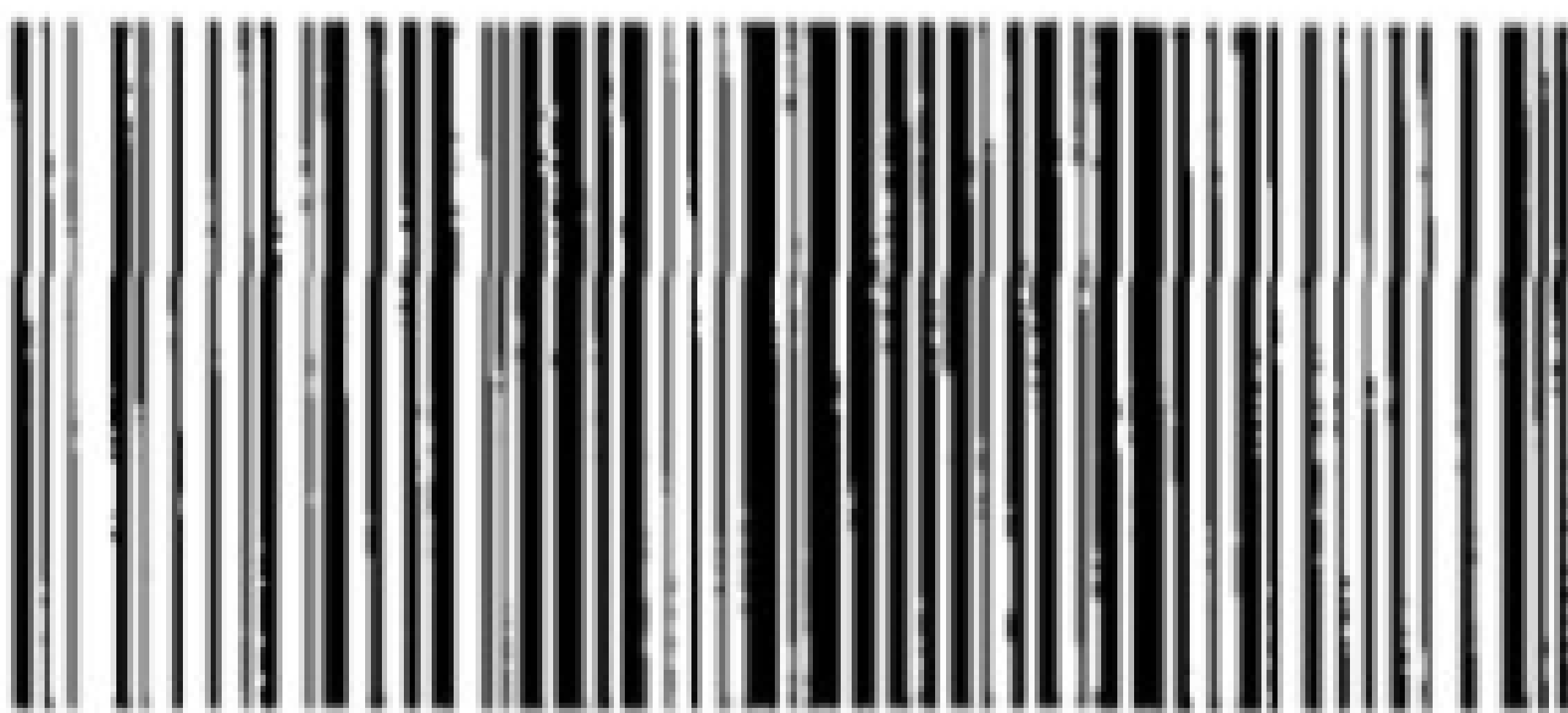
- a) 染毒前和处死前每只动物的体重;

- b) 以表格形式列出组 *DPM* 平均值/中位数,单只动物的 *DPM* 值,整组和单只动物结果分别的可信区间,以及每个剂量组(包括溶剂对照组)的 *SI*;
- c) 统计分析;
- d) 毒性发作和症状出现的时间进程,包括每只动物在受试部位局部皮肤刺激反应。

4.3 结果讨论

对结果、剂量-反应关系分析和所用的统计分析方法进行简要说明。得出该受试样品是否为皮肤致敏物的结论。

\_\_\_\_\_



GB/T 21827-2008

版权专有 侵权必究

\*

书号:155066 · 1-32502

定价: 10.00 元