指导原则编号：

【Z】	G	P	T	5	-	1

中药、天然药物免疫毒性（过敏性、光过敏反应）研究的技术指导原则

二〇〇五年三月

目　　录

一、概述……1
二、基本内容……2
（一）基本原则……2
（二）过敏反应试验……3
1、试验中应考虑的问题……3
2、I 型过敏反应试验……4
3、II、Ⅲ型过敏反应试验……6
4、Ⅳ型过敏反应试验……6
（三）光过敏反应试验……6
（四）结果分析及评价……7
（五）常见问题及处理……8
（六）不同剂型的中药、天然药物试验项目的选择……10
三、参考文献……10
四、附录……11
（一）主动皮肤过敏试验……11
（二）主动全身过敏试验……13
（三）被动全身过敏试验……15
（四）豚鼠最大化试验和 Buehler 试验……16
（五）皮肤光过敏反应试验……18
五、著者……20

中药、天然药物免疫毒性（过敏性、光过敏反应）研究的技术指导原则

一、概述

免疫毒理学是毒理学中一门重要的分支学科，其目的是探讨外源性化合物对机体（人和实验动物）免疫系统产生的不良影响及机理。免疫毒性是指外源性化合物对机体免疫系统的损伤作用，包括两类，一是免疫抑制，即免疫系统的广泛抑制，可致机体对感染的易感性增加及肿瘤发生率增高；另一是免疫增强，即免疫系统反应性过度增强，可能包括免疫性产生，过敏反应（超敏反应或变态反应）、自身免疫反应以及不良免疫刺激等。

过敏反应指变态反应，又称超敏反应，是指机体受同一抗原再次刺激后产生的一种异常或病理性免疫反应。按抗原与抗体或细胞反应的方式和补体是否参加等，将过敏反应分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ四型。其中Ⅰ型过敏反应是了解得最多的一种过敏反应，目前采用的过敏试验方法多数是根据Ⅰ型过敏反应发病机制的不同环节而设计建立的。

光过敏反应为IV型过敏反应的特殊类型，是局部给药和全身给药后，分布在皮肤的药物中所含的感光物质与光线产生复合作用使得用药后皮肤对光线产生的不良反应。

中药、天然药物为一种外源性物质，也可能作为过敏原引发机体产生过敏反应。

由于免疫系统是增生活跃的系统，因此对外源性物质非常敏感，但每一种化学物质都有其特定的靶器官，因此不必盲目地对所有受试物进行免疫毒性监测，而是选择性地对某些受试物特别是以免疫系统为靶器官的毒

物进行研究。用于某些适应症的药物，因其作用机制的特殊性，对人体免疫系统可能产生影响；另外，当受试物是已知的免疫调节剂的情况，或在安全性评价过程中初步发现对免疫系统有明显影响的药物也应进行免疫毒性的评价。若需要进行其他免疫毒性评价的药物，建议可在其长期毒性试验中，增加免疫系统损伤的评价指标。

因人群免疫毒理学研究存在下述困难：在人群中观察到免疫功能损伤需要的时间较长，且人群接触的剂量较低，也难以观察到剂量-反应关系。人群免疫毒理学研究中缺乏特异性指标，缺乏非损伤性方法。对免疫功能检测结果评定时缺乏正常值或参考值。因此，认为动物免疫毒理学评价对估测人群的免疫毒性具有一定的意义。

该技术指导原则适用于拟用于人和/或已上市的中药、天然药物的免疫毒性研究。主要内容包括免疫毒性评价中的过敏反应试验和光过敏试验。

二、基本内容

（一）基本原则

根据《中华人民共和国药品管理法》，药物的免疫毒性试验必须执行“药物非临床研究质量管理规范”。

实验设计应符合随机、对照、重复的原则。

应在遵循安全性评价普遍规律的基础上，运用具体问题具体分析的方法，结合受试物的自身特点，充分考虑和结合药学、药效学、其他毒理学（长毒、急毒）及拟临床应用情况等信息，体现整体性、综合性的原则，在阐明其研究方法或手段科学、合理的前提下进行规范性试验，对试验结果应进行全面分析和综合评价，以达到免疫毒性研究的目的。

（二）过敏反应试验

1．试验中应考虑的问题

1.1 方法

中药、天然药物应进行何种过敏反应研究，可根据药物自身特点、临床适应症和给药方式确定。

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和被动皮肤过敏试验，透皮吸收剂需进行主动皮肤过敏试验等。

Ⅱ和Ⅲ型过敏反应可在进行长期毒性试验中选择相关指标进行观察，如观察动物的体征、一般表现及免疫系统损伤的评价指标等。

经皮给药制剂（包括经皮给药发挥全身作用或局部作用的药物）应进行 IV 型过敏反应试验。

具体试验方法的选择应根据给药途径、过敏反应发生机制、影响因素和临床意义等为基础进行选择，如主动皮肤过敏试验、主动全身过敏试验、被动皮肤过敏试验、Buehler 分析法（BT）、豚鼠最大值法（Guinea-Pig Maximization Test, GPMT）等，也可采用其它的检测方法，但需阐明其合理性并说明具体方法及操作流程。

1.2 受试物

过敏试验中的受试物应同临床应用制剂相一致，即采用中试或中试以上规模的、制备工艺稳定、符合临床试用质量标准规定的样品。否则，应有充分的理由。同时，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。试验中所用辅料、溶剂或赋形剂等应标明批号、

规格和生产厂家，并符合试验要求。

1.3 对照

过敏试验均应设立阳性对照和阴性对照。

1.4 剂量

可选择多个剂量进行试验，尽可能找出无过敏反应的剂量，以提示临床进行脱敏处理的起始剂量；也可避免因剂量过低而出现假阴性结果；另外，可帮助判断阳性结果是否因强刺激反应而引起。

1.5 给药途径

（1）皮肤给药：经皮给药的受试物应保证在局部的有效暴露时间。

（2）静脉给药：应注意给药剂量和给药速度对动物过敏反应发生的影响，排除类过敏反应。静脉注射进行激发试验中应保证足量、一次性快速地将受试物注射入动物体内。

2、Ⅰ型过敏反应试验

Ⅰ型过敏反应又称速发型过敏反应或超敏反应，药物分子本身为过敏原，进入机体刺激免疫系统产生相应的 IgE 抗体，IgE 抗体附着在肥大细胞及嗜碱性细胞上使之致敏，当同一抗原再次进入机体后，即与肥大细胞及嗜碱性细胞表面的 IgE 抗体发生抗原抗体反应，导致肥大细胞及嗜碱性细胞脱颗粒并释放生物活性介质，作用于不同的组织和器官，产生不同的病理生理反应。临床表现为过敏性休克、支气管哮喘、变应原鼻炎、胃肠道与皮肤过敏反应等。

Ⅰ型过敏反应通常用主动皮肤过敏试验（ACA）、主动全身过敏试验（ASA）和被动皮肤过敏试验（PCA）等考察，对于吸入途径药物常采用呼

吸道敏感性检测。

2.1 主动皮肤过敏试验（Active Cutaneous Anaphylaxis, ACA ）

皮肤过敏是一种受试物产生免疫学传递的皮肤反应。当动物初始接触受试物后至少 1 周，再进行受试物的激发接触，有可能导致过敏状态。

本试验的目的是观察受试物经皮肤重复接触受试物后，机体免疫系统反应在皮肤上的表现，即有无过敏反应及过敏强度如何。

2.2 主动全身过敏试验（Active Systemic Anaphylaxis, ASA）

当药物作为抗原或半抗原初次进入体内，刺激机体产生相应的抗体(IgE)。当同样药物再次进入机体，抗原与抗体结合形成的抗原抗体复合物，刺激肥大细胞及嗜碱性细胞释放活性介质，从而引起局部水肿、抓鼻、竖毛、呼吸困难、窒息、痉挛，甚至休克死亡。

本试验的目的是观察受试物给药后对动物引起的过敏反应。

2.3 被动皮肤过敏试验（Passive Cutaneous Anaphylaxis, PCA）

被动皮肤过敏试验是一种较敏感的测试特异抗体滴度的方法。将受试物致敏动物的血清（含丰富的 IgE 抗体）给正常动物皮内注射，IgE 的 Fc 端与皮肤的肥大细胞表面的特异受体结合，形成 IgE 的复合物，使肥大细胞致敏。当抗原攻击时，抗原与肥大细胞表面上 IgE 的 Fab 端结合，导致 IgE 分子结构的改变，引起肥大细胞脱颗粒，释放过敏介质如组胺、慢反应物质等，使皮肤局部血管的通透性增加，使静脉注射抗原的同时注入的伊文思蓝染料在该皮肤处渗出着色。根据局部皮肤蓝染范围或程度，可判定血管通透性变化的大小，继而判定皮肤过敏反应的程度。

上述三种试验方法可参见附录。

3、Ⅱ型和Ⅲ型过敏反应试验

Ⅱ型过敏反应又称细胞毒或溶细胞型。药物分子进入机体后附着在细胞膜（通常是血细胞）上，并刺激免疫系统产生相应抗体，参与的抗体主要是 IgG 和 IgM，特点是由抗体直接与靶细胞膜上的抗原结合而导致细胞溶解。临床可表现为药物性溶血性贫血、粒细胞减少和血小板减少性紫癜等。

Ⅲ型过敏反应又称免疫复合物型或血管炎型。药物分子进入机体刺激免疫系统产生相应抗体（IgG, IgM），当抗原抗体两者呈一定比例时形成免疫复合物，沉积于组织的血管基底膜上，导致血管壁的损伤及炎症反应。常见反应如血清病、变应性肾小球肾炎、全身性红斑狼疮样反应等。

上述两种过敏反应尚无标准的临床前试验进行预测。

当药理学和毒理学试验结果提示有潜在的 II 和 III 型过敏反应时,建议可进行进一步的相关试验研究。

4、IV 型过敏反应试验

Ⅳ型过敏反应又称迟发型。药物直接作用于 T 淋巴细胞使之致敏，当同一药物再次接触已致敏的淋巴细胞，则激发致敏淋巴细胞释放介质而导致组织损伤。 此类反应无抗体参与，发生较慢，一般在再次接触相同抗原 48~72 小时后才出现临床表现。主要表现为药疹、接触性皮炎、剥脱性皮炎等。

试验方法可参见附录。

（三）光过敏反应（光变态反应）试验

光敏反应是用药后皮肤受光线刺激而产生的不良反应，包括光毒反应

和光变态反应或光过敏反应两类，均由受试物所含的感光物质引起，但两者机制不同，实验方法、临床表现及意义亦不同。

光过敏反应（光变态反应）是获得性的免疫性介导的由光激活的皮肤对光的反应，系光感物质经皮吸收或通过循环到达皮肤后与吸收的光线在表皮细胞层发生的反应。即药物吸收光能后成激活状态，并以半抗原形式与皮肤中的蛋白结合成为药物-蛋白质结合物（全抗原），经表皮的郎罕氏细胞（Langerhans）传递给免疫活性细胞，引起过敏反应的作用。光过敏反应属 IV 型（迟发型）过敏反应。其发生时间相对较长，且有一定的潜伏期。通常 5~10 天的连续用药和光照射可诱导免疫系统产生光过敏反应。再次给药时，药物和日照作用 24-48 小时之内即会有光过敏反应发生。

光过敏反应可由局部给药和系统给药诱发，并不仅限于局部给药。因此，原则上所有给药途径的药物，只要有皮肤分布，则均应进行光敏检测。若受试物的化学结构或某些组成（包括药物和赋形剂）文献报道有光过敏作用者，或其化学结构与已知光敏剂相似者，曾有报道具有光过敏作用或可疑具有光过敏作用的中药制剂，建议作光过敏试验。

本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过敏反应。

试验方法可参见附录。

（四）结果分析及评价

1、应详细论述实验方法，说明分组、给药剂量、动物数、用药次数等；应详细描述过敏反应的表现、反应持续时间、恢复情况及时间、死亡动物数，以利于对结果的分析和判断。在主动全身过敏反应试验中出现动物死

亡时，应进行解剖，若有明显病变则应进行组织病理学检查，并提供相应的照片。

2、应根据试验结果，按评分方式对不同剂量（或浓度）下反应发生情况及严重程度进行表述，分析过敏反应的量效关系和时效关系及其可逆性，判断数据变化是否与受试物有关，确定过敏反应剂量、安全剂量及安全范围等。

3、结合药效学及其他毒理学试验结果进行综合分析，整体评价，注意不能将动物结果不加分析外推到人，也不能忽略甚至故意舍掉个别出现毒性反应的动物，应实事求是地反映受试物的毒性，根据试验结果得到受试物在临床应用的意义及注意事项等提示。

4、引起机体免疫系统的免疫应答过程是一个十分复杂并需要不断认知的过程。因此，观察中药对机体可能存在的免疫毒性作用的研究工作应尽可能全面、深入。试验者不能以个别或少数实验结果来整体评价受试药物的免疫毒性作用，应根据免疫应答的类型、特点，结合不同实验动物的生理特性，选择合适的动物进行相关试验，以获取较为全面、客观的试验数据。应结合其他毒理学研究结果进行综合评判，方可对中药新药是否具有免疫毒性做出合理正确的结论。

5、在任何临床前毒理研究期间（如急性毒性试验、长期毒性试验、致畸试验、致癌试验等）发现的免疫毒性作用，都应予以评估。

（五）常见问题及处理

1、中药注射剂临床应用中发生不良反应的类型较多，如诱发变态反应的类型包括：Ⅰ型过敏反应（如过敏性休克、支气管哮喘、过敏性鼻炎、

胃肠道与皮肤过敏反应)、Ⅱ型过敏反应，(如溶血性贫血、粒细胞减少和血小板减少性紫癜)、Ⅲ型过敏反应（如血清病、链球菌感染后肾小球肾炎、系统性红斑狼疮）及Ⅳ型过敏反应（如接触性皮炎、湿疹型反应、移植排斥反应)。因此应根据需要，除进行Ⅰ型过敏反应试验外，应结合长期毒性试验结果分析，必要时进行Ⅱ-Ⅳ型过敏反应试验，或进一步的深入研究。

2、在免疫毒性评价中，应重视给药剂量和给药速度对动物过敏反应发生的影响等。应区分伪变态反应,也称为类变态反应的概念，其表现有速发反应的特点，但其发生与免疫机制无关，是没有抗原抗体参与的非免疫机制所致。中药注射剂用药浓度过高和给药速度过快时易发生此种情况。应引起足够的重视。

3、不同类型的中药制剂均可引起不良反应。注射给药，包括静脉内注射与肌肉内注射皆易引发过敏反应。外用中药也易引发过敏反应，如接触性皮炎，药疹或其它类型反应等。因此，不但应重视中药注射剂的免疫毒性，对其他类型的中药制剂同样应予以重视。

4、试验动物的选择：临床前注射剂安全性评价过敏反应的高阴性率与临床出现大量不良反应结果的不一致性使我们有必要思考临床前过敏性试验的地位和价值的评估。建议进行探索性研究，摸索能充分反映注射剂安全性的评价方法。以往过敏试验常选用认为对致敏物质比较敏感的豚鼠，建议在进行中药注射剂犬长期毒性试验时密切关注相关的致敏反应出现情况。

5、鉴于中药注射剂与其他药物相互作用的复杂性，若临床拟与其他药物联合应用，应有充分的联合用药的制剂安全性试验资料证明其安全性。

6、应重视中药间的相互作用及交叉过敏的试验研究。当出现严重的过敏反应时，应加强对重要中药成分体内代谢的研究,了解其代谢物及代谢产物的抗原性,为严重过敏反应的体外检测打下基础。

（六）不同剂型的中药、天然药物试验项目的选择

1、静脉注射剂：应进行主动全身过敏性试验、被动皮肤过敏试验，必要时进行Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型过敏反应试验。

2、肌肉注射剂：应进行主动全身过敏性试验，被动皮肤过敏试验。

3、皮肤（及其他外用）给药制剂：应进行主动皮肤过敏性试验。

4、根据中药制剂作用特点，必要时进行光过敏性试验。

5、中药、天然药物过敏反应与制剂种类密切相关，相同成分不同中药制剂的过敏性等可能明显不同，特别是对过敏研究预试验结果提示有一定过敏作用的受试物，应与相同给药途径的上市制剂进行比较性研究，以保证药物临床应用的安全有效性。

6、根据药物的特性，可选择其他合适的试验项目。需考察刺激性和溶血性试验的制剂，应参照局部刺激性和溶血性指导原则进行。

三、参考文献

1．皮肤用药的毒性试验　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 209-212

2．皮肤用药毒性试验 《新药临床前安全性评价与实践》 军事医学科学出版社　北京　152

3．临床前毒理学实验方法 《药理实验方法学》（第三版）　226

5. Priciples and methods of Tocicology. Fourth edition, edited by A. Wallace

Hayes, Taylor & Francis, Philadelphia. 2001.

6. FDA; Guidance for Industry Immunotoxicology Evaluation of Investigational New Drugs

7. 日本厚生省. 日本新药毒性试验指导原则，1989 年

四、附录

以下试验方法为推荐的试验方法，若有新的、更灵敏、准确、科学的方法，可结合不同受试物进行选择。

（一）主动皮肤过敏试验（ACA ）

1、动物

一般选用豚鼠。给药前背部两侧脱毛，脱毛区应不小于 3×3cm^2。

2、受试物

受试物应与用于人体的制剂一致，应为含活性成分和赋形剂或含透皮促进剂的混合制剂。受试物应采用制备工艺稳定的样品，应明确受试物的提供单位、批号、含量（或浓度)、配制方法等。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。

3、对照

应设置阳性对照药组和阴性或赋形剂对照组，阳性药可选择 2，4-二硝基氯代苯（1%的致敏浓度和 0.1%的激发浓度)。

4、给药范围及暴露时间

在受试物的致敏接触阶段，应充分保证其在皮肤上的停留时间（6 小时）

和接触皮肤的范围。

5、致敏

在第 0、第 7 和第 14 天，以同样的方法局部给药。末次给受试物致敏后 14 天，在激发接触阶段，再次将受试物涂于脱毛区，6 小时左右后，观察 72 小时内皮肤过敏反应情况，并按皮肤过敏反应评分标准进行评分。

6、结果评价

应详细叙述实验方法，按**表 1** 记录各组各时间的平均分值，同时应密切观察动物是否有哮喘、站立不稳或休克等严重的全身性过敏反应出现。

根据试验组和对照组动物皮肤反应的差别，判断受试物对皮肤过敏反应的性质，并根据**表 2** 计算致敏发生率，即将出现皮肤红斑、水肿或全身过敏反应的动物例数（不论程度轻重）除以受试物总数。

表 1　皮肤过敏反应程度的评分标准

皮肤过敏反应	分 值
红斑	
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
水肿	
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 2 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

（二）主动全身过敏试验（ASA）

1．动物

通常选用体重为 300～400 克的豚鼠。

2．分组

应设立阴性、阳性对照组和受试物不同剂量组。阴性对照组应给予同体积的溶媒，阳性对照组给予 1～5mg/只牛血清白蛋白或卵白蛋白或已知致敏阳性物质，受试物低剂量组给予临床最大剂量，受试物高剂量组给予低剂量的数倍量。每组动物数至少 6 只。

3．致敏

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 3-5 次。

4． 激发

4．1 激发途径：一次快速静脉内给药。

4．2 激发次数：末次注射后第 10～14 日一次激发。

4．3 激发剂量：一般为致敏剂量的 2～5 倍量，给药容积 1～2ml。

5．观察指标

5．1 致敏期间：每日观察每只动物的症状。初次，最后一次致敏和激

发当日测定每组每只动物的体重。

5．2 激发及激发后：静脉注射激发后立刻至30分钟，按表3症状详细观察每只动物的反应，症状的出现及消失时间。一般应观察3小时。

6．结果评价

可按表 4 判断过敏反应发生程度。计算过敏反应发生率。根据过敏反应发生率和发生程度进行综合判断。

若出现过敏反应，必要时可进行过敏的剂量效应关系研究，争取找出无过敏反应的剂量，以提示临床进行脱敏处理的起始剂量。

激发注射后，若发现有过敏反应症状时，可取健康未致敏豚鼠 2 只，自静脉注射攻击剂量的受试物，观察有无由于受试物作用引起的类似过敏反应症状，以供结果判断时参考。

表3 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4 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

（三）被动皮肤过敏试验（PCA）

1．动物

PCA 反应常用的动物是大鼠，亦用小鼠，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。

2．分组

应设立阴性、阳性对照组和受试物不同剂量组。阴性对照组应给予同体积的溶媒，阳性对照组给予 1-5mg/只牛血清白蛋白或卵白蛋白或已知致敏阳性物质，受试物低剂量组给予临床最大剂量，受试物高剂量组给予低剂量的数倍量。每组动物数至少 6 只。

3．抗血清制备

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 3～5 次。末次致敏后 10～14 天左右采血，2000 转/分离心 10 分钟，分离血清，-20℃保存，2 周内备用。

4．被动致敏和激发

上述各组抗血清一般用生理盐水稀释成 1：2、1：8、1：32 或合适的稀释度。在动物背部预先脱毛 3×4cm^2的皮内注射各对应组的抗血清 0.1mL。经 24 或 48 小时后,各组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。

5.结果观察

激发注射 30 分钟后麻醉处死各组动物，剪取背部皮肤，进行蓝斑的测定，并提供蓝斑照片。

蓝斑的测定可采用直接测定法或比色测定法。直接测定法是指取对照

组和用药组两组的蓝色斑直径的平均值，计算出变化百分率。比色测定法是将蓝色斑片剪下，剪碎后加入丙酮-生理盐水（7:3）混合液 5-6ml，浸泡后次日离心，在 610nm 波长处测定其吸收度。取两组的吸收度平均值，计算出变化百分率。

6、结果评价

可用不同的评价方法。一种是以呈阳性反应的最高稀释倍数的抗体效价为指标。另一种是固定血清稀释倍数后，以蓝斑的大小或光密度值为指标。蓝斑直径在 5mm 以上者判定为阳性。

（四）豚鼠最大化试验（GPMT）和 Buehler 试验（BT）

1．动物

选择成年豚鼠，雌雄不拘。受试物组不少于 20 只、对照组不少于 10 只。

2．对照

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，也可以使用其它的阳性对照物，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。

3．剂量

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。

4．试验步骤

4．1 Buehler 试验在第 0，6～8 和 13～15 天用封闭片局部给药以诱导，在第 27-28 天在未给药的肋腹部贴 6 小时以局部激发。去除封闭片 24 和 48 小时后读取结果。如果结果难以判定，一周后再次激发，可采用原来的对照组或新的对照组。可采用剪、刮或脱毛的手段去除给药部位的毛发，去除受试物建议采用水或适当溶剂，以不改变已经存在的皮肤反应和表皮的完整性为宜。

4．2 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。同 Buehler 试验一样，如果结果难以判定，一周后再次激发。

5．观察指标

5．1 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，参照表 5 进行皮肤反应评分，根据表刺激反应的评分标准对红斑和水肿进行评分。可根据毒性反应情况适当调整观察时间。

5．2 测定开始和结束时的动物体重。

6．结果评价

计算过敏反应发生率。按表 6 判断过敏反应强度。

表 5 皮肤反应评分标准

皮肤反应强度	积 分
（1）红斑形成	
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
（2）水肿形成	
无水肿	0
轻度水肿	1
中度水肿	2
重度水肿	3
总积分	7

表 6 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

（五）皮肤光过敏反应试验

1． 动物

原则上使用健康白色豚鼠，每组不少于 5 只。

2．分组

应设阳性对照药组、阴性对照组和受试物组。

3．方法

3．1 Adjuvant and Strip 法：本法是先皮内注射 FCA，用透明胶带擦伤皮肤角质层，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。

3．2　Harber 法：涂敷受试物，照射紫外线，此操作隔日进行一次共 3 次致敏。3 周后再次涂敷受试物的稀释液，30 分钟后照射紫外线激发。

3．3　Horio 法：涂敷 20%的月桂醇硫酸钠，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。

3．4 Jordan 法：本法是用尼龙刷子擦伤皮肤后，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。

3．5　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。

3．6 Morikawa 法：本法是 Harber 改良法，涂敷受试物，30 分钟后照射紫外线，本操作每周连续 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。

3．7 Vinson 法：涂敷受试物，照射紫外线，本操作每日一次，连续 5 次进行致敏，7～10 天后，再次涂敷受试物，照射紫外线进行激发。

4．结果评价

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的。在分析结果时，必须遵守各试验方法所记载的判定标准，对受试物的皮肤光敏性反应进行评价。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（不合并使用佐剂）进行试验，其中非擦伤性试验方法，有利于光敏性反应评价。另外，光敏性是光毒性和光敏性两类混合难分的

反应。必要时，应追加研究光毒性试验。

五、著者

《中药、天然药物免疫毒性（过敏性、光过敏反应）研究的技术指导原则》课题研究组