



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 16886.23—2023/ISO 10993-23:2021

## 医疗器械生物学评价 第 23 部分：刺激试验

Biological evaluation of medical devices—Part 23: Tests for irritation

(ISO 10993-23: 2021, IDT)

2023-11-27 发布

2024-12-01 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布



## 目 次

前言 .....	V
引言 .....	VI
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	2
4 基本原则——逐步评价法 .....	4
5 试验前的考虑 .....	4
5.1 总体要求 .....	4
5.2 材料类型 .....	4
5.2.1 基本考虑 .....	4
5.2.2 陶瓷、金属和合金 .....	5
5.2.3 聚合物 .....	5
5.2.4 生物衍生材料 .....	5
5.3 化学组成方面的信息 .....	5
5.3.1 总体要求 .....	5
5.3.2 现有的数据来源 .....	5
6 体外刺激试验 .....	5
6.1 总则 .....	5
6.2 体外重建人表皮模型 .....	6
6.2.1 试验系统——重建人类表皮模型 .....	6
6.2.2 试验原则 .....	6
6.2.3 预测模型 .....	7
6.3 材料 .....	7
6.3.1 重建人类表皮模型——产品说明 .....	7
6.3.2 医疗器械浸提液制备 .....	7
6.4 方法 .....	8
6.4.1 总则 .....	8
6.4.2 试验步骤 .....	8
6.4.3 培养基和终点溶液 .....	9
6.4.4 试验样品和对照制备 .....	9
6.5 试验的注意事项 .....	10
6.5.1 重建人表皮组织的接收 .....	10
6.5.2 准备及预培养 .....	10

6.6	加样和冲洗	10
6.6.1	总则	10
6.6.2	准备	10
6.6.3	试验浸提液及对照的接触	10
6.7	用于测定接触阶段后 RhE 组织活性的 MTT 试验	11
6.7.1	MTT 培养和异丙醇萃取	11
6.7.2	吸光度测量	11
6.8	试验接受准则	12
6.9	数据计算步骤	12
6.9.1	总则	12
6.9.2	RhE 试验中 OD 测定的异丙醇背景对照	12
6.9.3	DPBS 或 PBS 处理的阴性对照	12
6.9.4	阳性对照	12
6.9.5	试验浸提液和 VC 样品(TTs)	13
6.10	数据解释-预测模型	13
6.11	方法记录单	13
7	体内刺激试验	14
7.1	总则	14
7.2	皮肤接触的动物刺激试验	14
7.2.1	原则	14
7.2.2	试验材料	14
7.2.3	动物与管理	15
7.2.4	试验步骤	15
7.2.5	动物观察	16
7.2.6	结果评价	17
7.2.7	试验报告	18
7.3	皮内(皮肤内)途径的动物刺激试验	19
7.3.1	概述	19
7.3.2	应排除的试验材料	19
7.3.3	试验样品	19
7.3.4	动物与管理	19
7.3.5	试验步骤	19
7.3.6	动物观察	20
7.3.7	结果评价	21
7.3.8	试验报告	21
8	人体皮肤刺激试验	22
8.1	通则	22

8.2 初步考虑 .....	22
附录 A (规范性) 刺激试验材料制备 .....	23
附录 B (资料性) 用重建人皮模型进行体外刺激试验的试验方法核对清单 .....	25
附录 C (资料性) 重建人表皮模型的方法记录表示例 .....	27
附录 D (规范性) 特殊刺激试验 .....	31
附录 E (规范性) 人体皮肤刺激试验 .....	45
附录 F (资料性) 刺激试验背景信息 .....	49
参考文献 .....	51



## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是 GB/T(Z) 16886《医疗器械生物学评价》的第 23 部分。GB/T(Z) 16886 已经发布了以下部分：

- 第 1 部分：风险管理过程中的评价与试验；
- 第 2 部分：动物福利要求；
- 第 3 部分：遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验；
- 第 4 部分：与血液相互作用试验选择；
- 第 5 部分：体外细胞毒性试验；
- 第 6 部分：植入后局部反应试验；
- 第 7 部分：环氧乙烷灭菌残留量；
- 第 9 部分：潜在降解产物的定性和定量框架；
- 第 10 部分：刺激与皮肤致敏试验；
- 第 11 部分：全身毒性试验；
- 第 12 部分：样品制备与参照材料；
- 第 13 部分：聚合物医疗器械降解产物的定性与定量；
- 第 14 部分：陶瓷降解产物的定性与定量；
- 第 15 部分：金属与合金降解产物的定性与定量；
- 第 16 部分：降解产物与可沥滤物毒代动力学研究设计；
- 第 17 部分：可沥滤物允许限量的建立；
- 第 18 部分：风险管理过程中医疗器械材料的化学表征；
- 第 19 部分：材料物理化学、形态学和表面特性表征；
- 第 20 部分：医疗器械免疫毒理学试验原则和方法；
- 第 22 部分：纳米材料指南；
- 第 23 部分：刺激试验。

本文件等同采用 ISO 10993-23:2021《医疗器械生物学评价 第 23 部分：刺激试验》。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会(SAC/TC 248)归口。

本文件起草单位：山东省医疗器械和药品包装检验研究院、中国食品药品检定研究院、北京市医疗器械检验研究院(北京市医用生物防护装备检验研究中心)。

本文件主要起草人：范春光、王国伟、陈亮、王蕊、陈丽媛、贺学英、刘香东。

## 引 言

本文件用于评估医疗器械可能引起的刺激性接触危险。

医疗器械中所含有的某些材料已进行过试验,其潜在的皮肤、黏膜刺激性已被确认。其他一些未做过试验的材料及其化学成分在与人体组织接触时可能会产生不良作用。因此,制造商有责任在投放市场前评价器械的潜在不良作用。

医疗器械或其组件的潜在刺激性能通过体内动物刺激试验或通过经确认可用于医疗器械的体外刺激试验进行预测。

GB/T 16886.2 描述了为医疗器械生物学评价进行动物研究的动物福利方面的内容,因此本文件中也强调了动物研究的替代、减少和优化的 3R 原则。本文件描述了通过体外试验或体内试验来检测医疗器械、材料或其浸提液的刺激性的试验。在经适当验证同样能提供体内试验获取的相关信息时,体外试验优先于体内试验(见 GB/T 16886.1 和 GB/T 16886.2)。

传统上,人体试验之前要先进行小动物试验以助于预测人体反应。最近,还增加了作为辅助或替代的体外试验以及人体试验。利用重建人表皮(RhE)模型开发了用于纯化学物皮肤刺激试验的体外试验。该方法被应用于检测医疗器械浸提液中的刺激性化学物质。一项测试两种类型 RhE 模型的大型比对试验结果表明,这些模型也可用于检测常用于制造医疗器械的高分子材料[聚氯乙烯(PVC)和硅树脂]中浸提出的刺激性化学物质。在检测一些低浓度强刺激性化合物时,本方法与人斑贴试验和兔皮内反应试验相比同样敏感。因此,刺激物检测的逐步评价程序可以从 RhE 模型体外试验开始。

成熟的和经验证的 RhE 模型适用于预测皮肤组织的刺激反应。推荐探索使用其他体外替代模型来评估应用于黏膜或眼上皮器械的潜在刺激性。

进行这些研究用于注册申报时遵循 GLP 或适用于相关国家的 ISO/IEC 17025,并遵守与动物福利有关的规则。建议在适宜的情况下对数据进行统计分析。

本文件由经过培训的且有经验、有适当资格的专业人员使用,能够解释标准要求并能考虑与器械全部相关因素,包括器械的预期用途、由科学文献的评审和先前临床经验给出的该医疗器械的当前知识,来判定每一医疗器械的评价结果。

本文件所包括的试验是安全产品开发的重要工具。前提是它们由经过培训的人员进行试验并解释试验结果。

本文件以诸多标准和导则为基础,包括经济合作与发展组织(OECD)试验导则(TG)、美国药典和欧洲药典。本文件旨在作为基础文件,用于选择和实施能评价与医用材料和器械安全性相关的刺激反应的试验。

附录 A 中给出了具体涉及以上试验材料制备的说明。附录 D 中描述了几种特殊的体内刺激试验,用于非皮肤区域应用的医疗器械。此外,附录 E 提供了进行人体皮肤刺激试验的信息。

GB/T(Z) 16886《医疗器械生物学评价》拟由二十一个部分构成:

- 第 1 部分:风险管理过程中的评价与试验。目的是保护人类免于因使用医疗器械所产生的潜在生物学风险,并在风险管理过程中描述医疗器械生物学评价,将其作为医疗器械总体评价和开发过程的一个组成部分。
- 第 2 部分:动物福利要求。目的是最大限度利用科学合理的非动物试验,确保用于评价医疗器械所用材料的生物学性能动物试验符合认可的伦理和科学原则。
- 第 3 部分:遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验。目的是为已确定具有潜在的遗传毒性、致癌性或生殖毒性的医疗器械提供评价指南和方法。

- 第4部分:与血液相互作用试验选择。目的是为医疗器械与血液相互作用评价提供通用要求。
- 第5部分:体外细胞毒性试验。目的是为评估医疗器械体外细胞毒性提供试验方法。
- 第6部分:植入后局部反应试验。目的是为评估医疗器械所用生物材料植入后局部反应提供试验方法。
- 第7部分:环氧乙烷灭菌残留量。目的是为经环氧乙烷(EO)灭菌的单件医疗器械上EO及2-氯乙醇(ECH)残留物的允许限量、EO及ECH残留量提供检测步骤以及确定器械是否可以出厂提供检测方法。
- 第9部分:潜在降解产物的定性和定量框架。目的是为系统评价医疗器械潜在的和已观察到的生物降解以及生物降解研究的设计与实施提供基本原则。
- 第10部分:刺激与皮肤致敏试验。目的是为医疗器械及其组成材料潜在刺激和皮肤致敏提供评价步骤。
- 第11部分:全身毒性试验。目的是为评价医疗器械材料导致潜在不良全身反应时提供试验步骤指南。
- 第12部分:样品制备与参照材料。目的是为医疗器械生物学评价中样品制备方法和参照材料提供选择指南。
- 第13部分:聚合物医疗器械降解产物的定性与定量。目的是为用于临床的成品聚合物医疗器械模拟环境的降解产物定性与定量试验设计提供通用要求。
- 第14部分:陶瓷降解产物的定性与定量。目的是为从陶瓷材料获取降解产物定量用的溶液提供方法。
- 第15部分:金属与合金降解产物的定性与定量。目的是为金属医疗器械或可供临床使用的相应材料样品的降解产物提供定性与定量试验设计的通用要求。
- 第16部分:降解产物与可沥滤物毒代动力学研究设计。目的是提供与医疗器械相关的设计和毒代动力学研究的原则。
- 第17部分:可沥滤物允许限量的建立。目的是为医疗器械可沥滤物允许限量的建立提供方法。
- 第18部分:风险管理过程中医疗器械材料的化学表征。目的是为医疗器械成分的定性和定量(必要时)以识别生物危险以及估计和控制材料成分中的生物学风险提供框架。
- 第19部分:材料物理化学、形态学和表面特性表征。目的是识别与评价最终医疗器械材料的物理特性,如物理化学、形态学和表面特性(PMT)的各种参数和试验方法。
- 第20部分:医疗器械免疫毒理学试验原则和方法。目的是为医疗器械潜在免疫毒性方面提供免疫毒理学综述以及为检验不同类型医疗器械的免疫毒性提供方法指南。
- 第22部分:纳米材料指南。目的是为包含、产生或由纳米材料组成的医疗器械生物学评价提供指南。
- 第23部分:刺激试验。目的是为医疗器械及其组成材料潜在刺激提供评价步骤。



# 医疗器械生物学评价

## 第 23 部分:刺激试验

### 1 范围

本文件规定了医疗器械及其组成材料潜在刺激的评估步骤,包括以下内容:

- 刺激试验前的考虑,包括皮肤接触方面的计算机模拟试验和体外方法;
- 详细的体外和体内刺激试验步骤;
- 结果解释的关键因素。

本文件适用于根据 ISO 10993-1 和 ISO 10993-2 对医疗器械、材料或其浸提液的潜在刺激性进行预测和分类。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 16886.1—2022 医疗器械生物学评价 第 1 部分:风险管理过程中的评价和试验(ISO 10993-1:2018, IDT)

ISO 10993-1 医疗器械生物学评价 第 1 部分:风险管理过程中的评价与试验(Biological evaluation of medical devices—Part 1: Evaluation and testing within a risk management process)

ISO 10993-2 医疗器械生物学评价 第 2 部分:动物福利要求(Biological evaluation of medical devices—Part 2: Animal welfare requirements)

注: GB/T 16886.2—2011 医疗器械生物学评价 第 2 部分:动物福利要求(ISO 10993-2:2006, IDT)

ISO 10993-9 医疗器械生物学评价 第 9 部分:潜在降解产物的定性和定量框架(Biological evaluation of medical devices—Part 9: Framework for identification and quantification of potential degradation products)

注: GB/T 16886.9—2022 医疗器械生物学评价 第 9 部分:潜在降解产物的定性和定量框架(ISO 10993-9:2019, IDT)

ISO 10993-12 医疗器械生物学评价 第 12 部分:样品制备与参照材料(Biological evaluation of medical devices—Part 12: Sample preparation and reference materials)

注: GB/T 16886.12—2023 医疗器械生物学评价 第 12 部分:样品制备与参照材料(ISO 10993-12:2021, IDT)

ISO 10993-13 医疗器械生物学评价 第 13 部分:聚合物医疗器械的降解产物的定性与定量(Biological evaluation of medical devices—Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices)

注: GB/T 16886.13—2017 医疗器械生物学评价 第 13 部分:聚合物降解产物的定性与定量(ISO 10993-13:2010, IDT)

ISO 10993-14 医疗器械生物学评价 第 14 部分:陶瓷降解产物的定性与定量(Biological evaluation of medical devices—Part 14: Identification and quantification of degradation products from ce-

ramics)

注: GB/T 16886.14—2003 医疗器械生物学评价 第14部分:陶瓷降解产物的定性与定量(ISO 10993-14:2001, IDT)

ISO 10993-15 医疗器械生物学评价 第15部分:金属与合金降解产物的定性与定量(Biological evaluation of medical devices—Part 15: Identification and quantification of degradation products from metals and alloys)

注: GB/T 16886.15—2022 医疗器械生物学评价 第15部分:金属与合金降解产物的定性与定量(ISO 10993-15:2019, IDT)

ISO 10993-18 医疗器械生物学评价 第18部分:风险管理过程中医疗器械材料的化学表征(Biological evaluation of medical devices—Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process)

注: GB/T 16886.18—2022 医疗器械生物学评价 第18部分:风险管理过程中医疗器械材料的化学表征(ISO 10993-18:2020, IDT)

ISO 14155 用于人体的医疗器械临床研究 良好临床规范(Clinical investigation of medical devices for human subjects—Good clinical practice)

OECD 404 急性皮肤刺激/腐蚀(Acute Dermal Irritation/Corrosion)

OECD 439 体外皮肤刺激:重建人表皮试验法(In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method)

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

ISO 和 IEC 维护的用于标准化的术语数据库,地址如下:

——IEC 电子百科: <http://www.electropedia.org/>;

——ISO 在线浏览平台: <http://www.iso.org/obp>。

#### 3.1

**空白 blank**

与样品测定溶液相同方式制备但不含待测分析物的溶液。

[来源:ISO 10136-1:1993, 3.8, 有修改]

#### 3.2

**用量 dose**

**剂量 dosage**

每单位体重或表面积试验样品(3.14)的给予量(如质量、体积)。

注:这两个术语通常会交换使用(“剂量”较为常用)。

#### 3.3

**红斑 erythema**

皮肤或黏膜发红。

#### 3.4

**焦痂 eschar**

皮肤结痂或变色的蜕皮。

#### 3.5

**浸提液 extract**

在受控条件下将某一试验或对照材料与浸提介质(3.16)接触后得到的液体或悬浮液。

## 3.6

**刺激物 irritant**

引起刺激(3.7)的物质。

## 3.7

**刺激 irritation**

一次、多次或持续与一种物质/材料接触所引起的局部非特异性炎症反应。

注：皮肤刺激是一种可逆反应，主要以皮肤局部红斑(3.3)(发红)和肿胀[水肿(3.10)]为特征。

## 3.8

**坏死 necrosis**

由于损伤或疾病造成的不可逆改变直接导致的细胞死亡。

注：组织修复会导致完全性功能恢复或瘢痕形成。

## 3.9

**阴性对照 negative control**

经充分表征的材料或物质，当用特定试验方法评估时，显示该试验系统适宜产生可重复的、适当阴性的、无反应的或最小的应答。

注：实际操作中，阴性对照(NC)包括空白(3.1)、介质(3.16)/溶剂和参照材料。

## 3.10

**水肿 oedema**

液体向组织内异常渗透引起的肿胀。

## 3.11

**阳性对照 positive control**

经充分表征的材料或物质，当用特定试验方法评估时，显示该试验系统适宜产生可重复的、适当阳性的或反应性的应答。

## 3.12

**皮肤腐蚀 skin corrosion**

应用某一试验样品(3.14)后皮肤的不可逆性损伤结果，表现为从表皮至真皮的明显坏死(3.8)。

示例：混合物/化学物/试验样品作用所导致的皮肤溃疡(见 3.15)。

## 3.13

**试验材料 test material**

取样供生物学或化学试验用的材料、器械、器械的一部分或其组件。

## 3.14

**试验样品 test sample**

用于生物学或化学试验或评价的医疗器械、组件、材料、浸提液(3.5)或其中部分。

## 3.15

**溃疡 ulceration**

表现为浅表组织缺损的开放性溃烂。

## 3.16

**介质 vehicle**

用于湿化、稀释、悬浮、浸提或溶解试验物质/材料的液体。

## 3.17

**介质对照 vehicle control**

不加试验材料(3.13)的浸提介质(3.16)，置于与试验材料相同的容器中，并经受与试验材料相同的

浸提条件。

注：介质对照(VC)的目的是评价浸提容器、浸提介质和浸提过程可能的干扰作用。

#### 4 基本原则——逐步评价法

现有检测刺激的试验方法特别设定为测定潜在的皮肤刺激和黏膜刺激作用,这些试验一般不预测其他类型的不良作用(如致敏)。历史上刺激试验是在兔身上进行的。对于植入医疗器械或外部接入医疗器械,皮内注射试验更为接近实际应用,因此用于检测刺激作用,皮内试验如 7.2 所示。

当新的体外试验作为体内试验的替代,已经过科学验证符合医疗器械的使用要求,并且可以合理且切实可行地使用的时候,根据 ISO 10993-2,应考虑优选体外试验。一项测试了两种 RhE 模型的大型对比试验结果表明,这些模型也能用于检测常用于制造医疗器械的高分子材料[聚氯乙烯(PVC)和硅树脂]中浸提出的化学刺激物。在检测一些低浓度强刺激性化合物时,本方法与人斑贴试验和兔皮内反应试验相比同样敏感。因此,应考虑在动物试验或人斑贴试验之前进行这种体外刺激试验。

注 1: 提供 RhE 模型对在测试特定医疗器械适用性的详细信息可能是相关的。

本文件描述了一种逐步评价法,其中应包括下列一项或多项内容:

- a) 化学表征,需要时按照 ISO 10993-9、ISO 10993-13、ISO 10993-14、ISO 10993-15 和 ISO 10993-18 规定的基本原则补充样品的化学试验;
- b) 文献审查,如 ISO 10993-1 所述,包括化学和物理特性的评价,以及任何产品组分以及结构相关化学品和材料的潜在刺激性信息;

注 2: 计算机模拟方法如构效关系、定量的构效关系(QSAR)、交叉参照可能指示潜在刺激活性。

- c) 采用 6.2~6.12 中经验证的 RhE 方法进行体外替代试验;

注 3: 对于与预期用于特殊部位(见附录 D),即黏膜或眼上皮的医疗器械相关的特殊刺激试验,RhE 模型不适用。若经证实可用于医疗器械,推荐探索使用其他相关细胞或组织的体外模型。

- d) 体内动物试验;

注 4: 当不能表征试验材料或不能采用在 a)、b)和 c)中规定的方法获取的信息进行风险评估时,体内动物试验是适用的。

- e) 根据 ISO 14155 和人体临床研究的伦理原则,不应在通过 a)~d)中所述的一项或多项评价确定器械的潜在刺激性之前进行临床试验。

#### 5 试验前的考虑

##### 5.1 总体要求

需要强调的是试验前的考虑是非常重要的,其能够得出无需进行刺激试验的结论。例如,若试验样品  $\text{pH} \leq 2.0$  或  $\geq 11.5$ ,此材料应被认为是刺激物,根据 OECD 404 不应进行进一步的刺激试验。

GB/T 16886.1—2022 第 5 章规定的医疗器械分类要求和下列要求是适用的。

非无菌样品应仅通过局部试验进行体内研究,因为试验样品微生物污染的可能性会干扰最终试验解释。对不能保证无菌但仍认为是无污染的试验样品,则应论证皮内应用是合理的。

##### 5.2 材料类型

###### 5.2.1 基本考虑

应考虑在医疗器械制造和装配期间可能用作加工助剂的其他化学成分,例如,润滑剂或脱模剂。除

了原材料和制造加工助剂的化学成分外,装配黏合剂/溶剂残留物以及灭菌残留物或灭菌过程所致的反应性产物可能存在于终产品中。这些成分是否产生健康危险/风险取决于终产品的可沥滤或降解性能,应考虑这些成分潜在的刺激活性。以下类型材料经常用于医疗器械并可引入刺激风险。

### 5.2.2 陶瓷、金属和合金

就化学成分的数量而言,这些材料通常不如聚合物和生物衍生材料复杂。

### 5.2.3 聚合物

这类材料化学成分通常比陶瓷、金属和合金更复杂,可能有若干反应性产物/杂质/添加剂,而且聚合反应的完全程度可能会有不同。

### 5.2.4 生物衍生材料

这类材料在其成分方面本身就很复杂,也常含有加工残留物,如交联剂和抗生素。生物材料的不同样品之间的成分可能是不一致的。

## 5.3 化学组成方面的信息

### 5.3.1 总体要求

应根据 ISO 10993-18 对医疗器械化学成分进行描述。如 ISO 10993-1 所述,所需的物理和/或化学表征程度取决于对材料配方的了解程度以及人体与医疗器械接触的性质和时间。至少,表征应涉及医疗器械的组成化学物质以及制造过程中可能残留的过程助剂或添加剂。化学成分表征所需的严格程度主要取决于接触的性质、程度、频率和持续时间以及识别的医疗器械或材料的危险。在与生物安全有关的情况下,还应获得定量数据。如果无法获得定量数据,应论证并记录其合理性。

### 5.3.2 现有的数据来源

可能的情况下应从原材料供应商处索取化学组成方面的定性与定量信息。聚合物常要求专利信息的使用权,宜签署转让和使用这种机密信息的条款。

还应从产品制造的制造链的适宜成员中(包括半成品和零件制造商)索取其他任何生产过程中的添加剂(如脱模剂)的定性信息。

在没有任何化学组成数据的情况下,建议研究文献以确定原材料和任何添加剂的可能特性,这样有助于选择相关材料最适宜的分析方法。

应按照 ISO 10993-18 进行医疗器械的化学表征。

**注:** 依据 ISO 或美国试验材料协会(ASTM)标准和/或用户的要求能规定陶瓷、金属和合金的成分,但为了获取完整的成分定性与定量资料,可能还需要要求原材料供应商或制造厂以及零件制造厂提供这些信息,以保证还能鉴别加工助剂。监管机构持有的材料主文档是另一个可访问的数据来源。

## 6 体外刺激试验

### 6.1 总则

用于测试刺激性的体外 RhE 模型是专为检测纯化学物皮肤刺激性而研发的(见 OECD 439)。此方法被调整后采用两种 RhE 模型进行验证,用于检测医疗器械浸提液中刺激性化学物质。在检测一些高分子医用材料(PVC 和硅树脂)浸提液中的低浓度强刺激性化合物时,本方法与人斑贴试验和兔皮内

反应试验相比同样敏感。因此,本文件描述的 RhE 试验能替代通过皮肤和皮内(皮肤内)接触的体内兔刺激试验。

注:提供有关正在测试的特定医疗器械的 RhE 模型适用性的详细信息可能是相关的。

## 6.2 体外重建人表皮模型

### 6.2.1 试验系统——重建人类表皮模型

RhE 模型应含有正常人源表皮角质形成细胞,这种细胞经培养可形成多层高度分化的人表皮模型。它应包括具有组织构造的基底层、棘层、颗粒层及与体内类似的包含细胞间层状脂质层的多层角质层。从健康志愿者获取的正常人角质形成细胞应在薄膜或滤纸上的气液交界面培养数日,以形成包括主基底层、基底上层、棘层和颗粒层以及有功能的角质层在内的三维表皮模型。此模型系统应允许极性(如生理盐水)和非极性(如芝麻油)浸提液直接加至 RhE 模型的上表面。

不适合浸提的材料(如液体、凝胶、糊剂和颗粒)可能适用于此试验系统。如果使用,宜在测试前提供验证数据,以证明该方法检测这些材料形式的刺激活性的能力。

### 6.2.2 试验原则

终点:细胞活性的测定基于 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)的细胞还原反应及后续紫色甲臞盐的转化,之后再从组织中萃取出来后进行定量测定。处理组织的细胞活性以阴性介质对照的百分比表示。以活性百分比的减少预测刺激的可能性。

注 1:组织存活的减少可能伴随 IL-1 $\alpha$  的释放。能收集接触组织培养基 $\leq -20$  °C 冰冻保存用于可能的细胞因子分析。

简要步骤:对专门制作的含有低浓度刺激化学物的聚合物生物材料进行的研究表明,与 OECD 439 纯化学物方案相比需延长接触时间。在 37 °C 接触生物材料浸提液中潜在的低浓度刺激物培养不少于 18 h~24 h 的时间,足以通过组织活性降低 50% 以上预测体外刺激性。在采用医疗器械浸提液进行的评估 RhE 模型的比对试验中,18 h 和 24 h 接触得到了相似的结果。

加入试验和对照浸提液后的组织在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的湿化培养箱培养。

通过杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)或不含 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 的 PBS 冲洗以终止试验样品浸提液的接触。冲洗后将 RhE 组织表面吸干。将组织与 MTT 溶液在 24 孔板中(1 mg/mL, 300  $\mu$ L/孔)培养 3 h 后评估活性。室温条件下采用适量(取决于采用的 RhE 模型)异丙醇萃取甲臞结晶至少 2 h。从每块 RhE 组织萃取的甲臞中取 2 份或 3 份(根据说明书)加入 96 孔板(200  $\mu$ L/孔)后测定 570 nm 处的吸光度。

对直接接触试验,分别用体积分数 1% 的溶于 0.9% 氯化钠注射液的十二烷基硫酸钠(SDS,见 6.4.4)溶液作阳性对照(PCs),DPBS 或不含 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 的 PBS 处理的表皮作阴性对照。对于浸提液试验,添加经验证为刺激物质的对照在芝麻油和 0.9% 氯化钠注射液浸提后能用作阳性对照。

注 2:收集 18 h 或 24 h 接触后的组织培养基能冰冻保存(至少 $-20$  °C)以备作为细胞活性补充测定终点的细胞因子(IL-1 $\alpha$ )测定。除细胞活性 MTT 试验间接确定的细胞损伤成分,IL-1 $\alpha$  测定确定皮肤刺激评估中的炎症成分。

介质对照应包括已进行了 ISO 10993-12 医疗器械浸提程序的生理盐水(NaCl, 0.9%)溶液和芝麻油。每一处理组织的活性以阴性 DPBS 或 PBS 处理的对照组织的百分比表示(均值)。

本方法的已知局限性:不适用于气体或气溶胶,也不适用于评价固体材料直接接触的刺激性,因为不能保证整个试验表面紧密接触。

已知需要特殊对照的试验化合物的情况:某些化学物能直接还原 MTT 试剂(如亲电子试剂、高 pH 试验样品),还有化学物能直接将组织或细胞染色。只有在接触过程结束时组织上仍有足量的化学物质

时,这些试验样品特性才能产生干扰。在这些情况下,宜应用特殊程序以定量 MTT“真正”的还原。参考文献[23]和[24]给出了测试可能与 MTT 相互作用的方案。使用特殊或适合的对照,在减去因直接化学性 MTT 还原和/或组织中浸提出的化学物残留颜色导致的非特异性光密度(OD)值后,能计算出真正的组织活性。

### 6.2.3 预测模型

此预测模型是基于 OECD 439 预测模型和在优化医疗器械方案过程中进一步获得的数据。

如果接触后细胞活性 $\leq 50\%$ :试验样品为刺激物(I)。

如果接触后细胞活性 $> 50\%$ :试验样品为非刺激物(NI)。

应对极性(如生理盐水)及非极性(如芝麻油)试验浸提液进行细胞活性试验。如果至少一种浸提液显示出阳性结果(活性 $\leq 50\%$ ),那么认为此医疗器械样品有潜在的刺激性,然后应考虑该器械或器械组件会引起刺激反应。必要时,可考虑进行体内试验进一步评价刺激反应的类型。若两种浸提液结果均为非刺激物(活性 $> 50\%$ ),应认为器械或器械组件为非刺激物。

## 6.3 材料

### 6.3.1 重建人类表皮模型——产品说明

表皮细胞取自 HIV1、2 抗体、丙型肝炎抗体、乙肝抗原均阴性的健康志愿者。尽管如此,宜按照生物材料的常规处理程序。

对基于医疗器械浸提液的试验样品,在一项大型国际比对试验中评价了 OECD 439 中描述和验证的两种 RhE 模型的应用。在这个试验中使用了 EpiDerm™ 组织 EPI-200<sup>1)</sup> 模型和 SkinEthic™ RhE 模型<sup>2)</sup>。已制定这些模型的具体方案作为补充材料。

这两个模型均已被欧洲替代方法验证中心(ECVAM)验证用于测定化学物皮肤刺激并被 OECD 439 和欧盟(EU)导则 B.46 收录。出于分类和标识的目的,这些模型已用纯工业化学物进行了验证。如果经过医疗器械浸提液皮肤和组织刺激试验验证,OECD 439 中描述和验证的其他模型也能用于医疗器械体外皮肤刺激试验。

一个新的用于体外皮肤刺激性试验的 RhE 模型若要列入 OECD 439,应证明其预测能力和实验室内及实验室间变异性与最初的比对试验有等同的表现。需对一组与最初比对试验相同的刺激及非刺激材料进行实验室间(至少 3 个实验室)的 3 轮(3 个生产批号的 RhE 模型)盲法试验。

### 6.3.2 医疗器械浸提液制备

应按照 ISO 10993-12 制备医疗器械和/或生物材料浸提液。

——极性浸提液应在 0.9%生理盐水中制备(900 mg 加入 100 mL 超纯水或去离子水)。

——非极性浸提液应在芝麻油中制备(可接受的质量实例:超精炼和医药级)。

注 1: 在比对试验中证明 0.9%氯化钠注射液和芝麻油是用于体外 RhE 刺激试验的 PVC 和/或硅树脂聚合物中的

- 1) EpiDerm™是由 MatTek 体外生命科学实验室(布拉迪斯拉发,斯洛伐克)和 MatTek 公司(阿什兰,马里兰州,美国)提供的产品的商标。给出这一信息是为了方便本文件的使用者,并不代表对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,那么可以使用这些等效产品。
- 2) SkinEthic™ RHE 是由 EpiSkin SA(里昂,法国)、EpiSkin Brazil(里约热内卢,巴西)和 Shanghai EpiSkin Biotechnology(上海,中国)共同提供的产品的商标。给出这一信息是为了方便本文件的使用者,并不代表对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果,那么可以使用这些等效产品。

刺激物的适宜浸提剂。因此,推荐以上浸提介质。

若使用其他浸提介质进行浸提,应提供验证数据,以确认浸提介质的变化不会影响试验系统区分阴性、弱、中、强刺激物的能力。

宜基于 ISO 10993-12 论证浸提时间和温度。

注 2: 在评价 RhE 用于医疗器械试验液刺激试验的比对试验中,使用了加标(spiked)聚合物(PVC 和硅树脂),在  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  振荡/振摇  $(72\pm 2)\text{h}$  进行的浸提。

不适合浸提的材料(如液体、凝胶、糊剂和颗粒)可能适用于此试验系统。如果使用,宜在测试前提供验证数据,以证明该方法检测这些材料形式的刺激活性的能力。

## 6.4 方法

### 6.4.1 总则

**警告——**本文件描述的操作步骤要求使用危险试剂。本文件不声称涵盖所有相关的安全问题。本文件的使用者有责任采取适当的预防和职业健康与安全措施,并确保遵守法规和法规要求。

MTT 具有以下危险:

- H302: 吞咽有害;
- H315: 引起皮肤刺激;
- H319: 引起严重眼刺激;
- H330: 吸入致命;
- H335: 可引起呼吸道刺激;
- H341: 怀疑会导致遗传性缺陷(说明接触途径——如已确证无其他接触途径造成这一危险)。

异丙醇具有以下危险:

- H225: 高度易燃液体和蒸气;
- H319: 引起严重眼刺激;
- H336: 可引起昏睡或眩晕。

### 6.4.2 试验步骤

附录 B 提供了使用重建人类表皮(RhE)模型进行体外刺激试验的清单。

应记录 RhE 刺激试验过程中所有操作。附录 C 提供了方法记录单(MDS)举例。以下是进行体外皮肤刺激试验的不同步骤的描述。应遵循以下步骤,对任何偏差进行验证并提供验证数据。

- RhE 组织到达前开始制备器械/生物材料试验样品的极性(生理盐水)和非极性(芝麻油)浸提液。浸提开始时间宜基于按照 ISO 10993-12 选择的浸提时间和组织准备好进行处理的时间(取决于 RhE 组织到达和必需的预培养时间)。试验材料/医疗器械浸提液宜在 ISO 10993-12 允许的时间范围内使用,以便将浸提液用于生物相容性试验。浸提过程中持续振荡/振摇。
- 收到 RhE 组织后,即将 RhE 组织从运输板培养基转移至组织制造商要求使用的培养基中。如果组织制造商的说明中有要求,将组织放入大小合适的培养板中用培养基预培养(见 6.5.2)。
- 如果不包括阳性对照材料的浸提,在试验当天将阳性对照(SDS)按规定的浓度注入极性(生理盐水)溶剂中。在证明适宜性和阳性结果后,能使用较低浓度的 SDS(如 0.25%~0.5%)作为阳性对照。
- 在组织表面分别加上 100  $\mu\text{L}$  阴性对照、阳性对照、介质对照和试验样品。
- 在  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 、 $(5\pm 1)\%$   $\text{CO}_2$  的湿化培养箱中培养  $(18\pm 1)\text{h}$  或  $(24\pm 2)\text{h}$ 。

注：比对试验中 EpiDerm™ 组织(EPI-200)培养时间是 18 h, SkinEthic™ RhE 模型是 24 h。接触 18 h 或 24 h 两种模型显示了相似的试验结果。

- 通过 DPBS 或不含  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 PBS 冲洗以终止接触。冲洗后按照组织制造商说明除去组织多余水分。
- 转移组织至 MTT 溶液(可选择:采集培养基以备白介素释放测定,  $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存样本)。
- 在 MTT 中培养组织  $3\text{ h} \pm 5\text{ min}$  [ $(37 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $(5 \pm 1)\%$   $\text{CO}_2$ , 湿化培养箱中]。
- 转移并浸入甲胍萃取介质异丙醇中。
- 甲胍萃取:室温至少 2 h 或过夜(密封, 室温)。
- 振摇并混匀。
- 转移甲胍溶液至 96 孔板。
- 平板分光光度计读取 OD 值。

### 6.4.3 培养基和终点溶液

#### 6.4.3.1 MTT 溶液

MTT 溶液对光敏感。使用锡箔纸或适宜材料避光保护。

用 PBS 溶解 MTT 粉末至终浓度  $5\text{ mg/mL}$ 。  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  滤膜过滤。在无菌深色  $1.5\text{ mL}$  微量管中制备即用型溶液(如  $1\text{ mL}$  等分试样)。  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存试剂。保存时间:  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下 1 年。

或者,也能使用 RhE 组织制造商制备的 MTT 溶液。

使用预热的培养基稀释 MTT 储备液至终浓度  $1\text{ mg/mL}$ 。使用前避光保存(使用前储存时间不超过 2 h)。

#### 6.4.3.2 异丙醇溶液

使用未稀释的 2-丙醇原液(CAS 号:67-63-0)。

### 6.4.4 试验样品和对照制备

记录对照或试验浸提液的主要信息,包括代码或数字、物理特性(如黏稠度)、体积或质量、失效日期和储存条件。记录制备及方法细节。附录 C 提供了制备记录举例。

阴性对照的具体步骤(DPBS 或 PBS):阴性对照为 DPBS 或不含  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 PBS。应使用无菌即用型 DPBS 或 PBS。若 DPBS 或 PBS 由 10 倍浓度或粉末制备需将 pH 调至 7.0 并将溶液灭菌。应将  $3 \times 100\text{ }\mu\text{L}$  体积分别加入 3 块单独的 RhE 组织。

阳性对照的具体步骤(1% 体积分数 SDS):应将  $500\text{ }\mu\text{L}$  20% SDS 水溶液与  $9.5\text{ mL}$  特定浸提介质(生理盐水)彻底混匀。制备后,用适合的加样器将  $100\text{ }\mu\text{L}$  转移并加至 RhE 组织上。在证明适宜性和阳性结果后,可使用较低浓度的 SDS(如 0.25%~0.5%)作为阳性对照。

应在试验当天每次使用前新鲜制备极性浸提介质的阳性对照。

应使用商品化的 20% SDS 溶液。

介质对照的具体步骤:应将介质对照(0.9% 生理盐水和芝麻油)置于浸提容器(如琥珀色玻璃瓶)并进行如在  $(37 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $(72 \pm 2)\text{ h}$  中与试验材料完全相同的浸提程序。如果直接将样品接触组织,这一步能省略。

阳性对照材料是很少的。日本食物及药物安全中心的 Hatano 研究所提供的 Y-4 聚合物或其他已证实的适合的供应商提供的对照(若经验证)能用于体外 RhE 模型试验。若经验证,硅树脂-SDS 能用作生理盐水浸提液的阳性对照。

## 6.5 试验的注意事项

### 6.5.1 重建人表皮组织的接收

应记录试剂盒详细信息及测试过程(如记录于 MDS)。

### 6.5.2 准备及预培养

按以下步骤进行。

——如果 RhE 组织制造商的说明中有要求,将组织放入大小合适的培养板中用组织制造商要求的培养基预培养。

——根据 RhE 组织制造商的说明将合适数量的培养孔加入适量的新鲜培养基备用。

——无菌条件下,打开盛有 RhE 组织的培养板的盖子。无菌气流下拿开盖子并小心(用无菌镊子)拿出每个盛有 RhE 组织的小室。在无菌滤纸或纱布上轻轻吸去所有黏附在小室外侧缘残留琼脂,然后将组织置于无菌的盛有新鲜培养基的孔中。

——肉眼检查确认无琼脂残留,转移组织至新鲜培养基,倾斜小室避免底部气泡形成。

注:用于运输的 24 孔板能在室温密封保存/储存,以便在 1 周后观察有无可能的污染迹象。

——检查 RhE 组织质量并记录组织变化。

——根据制造商的使用说明将盛有 RhE 组织的小室转移至预先加有培养基的培养板中。根据制造商使用要求预培养[(37±1)℃、(5±1)% CO<sub>2</sub> 的湿化培养箱中]组织备用。

## 6.6 加样和冲洗

### 6.6.1 总则

虽然使用所有模型进行的体外皮肤刺激试验都遵循相同的原则,但宜注意在进行试验时,具体模型间可能存在小的差异。

如果标准操作程序(SOP)适用于特定 RhE 模型,宜遵从制造商 SOP,并考虑本文件中的医疗器械浸提液试验中特殊方面(如接触时间)。在使用 OECD 439 引用的某一 RhE 模型进行医疗器械浸提液和/或医疗器械进行试验之前,应证明此特定模型的适用性。当用于医疗器械系统时,这些商业的或优化的使用说明宜产生与本文件中包含的已验证方法等效的结果。

### 6.6.2 准备

按以下步骤进行。

——室温预热维持培养基。

——加样前约 5 min 从培养箱中拿出预培养的培养板。

——加样前准备。

- 准备合适大小的培养板用于 RhE 模型与试验样品和对照一起培养。
- 用试验材料代码标记培养板盖子;每个样品和对照 3 块组织/孔。
- 更换小室下的培养基(加入适量的培养基)或将小室移入含新鲜培养基的新板中。

### 6.6.3 试验浸提液及对照的接触

按以下步骤进行。

——吸取(100±2)μL(即 200 μL/cm<sup>2</sup>)未稀释的样品试验液(即医疗器械浸提液)、VCs、NCs 或 PCs 置于各自 3 个单独组织的表面。用移液器吸头轻轻地将样品试验液铺在 RhE 组织表面。

因冲洗顺序要与加样顺序相同,所以加样顺序非常重要。

注 1: 模型表面是疏水的,所以确保 100  $\mu\text{L}$  均匀涂布在 RhE 组织的整个表面。由于表面张力机制,有时极性溶剂微滴只能分布至 RhE 组织的外缘。这种情况下,能使用移液器吸头铺开样品或使用镊子敲击小室使样品覆盖整个 RhE 组织的表面。另外,对于油性浸提液,能使用头端球状的玻璃移液器(Pasteur)铺开试验样品以保证其与整个 RhE 组织的表面的正确接触。

——加样后的组织放在层流净化罩内,直至最后一块组织加样完成。

——所有组织加样完成后,转移所有培养板至湿化培养箱 $[(37\pm 1)^\circ\text{C}、(5\pm 1)\% \text{CO}_2]$ 培养至所需时间。

注 2: 比对试验中 EpiDerm™ 组织(EPI-200)培养时间是 $(18\pm 1)\text{h}$ ,SkinEthic™ RhE 模型是 $(24\pm 2)\text{h}$ 。

——接触完成后,使用灭菌 DPBS 或 PBS 彻底冲洗组织,加满再清空小室数次以去除残留试验材料。推荐冲洗 15 次~25 次。若 RhE 模型制造商提供具体说明则遵照执行。冲洗不宜太轻柔,否则试验样品不能完全清除。

——冲洗后,反扣小室轻轻振动去掉残留 DPBS 或 PBS,在无菌吸水纸上反扣小室排干水分。

——将组织表面吸干(如使用双头棉签)。

——转移小室至适宜容器或预先加有新鲜测试培养基的(0.3 mL/孔)组织培养板中,直至冲洗完所有组织。准备进行 MTT 培养。

若发现试验样品仍有残存在 RhE 组织表面的迹象,试着使用无菌湿棉棒去除。记录该过程。可在解剖镜下肉眼评价组织表面。

注 3: 评价 RhE 组织活性前能收集小室下培养基进行额外的细胞因子测定。存活组织的减少会伴随 IL-1 $\alpha$  的释放。

## 6.7 用于测定接触阶段后 RhE 组织活性的 MTT 试验

### 6.7.1 MTT 培养和异丙醇萃取

通过 MTT 还原测定法评估 RhE 组织活性。接触结束后立即进行 MTT 测试。冲洗组织去除残留试验样品。

应在开始冲洗步骤前准备 MTT 溶液并提前加入 24 孔培养板中(300  $\mu\text{L}$ /孔)。

——准备 MTT 培养基和加有测试培养基的 24 孔板或其他合适的培养板。将 300  $\mu\text{L}$  MTT 培养基(浓度为 1 mg/mL)加入所需数量的 24 孔板的各孔中。

——从临时存储板中移出小室,按在无菌吸水纸或使用无菌棉签弄干小室底部,然后转移至预先加入 300  $\mu\text{L}$  MTT 的 24 孔板中。将培养板放入培养箱 $[(37\pm 1)^\circ\text{C}、(5\pm 1)\% \text{CO}_2]$ 的湿化培养箱中,在记录单(如在 MDS 中)上记录 MTT 培养开始时间,培养 3 h $\pm$ 5 min。

——MTT 培养完成后,吸干小室中所有残留 MTT 溶液,根据 RhE 供应商说明书转移组织至合适的盛有适量异丙醇的组织培养板中。

——密封容器或平板,或置于密封塑料袋中防止蒸发。记录萃取开始时间(如在 MDS 中),用平板振荡器以约 120 r/min 的速率室温轻轻振荡萃取甲胂至少 2 h。也可选择过夜萃取(18 h~24 h)。上述密封平板不振荡条件下室温或冰箱内避光萃取。分析萃取液前,在平板振荡器振荡至少 15 min。

——培养后,使用枪头或 20 G 注射针刺破组织和膜以得到相应孔中的所有萃取液。得到溶有甲胂的溶液测吸光度。转移萃取液至 96 孔板前用加样器至少上下吹打 3 次至溶液均匀。

### 6.7.2 吸光度测量

按照以下步骤进行。

——根据 RhE 供应商说明书,从每个试验孔中转移 2 份或 3 份 200  $\mu\text{L}$  液体至平底 96 孔微量平板中(适当标记)。每次测定都应使用一块 96 孔板。

注 1: 小心避免 96 孔板中异丙醇蒸发。附录 C 平板示意图中 VC1 和 VC2 一般是 0.9% 生理盐水和芝麻油对照。在体外 RhE 试验 OD 值测定中使用异丙醇背景对照。

——根据制造商说明书,使用波长滤光片在 96 孔板分光光度计中读取 OD 值,以异丙醇溶液为背景对照。通常使用 570 nm 或 630 nm 滤光片。

注 2: 在没有参考滤光片的情况下进行 570 nm 的读数,因为 MTT 测试中经常使用的“经典”参考滤光片(630 nm)仍在甲肟的吸收曲线内。因滤光片存在容差,使用它们能导致 OD 信号的动态范围减小。

## 6.8 试验接受准则

阴性对照和介质对照接受准则:如果 3 块 RhE 组织在 570 nm 的平均 OD 值满足  $\geq 0.7$  且  $< 3.0$ , NC 和 VC 数据通常符合接受准则。这些值是不同 RhE 模型的最大和最小 OD 值,它们的不同取决于 RhE 供应商的说明书(见 OECD 439)。OD 值应符合 OECD 439 中指定的各个模型的接受准则。如果 NC 或 VC 培养后的 3 块 RhE 组织的平均活性标准差  $\leq 20\%$ , OD 值就是有效的。VC 的组织平均活性应为 NC 的 80%~120% 范围内。

阳性对照接受准则:如果平均活性(以 NC 的 % 表示)  $< 40\%$ , 平行 RhE 组织活性的标准差  $\leq 20\%$ , 则 PC 数据符合可接受准则。

注: 如果用 Y-4 作为阳性对照材料,根据医疗器械浸提液比对试验研究论文,能用  $< 50\%$  的细胞活性代替  $< 40\%$ 。

试验接受准则:如果阴性对照、介质对照和阳性对照数据均符合以上准则要求,则认为试验中所有试验样品数据有效。

试验样品数据接受准则:如果试验样品培养后 RhE 组织的平均活性标准差  $\leq 20\%$ , 则认为数据有效。若不符合此要求则应重复试验。

## 6.9 数据计算步骤

### 6.9.1 总则

以下计算步骤适用于大多数下述特点的试验样品:与 MTT 试剂无相互作用(见 6.2.2)、无色、对组织染色能力低、测定的非特异性色值  $\leq$  NC 的 5%。

### 6.9.2 RhE 试验中 OD 测定的异丙醇背景对照

计算每板 6 个异丙醇复孔的平均 OD 值。

计算各 RhE 组织 OD 值间的标准差。

### 6.9.3 DPBS 或 PBS 处理的阴性对照

将 DPBS 或 PBS 处理的阴性对照的 OD 值减去异丙醇背景的平均 OD, 计算异丙醇背景校正值。

计算每块 RhE 组织平均 OD 值(3 个重复)。

所有 RhE 组织的平均 OD 值相当于 100% 活性。

计算各 RhE 组织间 OD 值及活性的标准差。

### 6.9.4 阳性对照

按照以下步骤进行。

——将阳性对照的 OD 值减去异丙醇背景的平均 OD, 计算异丙醇背景校正值。

- 计算每块 RhE 组织平均 OD 值(3 个重复)。
- 用 PC 各 RhE 组织的平均 OD 值除以 NC 各 RhE 组织的平均 OD,再乘以 100,计算每块 RhE 组织活性。
- 计算各 RhE 组织间 OD 值及活性的标准差。

#### 6.9.5 试验浸提液和 VC 样品(TTs)

按照以下步骤进行。

- 将试验浸提液的 OD 值减去异丙醇背景的平均 OD,计算异丙醇背景校正值。
- 计算每块 RhE 组织平均 OD 值(3 个重复)。
- 用 TT 各 RhE 组织的平均 OD 值除以 NC 各 RhE 组织的平均 OD,再乘以 100,计算每块 RhE 组织活性。
- 计算所有 RhE 组织平均活性。
- 计算各 RhE 组织间 OD 值及活性的标准差。

计算每块处理表皮相对于阴性对照平均值的活性百分比。也应计算出变异系数(CVs)。根据预测模型用 3 块 RhE 组织的平均相对活性进行分级。

#### 6.10 数据解释-预测模型

根据接触于样品组织的平均组织活性预测试验样品潜在刺激性。计算 3 块组织的平均活性。若平均相对活性 $\leq$ 阴性对照的 50%,则预测出现刺激反应。

对采用极性(如生理盐水)和非极性(如芝麻油)溶剂浸提的医疗器械或医疗器械组件,若至少一种浸提液显示对组织的阳性作用(活性 $\leq$ 50%且标准差 $<$ 20%)则应认为此试验器械或器械组件有刺激性(见表 1)。如果两种溶剂的结果均是非刺激物(活性 $>$ 50%),则应认为此器械或器械组件为非刺激物。

表 1 试验样品分级

体外解释准则	分级
至少一种浸提介质中平均组织活性 $\leq$ 50%	刺激性(I)
两种浸提介质中平均组织活性均 $>$ 50%	非刺激性(NI)

注:对于纯化学物,用于检测刺激活性的体外 RhE 模型可检测的联合国《全球化学品统一分类和标签制度》(UN GHS)分类为类别 2(刺激物)和类别 1(皮肤腐蚀)的刺激物,如 OECD 439 和 OECD 431 中所示。另外,当组织活性高于 50%时能识别 UN GHS 未分类的“低危险”非刺激化学物。关于表 3(体内刺激反应),RhE 模型将反应类别确定为“极轻微”和“重度”反应分类。

#### 6.11 方法记录单

附录 C 提供了一个符合质量控制的数据管理 MDS 示例(即正确的安装、校准、设备功能和制备质量)。对每批次表皮和试验,对必要的 MDS 进行硬拷贝,随试验填好日期,填写表格中要求的信息并在 MDS 签名。

试验报告应至少包括以下信息:

- 试验材料或器械的描述;
- 试验样品制备方法的详细描述;
- 使用的 RhE 模型的描述;

- 使用批次 RhE 模型的质控证书复制件(RhE 模型制造商提供)；
- 试验方案的描述,包括加样方法和接触时间；
- RhE 组织观察记录；
- 关于组织活性测定的所有原始数据(如每孔的 OD 值)；
- 结果评估及试验样品或器械分级；
- 使用的标准(包括出版年份)；
- 与试验方案的任何偏离；
- 观察到的任何异常表现；
- 试验日期。

## 7 体内刺激试验

### 7.1 总则

可使用器械、器械组件、生物材料本身或其浸提液或以上全部对医疗器械、医疗器械组件或生物材料或以上全部进行刺激试验。

影响体内刺激研究结果的因素包括：

- 贴敷试验中使用的器械的性质；
- 试验材料的剂量；
- 试验材料的应用方法；
- 封闭程度；
- 应用位点；
- 接触时间和次数；
- 用于评价试验的技术。

其他背景资料见附录 F。

虽然遵循既定方案前提下的灵活性可使研究者提高试验的敏感性以适应使用和人群接触条件,但程序的一致性有助于使不同材料和不同实验室的试验结果具有可比性。

试验程序中已经包含了对重复和/或持久接触的器械和材料进行评价的规定。研究设计应严于临床预期接触(无论是时间或浓度,或两者)情况。在解释结果时应记住这一点。

如果试验样品的  $\text{pH} \leq 2.0$  或  $\geq 11.5$ ,此材料应被认为是刺激物,不应进行进一步试验(见 OECD 404)。然而,试验证据表明,试验材料的酸碱度并不是与材料产生严重损伤能力有关的唯一考虑因素。试验材料的浓度、接触周期以及很多其他物理和化学性质也很重要。

在特殊情况下,如果需要进一步的风险表征/评估,可能有必要对刺激物或 pH 超出上述范围的材料进行试验。这些情况应被论证并记录。

### 7.2 皮肤接触的动物刺激试验

#### 7.2.1 原则

采用适宜动物模型评估待测材料产生皮肤刺激反应的可能性。

兔(*Oryctolagus cuniculus*)为本试验首选实验动物。

#### 7.2.2 试验材料

固体或液体试验材料应按附录 A 规定进行制备。

应证明试验的敏感性,能通过试验中设置一组阳性对照来加以证实。然而,采用阳性对照来证实敏感性仅限于实验室在之前的6个月内应用该试验方法未产生阳性结果的情况。

注:适宜的阳性对照是SDS,也称为月桂基硫酸钠(SLS)。

### 7.2.3 动物与管理

应使用3只健康、初成年的白化兔,雌雄不限,同一品系,体重不低于2 kg。由于预期雄性和雌性动物的皮肤刺激不会不同,因此能使用单一性别。使用雌性动物时,应未育、未孕。如预期有刺激反应,初试应考虑使用1只动物。除非出现明确的阳性反应[红斑或水肿记分大于2(见表2)],否则应至少再使用2只动物进行试验。在使用了至少3只动物后,如为疑似反应,应考虑进行复试。

应使动物适应环境,并按ISO 10993-2的规定饲养。

### 7.2.4 试验步骤

#### 7.2.4.1 动物准备

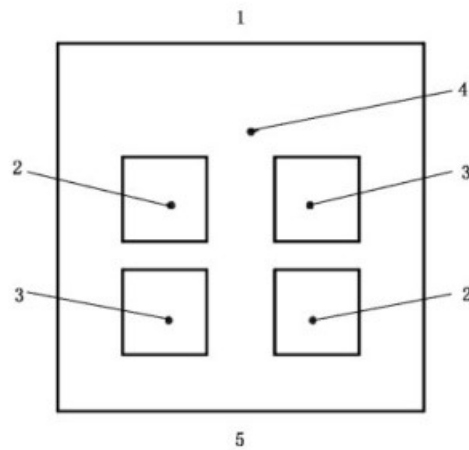
动物的皮肤状况是试验的关键因素,只能使用皮肤健康无损伤的动物。一般在试验前4 h~24 h内在动物背部除去被毛。宜在脊柱两侧足够的距离除去背毛,以便试验和观察所有试验部位(约10 cm×15 cm)。为了便于观察和/或再次试验,可能需反复除毛。如果试验机构确认了脱毛剂不会引起刺激反应和其使用过程,则能由专业人员使用脱毛剂除毛。如需反复接触,则按照7.2.4.2.1、7.2.4.2.2或7.2.4.2.3步骤进行,时间最长为21 d。

#### 7.2.4.2 试验样品的应用

##### 7.2.4.2.1 粉剂或液体样品的应用

将500 mg或500 μL的试验材料直接置于图1所示的每个皮肤部位。固体和疏水性材料无需湿化处理,粉剂使用前宜用水或其他适宜的介质稍加湿化(见附录A)。两个观察点应分别用试验和对照样品处理(见图1)。

用2.5 cm×2.5 cm非封闭式的敷料(如吸水性纱布块)覆盖接触部位,然后用绷带(半封闭性或封闭性)固定敷贴片至少4 h。接触期结束后取下敷贴片并使用被认为不会刺激皮肤的持久性记号笔对接触部位进行标记。用适当的方法除去残留试验材料,如用温水或其他适宜的无刺激性溶剂清洗并小心拭干。



标引序号说明：

- 1——头部；
- 2——试验部位；
- 3——对照部位；
- 4——去毛的背部区域；
- 5——尾部。

图 1 皮肤应用部位

#### 7.2.4.2.2 浸提液和浸提介质的应用

将相应的浸提液滴至 2.5 cm×2.5 cm 大小的吸水性纱布块上，浸提液的用量以能浸透纱布块为宜，一般每块纱布滴 500 μL，按图 1 所示部位敷贴于动物背部两侧。按图 1 所示将滴有浸提介质的纱布块敷贴在对照接触部位。

用绷带(半封闭性或封闭性)覆盖敷贴部位至少 4 h。接触期结束后取下敷贴片，用非皮肤刺激性持久性记号笔对接触部位进行标记，并用适当的方法除去残留试验材料，如用温水或其他适宜的无刺激性溶剂清洗并小心拭干。

#### 7.2.4.2.3 固体样品的应用

按图 1 所示，将试验材料样品直接接触兔脊柱两侧的皮肤。对照样品同法应用。检测固体物时(必要时可研成粉末)，应使用水或必要时选择一种替代溶剂将试验材料充分湿化，以保证与皮肤良好的接触性(见附录 A)。如使用溶剂，应考虑溶剂对试验材料所致皮肤刺激反应的影响。

用 2.5 cm×2.5 cm 的非封闭性敷料(如纱布块)覆盖材料接触部位，然后用绷带(半封闭性或封闭性)固定敷贴片至少 4 h。接触期结束后取下敷贴片，并使用被认为不会产生皮肤刺激的持久性记号笔对接触部位进行标记。用适当的方法除去残留试验材料，如用温水或其他适宜的无刺激性溶剂清洗并小心拭干。

### 7.2.5 动物观察

#### 7.2.5.1 总则

特别推荐在自然光线或全光谱灯光下观察皮肤反应。按表 2 给出的记分系统描述每一接触部位在每一规定时间内皮肤红斑和水肿反应情况并评分，记录结果以出具试验报告。

注：在某些情况下，采用组织学或无创性技术可能有助于对皮肤反应的评价。

### 7.2.5.2 单次接触试验

单次接触试验时,分别在除去敷贴片后 $(1\pm 0.1)\text{h}$ 、 $(24\pm 2)\text{h}$ 、 $(48\pm 2)\text{h}$ 和 $(72\pm 2)\text{h}$ 记录各接触部位的情况。如存在持久性损伤,可能有必要延长观察时间,以评价这种损伤在不超过14 d的时间内的可逆性或不可逆性。在延长的观察期内,应每天至少观察动物一次。

### 7.2.5.3 重复接触试验

重复接触试验应仅在急性单次接触试验完成后进行[至少在观察 $(72\pm 2)\text{h}$ 后]。重复接触试验应根据器械临床使用设计。

在单次接触试验轻微反应后进行重复接触应对其进行论证。

重复接触试验时,每次在除去敷贴片后 $(1\pm 0.1)\text{h}$ 以及再次接触前立即记录接触部位的情况。接触次数能不同。

末次接触后,分别在除去敷贴片后 $(1\pm 0.1)\text{h}$ 、 $(24\pm 2)\text{h}$ 、 $(48\pm 2)\text{h}$ 和 $(72\pm 2)\text{h}$ 记录各接触部位的情况。如有持久性损伤,可能有必要延长观察时间,以评价这种损伤在不超过14 d的时间内的可逆性或不可逆性。在延长的观察期内,应每天至少观察动物一次。

### 7.2.6 结果评价

接触后各时间点反应情况评分如表2所示。

表2 皮肤反应记分系统

反应	记分
红斑和焦痂形成	
无红斑	0
极轻微红斑(勉强可见)	1
清晰红斑	2
中度红斑	3
重度红斑(紫红色)至无法进行红斑分级的焦痂形成	4
水肿形成	
无水肿	0
极轻微水肿(勉强可见)	1
清晰水肿(肿起边缘清晰)	2
中度水肿(肿起约1 mm)	3
重度水肿(肿起超过1 mm,并超出接触区)	4
刺激最高记分	8
应记录并报告批复部位的其他异常情况	

单次接触试验按下列规定确定原发性刺激指数(PII)。

仅使用 $(24\pm 2)\text{h}$ 、 $(48\pm 2)\text{h}$ 和 $(72\pm 2)\text{h}$ 的观察数据进行计算。试验之前或72 h后的恢复观察数

据不用于计算。

在 72 h 评分后,分别将每只动物试验样品和空白对照在 $(24\pm 2)$ h、 $(48\pm 2)$ h 和 $(72\pm 2)$ h 引起的全部红斑和水肿记分相加,再将所有记分之之和除以 6(2 个试验/观察部位,3 个时间点)计算出某一动物的原发刺激记分。

为获得试验样品的原发性刺激记分,将每只动物全部原发性刺激记分相加后再除以动物总数(一般为 3)。

当采用空白或阴性对照时,计算出对照原发性刺激记分,将试验材料原发性刺激记分减去该记分,即得出原发性刺激指数。

对重复接触试验,应按照上述方法计算每只动物原发性刺激记分,考虑全部评价终点。按下列规定计算累积刺激指数。

将全部动物刺激记分相加后再除以动物总数,该值即为累积刺激指数。

将累积刺激指数对照表 3 给出的刺激反应,报告相应的反应类型。

注:刺激的类型是基于将兔子对化学物质的主要刺激指数与人类对许多化学物质的主要刺激反应进行比较的数据,这些化学物质已经在这两个物种上进行了测试。

记录每只动物的任何反应,包括表 2 中给出的最大原发性刺激记分、反应发生时间和最长反应时间。

表 3 用数字(记分)和文字(反应类型)给出了原发性或累积刺激指数。如果用了不同的浸提液进行试验,以其给出的最高 PII 来确定反应类型。

表 3 兔原发性或累计刺激指数类型

平均记分	反应类型
0~0.4	极轻微
0.5~1.9	轻度
2~4.9	中度
5~8	重度

### 7.2.7 试验报告

试验报告应包括:

- 试验材料或器械的描述;
- 试验材料或器械的预期用途/应用;
- 制备试验样品或试验材料所用方法的详细描述;
- 实验动物的描述;
- 试验部位接触方法和绷带材料类型(半封闭或封闭式);
- 试验部位标记方式和读数;
- 观察记录;
- 重复接触时的接触次数和接触周期;
- 结果评价;
- 使用的标准(包括其出版年份);
- 任何对试验方案的偏离;
- 观察到的任何异常表现;

——试验日期。

### 7.3 皮内(皮肤内)途径的动物刺激试验

#### 7.3.1 概述

对于接触破损或受损表面、外部接入或作为植入物使用的医疗器械,需使用皮内(皮肤内)反应性试验。在皮内注射该材料的浸提液后,评估被测物质产生刺激的可能性。

#### 7.3.2 应排除的试验材料

任何已知的或在初步试验中显示为皮肤、眼、黏膜组织刺激物的材料,或是  $\text{pH} \leq 2.0$  或  $\geq 11.5$  的材料,不应进行皮内试验(见 OECD 404)。在特殊情况下,如果需要进一步的风险表征/评估,可能需要对刺激物或  $\text{pH}$  超出上述范围的材料进行测试。这种情况应论证并记录。

#### 7.3.3 试验样品

试验样品应按附录 A 制备成浸提液。由于每一动物有多个试验部位,可将几种试验样品与适宜的阴性对照或空白液一起应用。本试验没有阳性对照物质,但一些化学物质(SDS、庚烷酸、乳酸、壬酸)会出现阳性反应。应使用低浓度诱导阳性刺激评分( $>1$ ,见 7.3.7)避免导致皮肤坏死。只有当检测实验室在过去 6 个月内使用该检测方法没有产生阳性结果时,才有必要使用阳性对照物来确认敏感性。

某些医疗器械(如真皮填充剂)能直接应用。由于真皮填充剂将保留在皮内,因此不宜将其与水肿相混淆。

#### 7.3.4 动物与管理

应使用健康、初成年的白化兔,雌雄不限,同一品系,体重不低于 2 kg。若预期雄性和雌性动物的皮肤刺激不会不同,能使用单一性别。使用雌性动物时,应当未育、未孕。应使动物适应环境,并按 ISO 10993-2 的规定饲养。评价试验材料初试应至少采用 3 只动物。如预期有刺激反应,初试应考虑使用 1 只动物。除非出现明显的阳性反应[红斑或水肿记分大于 2(见表 4)],否则应至少再使用 2 只动物进行试验。在使用了至少 3 只动物后,如为疑似反应,应考虑进行复试。

#### 7.3.5 试验步骤

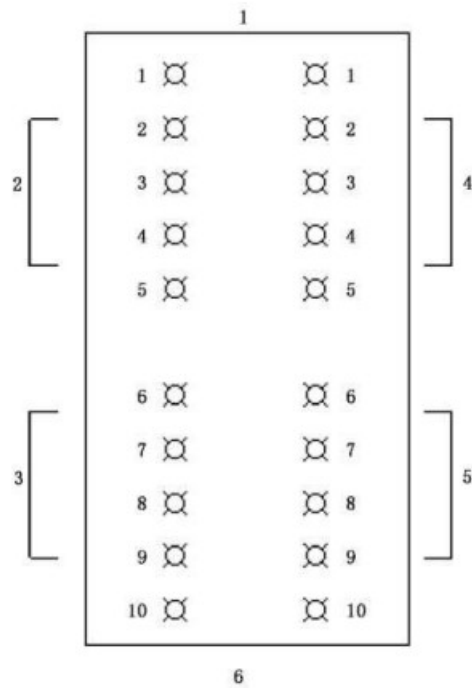
试验前 4 h~18 h,彻底除去动物背部脊柱两侧足够面积的被毛,以备注射浸提液。

在每只兔脊柱一侧的 5 个点皮内注射 200  $\mu\text{L}$  用极性或非极性溶剂制备的浸提液。应根据试验材料的黏度选用最小规格的注射针进行皮内注射。

图 2 给出了注射点排列示例。

在每只兔的脊柱另一侧注射极性和非极性溶剂对照液 200  $\mu\text{L}$ ,操作步骤同上(举例见图 2)。

如采用其他溶剂,使用该溶剂制备的浸提液和溶剂对照液重复上述步骤。



标引序号说明：

- 1——头端；
- 2——200  $\mu\text{L}$  极性浸提液注射点；
- 3——200  $\mu\text{L}$  非极性浸提液注射点；
- 4——200  $\mu\text{L}$  极性溶剂对照液注射点；
- 5——200  $\mu\text{L}$  非极性溶剂对照液注射点；
- 6——尾端。

图 2 注射点排列

### 7.3.6 动物观察

注射后即刻并在 $(24 \pm 2)\text{h}$ 、 $(48 \pm 2)\text{h}$ 和 $(72 \pm 2)\text{h}$ 观察记录各注射部位状况。

按表 4 给出的记分系统对每一观察期各注射部位的红斑和水肿的组织反应评分,并记录试验结果。

注 1: 油类液体皮内注射常会引发炎症反应。

在 $(72 \pm 2)\text{h}$ 观察时,可静脉注射适宜的活体染料,如台盼蓝或伊文思蓝,以显示出刺激区域有助于反应评价。

注 2: 如可行也能使用组织学或无创技术以有助于评价。

表 4 皮内(皮肤内)反应记分系统

反应	刺激记分
红斑和焦痂形成	
无红斑	0
极轻微红斑(勉强可见)	1

表 4 皮内(皮肤内)反应记分系统(续)

反应	刺激记分
清晰红斑	2
中度红斑	3
重度红斑(紫红色)至无法进行红斑分级的焦痂形成	4
水肿形成	
无水肿	0
极轻微水肿(勉强可见)	1
清晰水肿(肿起边缘清晰)	2
中度水肿(肿起约 1 mm)	3
重度水肿(肿起超过 1 mm,并超出接触区)	4
刺激最高记分	8
应记录并报告批复部位的其他异常情况	

### 7.3.7 结果评价

在(72±2)h 评分后,分别将每只动物试验样品或空白对照的(24±2)h、(48±2)h 和(72±2)h 的全部红斑与水肿记分相加,再除以 15[3(记分时间点)×5(试验样品或空白对照注射点)],计算出每只动物试验样品或空白对照的记分。3 只动物记分相加后除以 3 得出每一试验样品和相应空白对照的总平均记分。试验样品记分减去空白对照记分能得出试验样品最终记分。如试验样品最终记分不大于 1.0,则符合该试验要求。如果动物之间的结果不一致或对照组出现非预期表现,导致总体结果的解释存疑,则能使用另外 3 只兔子重复该研究。

1.0 或更低的最终测试得分与体外 RhE 模型无刺激性的分类相似。

空白对照样品为图 2 中提及的极性或非极性溶剂对照。

### 7.3.8 试验报告

试验报告应包括:

- 试验材料或器械的描述;
- 试验材料或器械的预期用途/应用;
- 制备试验样品或试验材料所用方法的详细描述;
- 实验动物的描述;
- 注射方法;
- 试验部位读数方式;
- 观察记录;
- 结果评估;
- 使用的标准(包括其出版年份);
- 任何对试验方案的偏离;
- 观察到的任何异常表现;

——试验日期。

## 8 人体皮肤刺激试验

### 8.1 通则

也可利用人体皮肤贴剂试验的数据来评估潜在的刺激风险。

人体研究能达到以下几种目的：

- 通过在人体而非实验动物检验化学物可直接识别出对人体的危险；
- 为某些人体接触程度高的化学物提供风险评估；
- 便于用先前从实验动物获取的研究数据外推至人类。

本文件允许直接从人体获取皮肤刺激数据，以识别产生的危险。其目的是确定在急性接触某种材料后是否存在明显的皮肤刺激危险。

临床试验应按 ISO 14155 的规定进行。附录 E 中给出了临床试验其他特殊要求。

注：附录 F 给出了更多的刺激试验信息。

### 8.2 初步考虑

应获取关于材料毒性方面和材料化学组分(与毒性相关的)的充分信息，包括经由皮肤吸收数据，以能预示人体研究不存在任何明显健康风险。

在下列情况下不应将材料用于人体试验：

- a) 在体外或体内预测试验时，材料已显示为刺激物；

注：在某些情况下，可能需要进行产品的刺激性样品/浸提液附加人体试验，以进一步表征人体潜在风险。

- b) 在体外或体内预测试验时，材料已显示出有腐蚀性；
- c) 根据结构-活性关系和/或物理化学特性如强酸或强碱余量，能预测出材料对人体皮肤的潜在腐蚀性；
- d) 材料具有引起皮肤或呼吸道致敏反应的风险；
- e) 在试验条件下材料产生任何急性毒性危险；
- f) 材料产生任何遗传毒性、生殖毒性或致癌性危险。

志愿者选择要求和指南见附录 E。

**附录 A**  
**(规范性)**  
**刺激试验材料制备**

### A.1 总体要求

在进行刺激试验和解释其数据时,应考虑医疗器械在人体应用时的接触性质、程度、频率、时间和条件等因素,对这些试验最关键的因素之一就是试验材料的制备。本附录提供了体外和体内刺激试验样品制备的一般信息。各种类型的试验样品的适用性和使用情况在本文件的相关条款中进行了说明。

### A.2 直接接触材料

#### A.2.1 固体试验材料

有一定适宜物理形态的固体材料(如片材和薄膜)应不加改变直接用于试验。可制成 2.5 cm × 2.5 cm 的样品,厚度近似实际使用要求但不超过 0.5 cm。同法制备适用的阴性对照样品。阴性对照样品在物理性状上应与试验材料近似而且无刺激性,在没有发现更适宜的对照品的情况下,吸水性纱布可作为一种代用品。

固体也能研磨成粉状,谨慎操作以防止发生污染,或者用水或一种适宜的无刺激性溶剂充分湿化以保证与组织的良好接触性。对于需要研磨成粉的陶瓷制品,注意陶瓷研磨成粉剂后其物理化学特性可能发生了改变,这对其生物学活性方面具有潜在的显著影响。

粉剂(如高吸水剂)应采用直接附着或用适当的溶剂调成糊状物后进行试验。采用相同的溶剂的对照应与经湿化、稀释或悬浮的试验材料同时进行评价。

**注:**表面积和/或微粒尺寸是生物学反应中的重要因素,如吞噬作用,这种作用在炎症和免疫应答中扮演一种重要的角色。

#### A.2.2 液体试验材料

液体应不加稀释直接使用进行试验,如不可行采用适当溶剂稀释后试验。采用相同的溶剂的对照应与稀释的试验液同时进行评价。

### A.3 试验材料浸提液

固体试验材料也可制备成浸提液进行试验。如用浸提液进行试验,应按 ISO 10993-12 的规定使用极性、非极性和/或其他适宜的溶剂制备浸提液,还应给出浸提液方法适宜性的说明。

采用浸提溶剂的空白样品,应与试验材料浸提液同时进行评价。

### A.4 溶剂

试验材料如只准许进行浸提、稀释、悬浮或湿化处置,应使用适当的无刺激性溶剂。ISO 10993-12 中给出了适用的溶剂列表。

#### A.5 无菌试验材料

如果最终产品以无菌状态提供,试验前则应采用相同程序对试验材料进行灭菌处理。用环氧乙烷灭菌的产品存在技术难题,即环氧乙烷及其反应产物在本文件所描述的试验中能产生生物学反应。

当试验中观察到刺激反应时,为了能区别试验材料和环氧乙烷残留物所致的反应,应考虑对器械进行环氧乙烷灭菌前和灭菌后反应的评价。

## 附录 B

(资料性)

## 用重建人皮模型进行体外刺激试验的试验方法核对清单

试验方法步骤如下。

——在组织到达前(通常在 RhE 组织到达前 48 h~72 h,取决于 RhE 组织预培养的需要)在极性(生理盐水)和非极性(芝麻油)溶剂中制备医疗器械试验和对照样品浸提液。浸提时间和温度应根据 ISO 10993-12 进行论证。

注 1: 在评估 RhE 模型用于医疗器械浸提液刺激试验的比对研究中,使用了加标聚合物(PVC 和硅胶),在(37±1)℃持续搅拌/摇晃浸提(72±2)h。

——接收:将表皮从运输平板培养基转移至维持培养基。

——根据制造商的说明,在湿化培养箱中,在(37±1)℃、(5±1)% CO<sub>2</sub> 下培养 2 h~24 h。

——如果不包括阳性对照材料的浸提液,在试验当天将阳性对照(SDS)按规定的浓度注入极性(生理盐水)溶剂。在证明适宜性和阳性结果后,能使用较低浓度的 SDS(例如 0.25%~0.5%)作为阳性对照。

——将 100 μL 体积的阴性对照、阳性对照、介质对照和试验样品(试验材料浸提液)加至组织表面。

——在(37±1)℃、(5±1)% CO<sub>2</sub> 的湿化培养箱中培养过夜(如 18 h~24 h,取决于制造商)。

——使用 DPBS 或 PBS 冲洗中止接触。

注 2: 在评估 RhE 的活性之前,能收集小室下的培养基用于额外的细胞因子测定。

——准备 MTT 溶液和 MTT 培养板。

——将组织转移至 MTT 溶液中。

——将 MTT 中组织在(37±1)℃、(5±1)% CO<sub>2</sub> 的湿化培养箱中培养 3 h±5 min。

——转移并浸入甲臞萃取介质(异丙醇)中。

——甲臞萃取:室温下至少 2 h 或室温密封过夜。

——震荡并均质化。

——将萃取液转移至 96 孔板中。

——用平板分光光度计读取 OD 值。

上述检查表也见于表 B.1。

表 B.1 用重建人表皮模型进行体外刺激试验的程序

时间	程序
前 48 h 至 72 h	制备极性和非极性浸提液(37±1)℃
	接收组织
	根据制造商的说明预培养组织(例如 2 h~24 h)
试验开始 T=0 h	将 100 μL 体积的 NC、PCs、VCs 和试验样品加至组织表面
培养 T=18 h 或, T=24 h	在(37±1)℃、(5±1)% CO <sub>2</sub> 的湿化培养箱中培养过夜(如 18 h~24 h,取决于制造商)

表 B.1 用重建人表皮模型进行体外刺激试验的程序 (续)

时间	程序
第二天培养结束	使用 DPBS 或 PBS 冲洗中止接触
活性测定	准备 MTT 溶液
	将组织转移至 MTT 溶液中
	将组织转移至 MTT 溶液中
MTT 培养 $T=3\text{ h}$	在 $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、 $(5\pm 1)\%$ $\text{CO}_2$ 的湿化培养箱中培养组织 $3\text{ h}\pm 5\text{ min}$
甲臞检测	用异丙醇制备 MTT 萃取液
甲臞萃取 $T=2\text{ h}$	室温下异丙醇中培养组织至少 2 h 或密封过夜
	甲臞萃取后振荡并均质化
	将甲臞萃取液转移至 96 孔板中
读数	用分光光度计读取 OD 值

## 附录 C

(资料性)

## 重建人表皮模型的方法记录表示例

检测编号: \_\_\_\_\_  
 日期: \_\_\_\_\_  
 相应的 XLS 数据文件名: \_\_\_\_\_  
 试验操作人: \_\_\_\_\_ 签名: \_\_\_\_\_  
 时间方案(见表 C.1)  
 RhE 组织接收(日期、天、时) \_\_\_\_\_ ID: \_\_\_\_\_  
 制造商/供应商: \_\_\_\_\_

表 C.1 时间方案

步骤	时间 (dd-mm-yy)	第一块		第二块	
		开始	结束	开始	结束
预培养 (2 h~24 h)					
接触 (18±1)h (24±2)h					
冲洗					
MTT 试验 3 h±5 min					
萃取至少 2 h					
测定					

## 设备检定

设备检定宜包括在进行检测的实验室的质量体系中。宜记录测试参数如培养箱、冰箱和水浴条件。宜记录设备和实验室用具(如移液器)质量方面的信息。

## 试剂性能

试剂性能信息见表 C.2。

表 C.2 试剂性能信息

重建表皮(RhE)供应批号:	生产日期:
试验培养基批号:	失效日期:
MTT 浓缩液批号:	失效日期:
MTT 稀释剂批号:	生产日期:

表 C.2 试剂性能信息 (续)

异丙醇(MTT 萃取剂)批号:	失效日期:
(D)PBS 批号:	失效日期:
其他备注:	

ID/日期:

表 C.3 给出了皮肤的视觉质量控制。

表 C.3 皮肤的视觉质量控制

外观	1	2
大体		
排除以下组织: ——边缘缺陷; ——气泡; ——表面有大量水分		
使用分数:1——非常好;2——好;3——可接受;4——不可接受		

具体观察:

溶液和介质:

加标化学物阳性对照。

用 20%SDS 溶液配制的 1%(体积比)SDS 生理盐水溶液;试验当天,将 100  $\mu$ L 20% SDS 与 1.9 mL 介质混合,配制 1%SDS 生理盐水和芝麻油新鲜溶液。在制备后加至组织表面之前的短时间内彻底涡旋混匀。

保质期是当天。

——20%SDS 参照储存液,批号: .....

——生理盐水(0.9%NaCl 溶液)批号: .....

生理盐水(0.9%NaCl)溶液制备:

——参照氯化钠,批号: .....

——灭菌方式: .....

——制备日期: .....

——失效日期: .....

(D)PBS 溶液制备:

——参照浓缩(D)PBS,批号: .....

——pH 调整(至 7.0): .....

——灭菌方式: .....

——制备日期: .....

——失效日期: .....

芝麻油：

——参照品，批号：.....

——失效日期：.....

**单个组织的记录**

如果检测过程中发现异常，如果需要替换组织，或者有技术问题需要处理，记录在表 C.4 中。  
记录组织编号、样品编号和观察结果或备注。

**表 C.4 单个组织的记录**

样品编号	组织编号	记录

ID/日期：

**分光光度计测定读数平板配置**

记录样品在 96 孔板上的位置。严格按照生产商说明书上所示的固定的平板设计。用于医疗器械刺激试验比对研究[9]中所用的平板布局示例见表 C.5 和表 C.6。

读数前 10 min 打开分光光度计或按设备说明书的要求打开设备。

**表 C.5 EpiDerm RhE 模型**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	bckg	bckg	bckg	bckg	bckg	bckg							
B	NC	PC	VC1	VC1	VC1	VC1	VC1	VC1	VC1	VC1	VC1	VC1	组织1
C	NC	PC	VC2	VC2	VC2	VC2	VC2	VC2	VC2	VC2	VC2	VC2	
D	NC	PC	TA1	TA1	TA1	TA1	TA1	TA1	TA1	TA1	TA1	TA1	组织2
E	NC	PC	TA2	TA2	TA2	TA2	TA2	TA2	TA2	TA2	TA2	TA2	
F	NC	PC	TA3	TA3	TA3	TA3	TA3	TA3	TA3	TA3	TA3	TA3	组织3
G	NC	PC	TA4	TA4	TA4	TA4	TA4	TA4	TA4	TA4	TA4	TA4	
H													

bckg:异丙醇溶液用于本底测量；NC:阴性对照[(D)PBS]；PC:阳性对照[(SDS 生理盐水(PC))；VC:介质对照背景[如生理盐水(VC1)和芝麻油(VC2)]；TA1、TA2、…、TA7:试验样品 1~7。根据制造商要求，以 2 个重复(2×200 μL)测定 EpiDerm RhE 模型的 OD 值。

表 C.6 SkinEthic RhE 模型

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	bckg	bckg	bckg	bckg	bckg	bckg	empty	empty	empty	empty	empty	empty
B	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	empty	empty	empty
C	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	empty	empty	empty
D	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	empty	empty	empty
E	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	empty	empty	empty
F	NaCl1	NaCl1	NaCl1	NaCl1	NaCl1	NaCl1	NaCl1	NaCl1	NaCl1	empty	empty	empty
G	SO1	SO1	SO1	SO1	SO1	SO1	SO1	SO1	SO1	empty	empty	empty
H	NaCl2	NaCl2	NaCl2	NaCl2	NaCl2	NaCl2	NaCl2	NaCl2	NaCl2	empty	empty	empty
	组织1			组织2			组织3					

bckg: 异丙醇溶液用于本底测量; NC: 阴性对照; [(D)PBS] 介质对照; SO: 芝麻油介质对照;

PCNaCl: NaCl 浸提介质阳性样品对照; PCSO: 芝麻油浸提介质阳性样品对照。NaCl1 和 SO1, 试验样品 1 每块培养组织 3 份 200 μL 异丙醇萃取液。额外的测试样品能在额外的 96 孔板中测量。根据制造商要求, 以 3 个重复 (3 × 200 μL) 测定 SkinEthic RhE 模型的 OD 值。

**检查波长**

勾选表 C.7 中正确(√)的滤光片设置。

表 C.7 光度计设置

波长: 570 (550 nm ~ 570 nm)	
---------------------------	--

ID/日期:

**存档**

原始数据保存在/为:

电子表格保存在/为:

MDS 保存在/为:

**试验样品的特性(见表 C.8)**

实验室: ..... 研究编号: ..... 检测编号: .....

表 C.8 样品制备及培养

试验材料名称或编号	取样量	加入浸提介质体积	培养箱	放入时间	取出时间	浸提前和浸提后的外观

ID/日期:

**附 录 D**  
**(规范性)**  
**特殊刺激试验**

### D.1 总体要求

存在以下特殊刺激试验。这些试验与预期应用于特定部位的医疗器械具有相关性。如进行这类试验,应给出试验方法的选择说明。

### D.2 眼刺激试验

#### D.2.1 总则

眼刺激试验只有在用其他方法不能得到安全性数据的情况下才宜考虑进行,并且仅用于预期与眼或眼睑接触的材料。

关于急性眼刺激/腐蚀的 OECD 405 描述了一种逐步的体内测试策略,以确定化学品的眼睛刺激/腐蚀性能。使用这种策略以及证据权重分析(在进行体内试验之前考虑所有关于眼睛刺激可能性的可用信息)对于避免不必要的动物使用是很重要的。减少导致严重动物反应的物质试验促进动物福利和健全的科学。虽然 TG 405 是一种体内试验方法,但它在动物试验的减少和优化方面也支持 3R 原则。该试验尚未进行医疗器械浸提液验证。

#### D.2.2 眼刺激的体外替代试验

几种眼刺激体外替代试验已被评价。然而,它们尚未被验证可用于检测医疗器械。单独的体外试验可能不能取代覆盖所有体内终点的体内眼刺激试验。尽管如此,在一个(分层)测试策略中,几种替代试验方法的策略性组合能够替代德莱塞(Draize)眼试验。在 EURL ECVAM 工作组内,阐述了关于化学品(分层)测试策略的一个基本概念。该框架基于检测严重刺激物质(EU R41;GHS“第 1 类”)或非刺激性物质(EU“非分类”;GHS“未分类”)能力各不相同的眼刺激替代方法。根据这一框架,通过分层策略,能从任一端操作的方法去安排试验来解决整个刺激范围:先检测严重刺激物解决无刺激问题(“自上而下方法”),或者相反地,先从非刺激物的识别开始(“自下而上方法”)。中度刺激性在两种方法的最后一层解决。

已经有很多基于与“眼刺激”终点有关的体外方法的 OECD 试验指南:OECD 437:2020、OECD 438:2017、OECD 460:2017、OECD 491:2020 和 OECD 492:2017。这些测定化学品刺激性的指南基于经过验证[通过替代方法验证部门间协调委员会(ICCVAM)、EURL ECVAM、日本替代法验证中心(JaCVAM)或其他]的体外试验。这些指南描述了角膜混浊和渗透性测试方法(见 OECD 437),离体鸡眼试验法(见 OECD 438),使用在半透性插入物上生长的细胞进行荧光素泄漏试验的方法(见 OECD 460)和由基于细胞毒性在融合的单分子层兔角膜上皮(SIRC)细胞上进行的体外试验组成的体外短时间接触试验方法(见 OECD 491),以及使用人重建角膜样上皮的试验,即所谓重建人类角膜样上皮(RhCE)试验(见 OECD 492)。这些 OECD 试验均未经医疗器械浸提液验证。

#### D.2.3 目的

评估试验材料产生眼刺激反应的可能性。

#### D.2.4 应排除的试验材料

在皮肤试验中已证实有明显腐蚀性或有重度刺激性的材料和/或最终产品不应再进行眼刺激试验。任何显示为皮肤刺激物或  $\text{pH} \leq 2.0$  或  $\geq 11.5$  的材料也不宜再进行试验,宜标示为潜在的眼刺激物。

在需要进一步风险表征/评估的特殊情况下,可能需要检测一些有低刺激性的材料,这种情况应论证并记录。

#### D.2.5 试验材料

试验材料如是液体,将 100  $\mu\text{L}$  未稀释液直接滴入动物 1 只眼的下结膜囊内。

试验材料如是固体或颗粒状制品,将其研磨成细粉,混合后取 100  $\mu\text{L}$  体积容量(质量不超过 100 mg)滴入动物 1 只眼的下结膜囊内。

注:有的产品不适宜直接在眼中试验,机械损伤能导致试验无效。

如将试验材料装入泵中喷射,可像液体样喷射滴入 100  $\mu\text{L}$ 。

如将试验材料装入喷雾器中,可选择下列方法中的一种:

- 在距离张开的眼睛 10 cm 处喷射 1 s;或
- 喷入一冷容器内凝结为液体后应用。

如试验材料只能用其浸提液进行试验,按附录 A 规定制备浸提液,将 100  $\mu\text{L}$  的浸提液滴入动物 1 只眼的下结膜囊内。

在上述同等条件下不加试验材料,用极性和非极性溶剂制备空白液。

#### D.2.6 动物与管理

应使用健康、初成年的白化兔,雌雄不限,同一品系,体重不低于 2 kg。若预期雄性和雌性动物的眼刺激不会不同,可以使用单一性别。使用雌性动物时,应当未育、未孕。

应使动物适应环境,并按 ISO 10993-2 的规定饲养。

初试应使用 1 只动物评价试验材料。如 1 只动物出现清晰的阳性反应(见表 D.1)时,则不必再进行试验。使用预期不会引起显著眼部刺激的材料,例如隐形眼镜溶液、表征良好的、无细胞毒性的材料或其他材料,通过科学判断,可以一开始就测试 3 只兔子,不需要单兔筛选。

固体或液体材料如没有出现反应时(见表 D.1),应至少再使用 2 只动物进行试验。对于浸提液,每种浸提液也应至少再使用 2 只动物。

如试验使用了至少 3 只动物后反应仍然疑似或不明确,应考虑进行复试。

#### D.2.7 试验步骤

在试验开始前 24 h 内,目视检查每只兔子的双眼,判断是否有眼部异常的情况。如果任何 1 只眼睛有任何异常,就更应更换兔子。

检查眼时可使用 2% 荧光素钠(英国药典)或等同试剂检查角膜损伤,也推荐使用检眼镜、手持式裂隙灯或其他适宜的设备。

按 D.2.5 的规定将试验样品滴入动物的 1 只眼内。

滴注后将眼睑闭合约 1 s。

测试浸提液时,每只动物的对侧眼睛作为对照,宜用空白液体或空白对照处理。如果试验样品是原液,可用水或生理盐水溶液作为空白。

如材料预期要反复接触人体,并且在急性试验中未发现有显著反应时,可进行重复接触试验。重复接触试验应只在急性接触试验完成后[至少在  $(72 \pm 2)$  h 后]进行,接触周期宜与试验材料/器械临床使

用时间相似。

#### D.2.8 动物观察

对一次性滴入试验材料的动物,在滴注后约 $(1\pm 0.1)$ h、 $(24\pm 2)$ h、 $(48\pm 2)$ h和 $(72\pm 2)$ h检查每只动物的双眼。

如有持续性损伤存在,有必要延长观察时间,以确定损伤的进展性和可逆性,但延期不超过21 d。对有严重损伤的动物延期观察是不合理的。

注:ISO 9394给出了接触镜试验指南,要求21 d接触期,每天接触8 h。这在该指南中是一个例外情况。

按表D.1规定的眼损伤记分系统,对观察到的反应记分并记录。

表 D.1 眼损伤记分系统

反应	记分
a) 角膜	
1) 浑浊程度(最致密区域):	
透明	0
云翳或弥散混浊区,虹膜细节清晰可见	1 <sup>a</sup>
易识别的半透明区,虹膜细节略显模糊	2 <sup>a</sup>
乳白色区,看不见虹膜细节,几乎不能辨别瞳孔大小	3 <sup>a</sup>
浑浊,看不见虹膜细节	4 <sup>a</sup>
2) 角膜受累范围	
大于0,小于或等于1/4	0
大于1/4,小于1/2	1
大于1/2,小于3/4	2
大于3/4直至整个角膜区域	3
b) 虹膜	
1) 正常	0
超出正常皱襞,充血水肿,角膜缘充血(其中一种或全部),仍有对光反应(反应迟钝为阳性)	1 <sup>a</sup>
无对光反射,出血性严重结构破坏(其中一种或全部)	2 <sup>a</sup>
c) 结膜	
1) 充血(累及睑结膜和球结膜,不包括角膜和虹膜)	
血管正常	0
血管明显充血	1
弥散性充血,呈深红色,血管纹理不清	2 <sup>a</sup>
弥散性充血,呈紫红色	3 <sup>a</sup>
2) 水肿	

表 D.1 眼损伤记分系统 (续)

反应	记分
无水肿	0
轻微水肿(包括瞬膜)	1
明显水肿伴部分睑外翻	2 <sup>a</sup>
眼睑水肿使眼呈半闭合状	3 <sup>a</sup>
眼睑水肿使眼呈半闭合乃至全闭合状	4 <sup>a</sup>
3)分泌物	
无分泌物	0
超过正常分泌量(不包括正常动物眼内眦少量分泌物)	1
分泌物浸湿眼睑及眼睑邻近睫毛	2
分泌物浸湿眼睑、睫毛和眼周围区域	3
<sup>a</sup> 阳性结果。	

对多次滴入试验材料的动物,在每次滴注前和滴注后(1±0.1)h 检查每只动物的双眼。

如末次滴注后有刺激现象,可能要延长观察时间。如有持续性角膜受累症状或其他眼刺激反应也可能需要延长观察时间,以确定损伤的进展性和可逆性。

按表 D.1 规定的眼损伤记分系统,对观察到的反应记分并记录。

动物如在任何时候出现下列症状之一时,应立即从研究中撤出并人道地使其安乐死:

- 极重度眼损伤(如结膜腐痂和溃疡、角膜穿孔、前房内有血或脓液等);
- 有血污或脓液排出;
- 明显的角膜溃疡。

动物如显示表 D.1 记分系统的最大反应时也应从研究中撤出,这种反应有:

- 对光反射消失(虹膜反应记分 2)或角膜浑浊(记分 4),并在(24±2)h 内无可逆迹象;或
- 重度结膜炎(结膜水肿记分 4,并伴发充血记分 3),并在(48±2)h 内无可逆迹象。

人道处死动物。

## D.2.9 结果评价

### D.2.9.1 总体要求

试验眼与对照眼之间的差异性应按表 D.1 给出的记分系统进行判定并解释。

### D.2.9.2 急性接触

如果有 1 只以上动物试验眼在任何观察阶段呈现阳性结果(见表 D.1),即认为该材料为眼刺激物,不必进一步试验。

如 3 只动物试验眼中仅有 1 只呈轻度或中度反应或是疑似反应,另取动物进行复试。

复试中如动物试验眼在任何观察阶段半数以上呈现阳性结果(见表 D.1),则认为该试验材料为眼刺激物。

仅有 1 只动物出现严重反应已足以标示该材料为眼刺激物。

### D.2.9.3 重复接触

如试验组中半数以上动物在任何观察阶段呈现阳性结果(见表 D.1),即认为该试验材料为眼刺激物。

### D.2.10 试验报告

试验报告应包括:

- 使用的标准(包括其出版年份);
- 试验样品的描述;
- 试验样品的预期用途/应用;
- 制备试验样品所用方法的详细描述;
- 实验动物的描述;
- 滴入的方法;
- 眼读数是如何进行的;
- 观察记录;
- 结果评估;
- 任何对试验方案的偏离;
- 观察到的任何异常表现;
- 试验日期。

## D.3 口腔黏膜刺激试验

### D.3.1 总体要求

口腔刺激试验应仅考虑用于预期与口腔组织接触的材料,并且只有在用其他方法不能得到安全性数据的情况下才考虑进行。与体外重建人表皮模型类似,现在也有黏膜体外模型。但是它们还不能用于医疗器械检测。

### D.3.2 目的

评估试验材料对口腔组织产生刺激的可能性。

### D.3.3 应排除的试验材料

任何已显示为皮肤或眼的刺激物,或  $\text{pH} \leq 2.0$  或  $\geq 11.5$  的材料不应再进行试验,应标示为潜在的口腔组织刺激物。

需要进一步的风险表征/评估的特殊情况下,即使已知被试材料是刺激物或材料的  $\text{pH}$  在上述范围之外可能还是需要进行测试,这种情况应论证并记录。

### D.3.4 试验材料

按附录 A 规定制备试验材料。

### D.3.5 动物与管理

应使用同一品系任一性别的健康、初成年金黄色地鼠。应使动物适应环境,并按 ISO 10993-2 的规定饲养。

除此以外,适当时给动物套上 1 个 3 mm~4 mm 宽的适用项圈,使动物能维持正常进食和呼吸,且

又能防止动物口腔内棉球移出。试验期间动物每天称重,连续 7 d。在此期间,检查每只动物的体重下降情况,必要时调整项圈。如动物体重持续下降,将其从试验中剔除。

初试应至少使用 3 只动物评价试验材料。

注:另取动物用相应的阴性对照材料或空白液处理可能是合适的。

初试反应如为疑似或不明确,应考虑进行复试。

### D.3.6 试验步骤

翻转每只动物颊囊。用生理盐水冲洗后,检查有无异常。

对于固体试验材料,直接将样品(直径不大于 5 mm)放入颊囊内。

对液体试验材料或浸提液样品,则可用棉球浸透样品,记录吸收的体积,放入动物的一侧颊囊内。也可将适宜体积的样品直接灌注入颊囊。

另一侧颊囊不放样品作为对照。如有必要,可使用阴性对照动物按照对照程序进行平行试验。

必要时,重新给动物带上项圈放回笼中。

接触时间应与材料预期实际使用时间一致,但不能少于 5 min。

接触后除去项圈和棉球,用生理盐水冲洗颊囊,注意不要污染另一侧颊囊。

对于急性接触,每小时( $\pm 0.1$  h)重复上述步骤,共 4 h。其他处理方案(如基于临床使用)应进行论证并记录。

重复接触试验时,根据预期临床应用情况确定接触次数、持续时间和间隔时间。

### D.3.7 动物观察

取出棉球后肉眼观察颊囊,并且在每次接触前(如需重复接触时)检查颊囊。

描述动物颊囊的一般状况,并按表 D.2 给出的记分系统判定动物每一观察期颊囊表面红斑反应记分。记录结果以出具试验报告。

末次接触后( $24 \pm 2$ )h 肉眼观察颊囊,人道处死地鼠。取颊囊有代表性部位的组织样品,放入适宜的固定液中固定后进行组织学检查。

表 D.2 黏膜反应肉眼记分系统

反应	记分
红斑和焦痂形成	
无红斑	0
极轻微红斑(勉强可见)	1
清晰红斑	2
中度红斑	3
重度红斑(紫红色)至无法红斑分级的焦痂形成	4
宜记录并报告组织的其他不良改变	

### D.3.8 结果评估

#### D.3.8.1 肉眼评价

比较试验侧颊囊与对侧颊囊,如有对照组,与对照组动物的颊囊进行比较。

每一观察记分(见表 D.2)相加后再除以观察总数得出每只动物平均记分。

注 1: 这些观察可能有助于组织学评价。

注 2: 试验材料首次接触前的初始观察结果不包括在平均记分中。

#### D.3.8.2 组织学评价

应由病理学家对口腔组织显微镜下的刺激作用进行评价,可按表 D.3 给出的记分系统对每一组织进行评分。

试验组中所有动物的显微镜评价记分相加,再除以观察总数,得出试验组平均记分。对照组同法计算。最大记分为 16。

对照颊囊或对照动物的显微镜评价总分大于 9 时可能表明有病理改变,可能是试验操作时造成的损伤。如其他试验或对照动物出现同样的高分,无论是哪种情况,可能都有必要进行复试。

试验组平均记分减去对照组平均记分得出刺激指数(见表 D.4)。

对于重复接触试验,可将表 D.3 修改为适合于对有关慢性刺激额外的组织反应的评价。

表 D.3 黏膜组织反应显微镜检查记分系统

反应	记分
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
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
血管充血	
无	0
极轻	1
轻度	2
中度	3
重度伴血管破裂	4
水肿	
无	0
极轻	1

表 D.3 黏膜组织反应显微镜检查记分系统 (续)

反应	记分
轻度	2
中度	3
重度	4

表 D.4 刺激指数

平均记分	反应程度
0	无
1~4	极轻
5~8	轻度
9~11	中度
12~16	重度

宜记录组织的其他不良改变,并包括在反应的评估中  
表 D.3 给出的显微镜检查记分系统适用于本附录所列全部试验,“刺激指数”已发展用于阴道刺激模型,也可用于其他一些试验

### D.3.9 试验报告

试验报告应包括:

- 试验样品的描述;
- 试验样品的预期用途/应用;
- 制备试验样品所用方法的详细描述;
- 实验动物的描述;
- 接触方法;
- 试验位点记分是如何进行的;
- 观察记录;
- 组织学评价;
- 结果评估;
- 使用的国家标准(包括其出版年份);
- 任何对试验方案的偏离;
- 观察到的任何异常表现;
- 试验日期。

## D.4 阴茎刺激试验

### D.4.1 总体要求

阴茎刺激试验应仅考虑用于预期与阴茎组织接触的材料,并且只有在用其他方法不能得到安全性数据的情况下才考虑进行。

#### D.4.2 目的

评估试验材料产生阴茎皮肤刺激反应的可能性。

#### D.4.3 应排除的试验材料

任何已显示为皮肤或眼的刺激物,或  $\text{pH} \leq 2.0$  或  $\geq 11.5$  的材料不应再进行试验,应标示为潜在的阴茎刺激物。

#### D.4.4 试验样品

固体或液体试验样品应按附录 A 规定进行制备。

#### D.4.5 动物与管理

应使用雄性白化兔或豚鼠。使用健康初成年体重不低于 2 kg 的兔和体重为 300 g~500 g 的豚鼠。应使动物适应环境,并按 ISO 10993-2 的规定饲养。

供试验接触的阴茎长度应至少为 1 cm。

由于动物个体色素差异,首次试验前应先观察动物,按表 D.2 给出的记分系统对红斑进行评分,不应使用出现严重变色或红斑记分大于或等于 2 的动物。

初试应至少使用 3 只动物评价试验材料,另取 3 只动物作为对照组。

初试反应如为可疑或不明确时,应考虑进行复试。

#### D.4.6 试验步骤

用辅助器具固定动物四肢,使动物保持仰卧姿势。

用食指和中指轻压外阴部使阴茎伸出。

阴茎伸出后,施用足够的试验样品(约 0.2 mL)以确保覆盖阴茎。

使阴茎缩回包皮中,并应采取措施(如伊丽莎白颈圈)防止动物舔试验部位,以避免继发性因素干扰原发性刺激反应。

或者,试验材料末次接触后,动物也可固定在一个设计合理的固定器中( $1 \pm 0.1$ )h。

对于急性接触,每小时( $\pm 0.1$  h)重复上述步骤,共 4 h。其他处理方案(如根据临床使用情况)应进行论证并记录。

长期重复接触试验时,根据预期临床应用情况确定试验接触次数、持续时间和间隔时间。

#### D.4.7 动物观察

急性接触时,每次接触后( $1 \pm 0.1$ )h(如下次接触前立即)注意观察阴茎外观。末次接触后( $1 \pm 0.1$ )h、( $24 \pm 2$ )h 和( $48 \pm 2$ )h 观察并记录阴茎外观。

长期重复接触时,在首次接触后( $1 \pm 0.1$ )h 和下次接触之前观察记录阴茎外观。

按表 D.2 给出的记分系统对每一动物每一观察期皮肤表面红斑反应记分,并记录结果以出具试验报告。

动物在试验前如有皮肤发红现象,应从试验样品红斑记分中减去试验前的红斑记分,以确定由试验样品引起的红斑记分。每一观察记分最高为 4 分。

#### D.4.8 结果评估

##### D.4.8.1 肉眼观察评价

将试验阴茎和包皮与对照动物阴茎进行比较。

将每次观察记分(见表 D.2)相加后再除以观察次数得出每只动物的平均记分。

注 1: 这些观察可能有助于组织学评价。

注 2: 试验材料首次应用前的初始观察结果不包括在平均记分中。

48 h 观察后立即将动物人道处死。切下阴茎和包皮末端放入适宜的固定剂中固定后进行组织学检查。

##### D.4.8.2 组织学评价

应由病理学家对阴茎皮肤的刺激作用进行评价,病理学家可根据表 D.3 给出的系统对每个组织进行记分。

将试验组所有动物的显微镜评价记分相加,加和除以观察动物个数,得到试验组平均值。最大记分为 16。

对照组同法计算。

对照动物出现显微镜评价总记分大于 9 时,表明可能有操作损伤。如其他试验或对照动物显示同样的高分时,可能有必要进行复试。

试验组平均记分减去对照组平均记分即得出刺激指数(见表 D.4)。

对于长期重复接触试验,可将表 D.3 修改为适合于对有关慢性刺激额外的组织反应的评价。

#### D.4.9 试验报告

试验报告应包括:

- 使用的国家标准(包括其出版年份);
- 试验样品的描述;
- 试验样品的预期用途/应用;
- 制备试验样品所用方法的详细描述;
- 实验动物的描述;
- 接触方法;
- 试验位点记分是如何进行的;
- 观察记录;
- 组织学评价;
- 结果评估;
- 任何对试验方案的偏离;
- 观察到的任何异常表现;
- 试验日期。

#### D.5 直肠刺激试验

##### D.5.1 总体要求

直肠刺激试验应仅考虑用于预期与直肠组织接触的材料,并且只有在用其他方法不能得到安全性数据的情况下才考虑进行。

## D.5.2 目的

评估试验材料产生直肠组织刺激反应的可能性。

## D.5.3 应排除的试验材料

任何已显示为皮肤或眼的刺激物,或  $\text{pH} \leq 2.0$  或  $\geq 11.5$  的材料不应再进行试验,可标示为潜在的直肠刺激物。

## D.5.4 试验材料

固体或液体试验材料应按附录 A 的规定进行制备。

## D.5.5 动物与管理

应使用健康、初成年的白化兔,雌雄不限,同一品系,体重不低于 2 kg。如使用其他种属应经过论证。

应使动物适应环境,并按 ISO 10993-2 的规定饲养。

初试应至少使用 3 只动物评价试验材料,另取 3 只动物作为对照组。

初试反应如为可疑或不明确时,应考虑进行复试。

每次试验操作前应检查动物直肠排液、水肿和/或其他感染、刺激和/或损伤迹象。

## D.5.6 试验步骤

将一短软管(6 cm)或一钝头插管与一容量大于 1 mL 的注射器连接,注射器和导管注满后给予动物 1 mL 试验样品。应为每只动物分别准备 1 套注射器和连接导管。

将动物置于固定器中固定,以便于接触会阴部位,或用固定器具将动物束缚住后再固定其后肢,以暴露出会阴部位。

导管插入前用对照样品或适当的润滑剂湿化处理。

提起动物尾巴暴露出会阴,然后将湿化处理过的导管轻柔地插入直肠,用注射器注入 1 mL 试验液。抽出导管并以适当的方法处置掉。

由于动物个体直肠容积的差异性,试验样品注入时或注入后可能会有溢出,用软纸巾轻柔拭去溢出的液体。

每次间隔  $(24 \pm 2)$  h 重复上述步骤,连续 5 d。其他处理方案(如基于临床使用)应进行论证并记录。

对于长期重复接触试验,应根据预期临床接触时间确定接触次数、持续时间和间隔时间。

## D.5.7 动物观察

初次接触后  $(24 \pm 2)$  h 和每次试验操作前注意并记录会阴部位溢液、红斑和刺激状况。

对于出现过度溢液、肿胀或难以给药的动物,应人道处死后做组织学检查(见 D.5.8.1 和 D.5.8.2)。

## D.5.8 结果评价

### D.5.8.1 肉眼观察评价

末次接触后  $(24 \pm 2)$  h 无痛处死动物,完整切下直肠后纵向剖开,检查上皮组织层的刺激、损伤以及坏死情况。

将直肠和大肠的末端放入适当的固定剂中固定后进行组织学检查。

将试验兔的直肠组织与对照兔直肠组织进行比较。

记录并描述肉眼观察下每只动物直肠组织的状况,注意试验与对照部位之间的差别。

注:这些观察可能有助于组织学评价。

#### D.5.8.2 组织学评价

应由病理学家对直肠组织的刺激作用进行评价,病理学家可根据表 D.3 给出的系统对每个组织进行记分。

将试验组所有动物的显微镜评价记分相加,加和除以观察动物个数,得到试验组平均值。最大记分为 16。

对照组同法计算。

对照组动物出现显微镜评价总分大于 9 时,表明试验操作中可能造成损伤。如其他试验或对照动物出现同样的高分时,可能有必要进行复试。

试验组平均记分减去对照组平均记分即得出刺激指数(见表 D.4)。

对于长期重复接触试验,可将表 D.3 修改为适合于对有关慢性刺激额外的组织反应的评价。

#### D.5.9 试验报告

试验报告应包括:

- 使用的国家标准(包括其出版年份);
- 试验样品的描述;
- 试验样品的预期用途/应用;
- 制备试验样品所用方法的详细描述;
- 实验动物的描述;
- 接触方法;
- 试验位点记分是如何进行的;
- 观察记录;
- 组织学评价;
- 结果评估;
- 任何对试验方案的偏离;
- 观察到的任何异常表现;
- 试验日期。

#### D.6 阴道刺激试验

##### D.6.1 总体要求

阴道刺激试验应仅考虑用于预期与阴道组织接触的材料,并且只有在用其他方法不能得到安全性数据的情况下才考虑进行。

##### D.6.2 目的

评估试验材料产生阴道组织刺激反应的可能性。

##### D.6.3 应排除的试验材料

任何已显示为皮肤或眼的刺激物,或  $\text{pH} \leq 2.0$  或  $\geq 11.5$  的材料不应再进行试验,可标示为潜在的

阴道组织刺激物。

#### D.6.4 试验材料

固体或液体试验材料应按附录 A 的规定进行制备。

#### D.6.5 动物与管理

应使用健康、初成年的雌性白化兔，同一品系，体重不低于 2 kg。如使用其他种属应经过论证。动物应达到其生殖道已充分发育足以应用试验样品的年龄。动物应无育并未孕。

应使动物适应环境，并按 ISO 10993-2 的规定饲养。

初试应至少使用 3 只动物评价试验材料，另取 3 只动物作为对照组。

初试反应如为可疑或不明确时，应考虑进行复试。

每次试验操作前应检查动物阴道溢液、水肿和/或其他感染、刺激和/或损伤迹象。在动物发情期阶段也应检查阴道，以避免由于阴道的生理变化而作出假阳性反应判定。

#### D.6.6 试验步骤

将一短软管(6 cm)或一钝头插管与一容量大于 1 mL 的注射器连接，注射器和导管注满后给予动物 1 mL 试验样品。应为每只动物分别准备 1 套注射器和连接导管。

将动物置于固定器中固定，以便于接触阴道，或用固定器具将动物束缚住后再固定其后肢，以暴露出阴道。

用对照液或适当的润滑剂湿化处理导管。

提起动物尾巴暴露出阴道口，然后将湿化处理过的导管轻柔地插入阴道，用注射器注入 1 mL 试验样品。抽出导管并以适当的方法处置掉。

由于动物个体阴道容积的差异性，试验样品注入时或注入后可能会有溢出，用软纸巾轻轻拭去溢出的液体。

每次间隔(24±2)h 重复上述步骤，至少连续 5 d。其他处理方案(如基于临床使用)应进行论证并记录。

对于长期重复接触试验，应根据预期临床应用情况确定接触次数、持续时间和间隔时间。

#### D.6.7 动物观察

初次接触后(24±2)h 和每次试验操作前注意并记录阴道口和会阴部位溢液、红斑和水肿迹象。

对于出现过度溢液、红斑和/或水肿情况，或难以给药的动物，应无痛处死后做组织学检查(见 D.6.8.1 和 D.6.8.2)。

#### D.6.8 结果评价

##### D.6.8.1 肉眼观察评价

末次接触后(24±2)h 人道处死动物，完整切下阴道后纵向剖开，检查上皮组织层的刺激、损伤以及坏死迹象。

将取下的阴道组织放入适当的固定剂中固定后进行组织学检查。每块阴道组织应取其两端和中央三部分。

将接触过试验材料的动物阴道与对照动物的阴道进行比较。

记录并描述肉眼观察下每只动物阴道组织的状况，注意试验组与对照组之间的差别。

注：这些观察可能有助于组织学评价。

#### D.6.8.2 组织学评价

应由病理学家对阴道组织的刺激作用进行评价，病理学家可根据表 D.3 给出的系统对每个组织进行记分。

将试验组所有动物的显微镜评价记分相加，加和除以观察动物个数，得到试验组平均值。最大记分为 16。

对照组同法计算。

对照组动物出现显微镜评价总分大于 9 时，表明试验操作中可能造成损伤。如其他试验或对照动物出现同样的高分时，可能有必要进行复试。

试验组平均记分减去对照组平均记分即得出刺激指数（见表 D.4）。

对于长期重复接触试验，可将表 D.3 修改为适合于对有关慢性刺激额外的组织反应的评价。

#### D.6.9 试验报告

试验报告应包括：

- 使用的国家标准（包括其出版年份）；
- 试验样品的描述；
- 试验样品的预期用途/应用；
- 制备试验样品所用方法的详细描述；
- 实验动物的描述；
- 接触方法；
- 试验位点记分是如何进行的；
- 观察记录；
- 组织学评价；
- 结果评估；
- 任何对试验方案的偏离；
- 观察到的任何异常表现；
- 试验日期。

**附录 E**  
**(规范性)**  
**人体皮肤刺激试验**

### E.1 总则

下列要求适用于除 ISO 14155 之外的范围,这些要求更具有特异性。

### E.2 原理

将试验材料单剂量封闭贴敷于志愿者皮肤上。通过短间接接触试验材料将刺激保持在最低限度。但在某些情况下,较长的接触期可能也适用。

本试验通过测定志愿者中出现皮肤刺激反应的比例来进行评价,这些反应与阳性对照材料引起的反应具有相关性。

### E.3 方法描述

#### E.3.1 志愿者选择

本文件设计用于健康志愿者。选择的志愿者应至少 18 岁,无孕且不在哺乳期。此外已知对试验材料过敏或显示任何皮炎症状的人员应排除于试验之外。选择志愿者的过程应由皮肤病专家或其他有资格的人员进行监督。

#### E.3.2 剂量制备

液体试验材料一般使用时不稀释。固体材料试验时,可用少量水(通常 200  $\mu\text{L}$ )或在必要时用其他适宜的介质湿化试验材料,以保证试验材料与皮肤良好的接触性。应考虑固体材料的结构并应证实所用试验材料制备方法的合理性。使用湿化过的样品时,应注意保证每一受试者接受试验材料的剂量相同。试验中每一受试者湿化用水量应相同并记录用水量。

使用介质时,应考虑介质对试验材料引起的皮肤刺激反应的影响。当使用除水之外的介质作为固体材料的湿化剂时,应考虑给每一受试者设置空白液体(空白)贴敷。

#### E.3.3 步骤

##### E.3.3.1 志愿者人数

本试验应至少由 30 名志愿者组成,其中,男性或女性所占比例不能少于三分之一。

##### E.3.3.2 试验材料应用

将试验材料贴敷于人体皮肤的适宜位置,如上臂外侧,然后用带有纱布块的封闭性包扎带固定。志愿者的应用部位应相同并应记录。敷贴片直径一般应至少为 1.8 cm,最好是 2.5 cm。采用适宜的无刺激性敷料及胶带固定敷贴片,使其在试验期间能与皮肤接触。

敷贴片应能向皮肤单位面积内释放足够的试验材料剂量,一般认为以 50  $\text{mg}/\text{cm}^2 \sim 100 \text{mg}/\text{cm}^2$  为宜。在应用液体试验材料时,通常向纱布片上滴加 200  $\mu\text{L} \sim 400 \mu\text{L}$ ,直至其湿化。试验固体材料时

则将 200 mg 试验材料湿化后加至纱布块上,或将纱布块湿化并使试验材料覆盖整个试验部位。

### E.3.3.3 接触时间

为了避免不可接受的强烈反应,应采用谨慎的方法进行试验。连续贴敷过程会产生阳性反应,但并非严重的刺激反应。逐渐增加敷贴片接触时间,从 15 min 和 30 min 开始,直至 1 h、2 h、3 h 和 4 h。如有足够的迹象表明接触 1 h 不会引起强烈反应,则可省略 15 min 和/或 30 min 的接触时间段。在短期接触未产生皮肤刺激反应(至少评价至试验后 48 h)的情况下,在另外一个新的皮肤部位进行长期贴敷,包括 24 h 在内的封闭性贴敷,以保证能充分评估迟发型刺激反应。

长期接触试验时要将试验材料贴敷在未试验过的皮肤部位。

接触期结束后应除去残余的试验材料,采用水或其他不改变表皮当前反应或整体状况的适宜溶剂。

### E.3.3.4 短期接触

除了按 E.3.3.3 的描述逐渐增加应用时间外,如怀疑材料可能会导致严重的刺激反应,应减少接触时间,可在志愿者试点组进行试验。根据得出的数据能确定试验进程,随后再敷贴时应在  $(48 \pm 2)$  h、 $(72 \pm 2)$  h 读数后进行。

### E.3.3.5 临床观察和皮肤反应等级

检查敷贴部位是否有刺激反应迹象,在除去敷贴片后立即对反应分级,并分别在  $(1 \pm 0.1)$  h、 $(2 \pm 1)$  h、 $(24 \pm 2)$  h、 $(48 \pm 2)$  h 和  $(72 \pm 2)$  h 时进行分级。必要时测定反应的可逆性,观察期可超过 72 h。此外,应准确描述试验前后皮肤的状况(如色素沉着和水合程度)。按照表 E.1 对皮肤刺激反应分级并记录。

表 E.1 人体皮肤刺激试验分级表

反应描述	等级
无反应	0
微弱阳性反应(轻微红斑和/或接触区域大面积干燥)	1
中度阳性反应(明显的红斑或干燥,可能超出接触区)	2
重度阳性反应(重度及扩散性红斑伴水肿和/或焦痂形成)	3

有些志愿者在接触时间少于 4 h 时即产生 1 级或 1 级以上的反应,则可推知如接触试验材料 4 h 时将会出现更强烈的反应。志愿者一旦出现了 1 级或更严重的反应,就没有必要再进行试验,但可能还需继续进行观察,以对志愿者进行适当的护理。除了观察刺激反应外,还应对其他反应进行记录并充分描述。例如,在除去敷贴片后,应培训志愿者就敷贴接触发表意见(如感觉方面),并还应培训评估人员注意即时反应(如荨麻疹)。这些观察并不一定表明有刺激反应,但如果注意到了这些现象就应写入试验报告中。如果这些现象很明显,在试验中就应对此加以考虑,以保证志愿者得到适当的护理。

获得的判定数据是志愿者接触试验材料 4 h 时发生或预期发生皮肤刺激反应的数量。个体发生反应(如果有)所需的时间不作为评价结果的一部分,仅用于使志愿者能得到适当的护理。

### E.3.3.6 阳性对照物质选择说明

由于人体对刺激物的反应各异,所以试验应包括阳性对照,以确定试验组检测试验混合物刺激反应的适用性。最好使用 20% SDS 作为阳性对照,因其刺激作用已经过充分表征(见附录 F)。其他对照物经确认后也可使用。

可用常规阳性对照作为试验参照。皮肤刺激反应并非一种绝对现象,所有的材料都能引起皮肤刺激,只是取决于剂量多少和接触性质及程度大小的问题。因此,人体皮肤刺激试验一般要进行比较,并与已知的化学刺激性联系起来进行评价。

## E.4 数据和报告

### E.4.1 数据

应采用表格形式对包括阳性和阴性对照材料结果在内的数据进行总结,显示出除去敷贴片后(24±2)h、(48±2)h 和(72±2)h 时每个志愿者的刺激反应得分和观察到的任何其他反应。

### E.4.2 数据评价/解释

本试验的目的是测定材料在急性接触时是否具有明显的皮肤刺激潜在危险。因此,如果材料在受试者中引起皮肤刺激反应的频率等于或高于阳性对照,则认为该材料为明显的皮肤刺激物。此外,如材料在受试者中引起皮肤刺激的频率确实明显小于阳性对照,则不应认为是明显的皮肤刺激物。值得注意的是,不应将志愿者护理过程中产生的临时数据与终点数据相混淆,终点数据即指受试者显示刺激反应的比率。同时还要结合试验材料的一般性皮肤刺激潜力,注意不要混淆个别志愿者在皮肤刺激敏感性方面的差异。

### E.4.3 试验报告

试验报告应按照 ISO 14155 的要求,人体皮肤刺激试验具体报告应包括下列信息。

- a) 伦理方面的考虑和志愿者自愿的确认。
- b) 试验材料:
  - 1) 物理性质和相关的理化特性;
  - 2) 识别数据。
- c) 介质:
  - 1) 选择用于湿化某一固体试验材料的介质的识别和论证。
- d) 志愿者:
  - 1) 应用试验材料的志愿者的人数;
  - 2) 志愿者的年龄、性别分布情况。
- e) 结果:
  - 1) 在 0 h、(1±0.1)h、(2±0.2)h、(24±2)h、(48±2)h 和(72±2)h 时的反应率和在其他时间的反应得分;
  - 2) 每一观察时间段内每一志愿者的刺激反应数据列表[在除去敷贴片后(24±2)h、(48±2)h和(72±2)h 时刺激反应率的总结];
  - 3) 对观察到的所有刺激反应的描述;
  - 4) 对观察到的其他非刺激反应的描述;

- 5) 结果的统计学处理(与阳性对照的对比,如用 Fisher's 试验);
- 6) 如果在人体试验之前进行过体外或体内动物试验,应对其进行描述并加以参考,包括详细步骤、试验和参照材料试验结果。
- f) 结果讨论。
- g) 使用的国家标准(包括其出版年份)。
- h) 任何对试验方案的偏离。
- i) 观察到的任何异常表现。
- j) 试验日期。

## 附录 F

## (资料性)

## 刺激试验背景信息

由于体外模型的研发和更频繁使用人类志愿者,采用实验动物进行皮肤刺激试验一直在减少。生物工程或非侵入性、客观的测量方法被用来量化刺激反应,从而减少了对更主观的肉眼读数评判的依赖。最近,RhE模型在检测医疗器械浸提液中刺激性化学物的应用得到了评价。与OECD 439相比,对RhE模型进行了一些调整以使其适用于检测医疗器械浸提液中刺激物的(低)水平。同时,已经获取了数十年的用白兔进行Draize皮肤刺激试验的经验。该方法见OECD 404。在纱布敷贴片下将试验材料置于去毛后背部完好的部位。用3只兔子进行接触。敷贴片用胶带固定,动物的整个躯干用半封闭或封闭敷料包裹( $4\pm 0.5$ )h。4h后,移除敷贴片,清理试验部位,1h后对红斑和水肿的反应结果进行记分。(24 $\pm$ 2)h、(48 $\pm$ 2)h和(72 $\pm$ 2)h也要记分。

在小动物体上进行的皮肤刺激试验有助于鉴别出人体皮肤和/或黏膜组织的潜在刺激物。原发性刺激物是一种能导致皮肤炎症病变的材料,即一种以炎症为特征的直接损害反应,或是重度刺激、皮肤水泡和/或坏死症状。

在“化学物质毒效注册”(RTECS)中,大量使用兔的皮肤刺激试验资料证实,兔为首选实验动物。在超过2000例的RTECS试验结果报告中,有85%是使用兔,7.5%应用于人,4%使用小鼠,3%使用豚鼠。因此在公开文献中,大多数有效数据都是由兔试验所得。除非器械的预期用途指示,试验部位无需擦伤,因为本试验多年的经验表明擦伤部位与未擦伤部位之间的反应性是相同的。

皮肤刺激试验结果可能由于许多与试验相关因素的变化而发生改变,诸如试验对象、试验剂量、敷贴片尺寸、封闭程度、接触时间、介质、读数时间和读数质量等因素。因此,在人体皮肤刺激试验中包括已知的阳性和阴性对照材料是很重要的,这样可将试验材料与对照材料进行比较得出相应的结果。纯度 $\geq 99\%$ 的SDS是首选阳性对照材料,SDS是临床研究中应用最广泛的对照刺激物。见参考文献[5][17][29]。SDS容易获取到并且无其他不良作用。壬酸与SDS作用方式不同,也可用作阳性对照。见参考文献[27][28]。

SDS接触用于测定志愿者并作为一个参照点。按照欧盟准则(88/379/EEC,1988年6月7日的委员会指令),SDS被分类为皮肤刺激物。但是SDS达到或接近被视为皮肤刺激物的化学物临界水平并未明确。这样比起使用纯材料更适宜的方式是采用SDS的最低水平作为一参照点,目前至少有一个区域性组织(欧盟)将20%(质量浓度)的SDS水溶液看作明显的急性皮肤刺激物。见参考文献[30]。

兔眼刺激试验也已开发用于预测人眼的刺激性。Draize发表了有助于眼刺激反应评价的记分系统。作为眼损伤评价辅助的图示指南也已发表。

几种眼刺激体外替代试验已被评价。然而,单独的体外试验可能不能取代覆盖所有体内终点的体内眼刺激试验。尽管如此,在一个(分层)测试策略中,几种替代试验方法的策略性组合能够替代Draize眼试验。在EURL ECVAM工作组内,阐述了关于化学品(分层)测试策略的一个基本概念。该框架基于检测严重刺激物质(EU R41;GHS“第1类”)或非刺激性物质(EU“非分类”;GHS“未分类”)能力各不相同的眼刺激替代方法。根据这一框架,通过分层策略,可从任一端操作的方法去安排试验来解决整个刺激范围:先检测严重刺激物,解决无刺激问题(“自上而下方法”),或者相反地,先从非刺激物的识别开始(“自下而上方法”)。中度刺激性在两种方法的最后一层解决。

已经有很多基于与“眼刺激”终点有关的体外方法的 OECD 试验指南:OECD 437、OECD 438、OECD 460、OECD 491 和 OECD 492。这些测定化学品刺激性的指南基于经验证(通过 ICCVAM、EURL ECVAM、JaCVAM 或其他)的体外试验。这些指南描述了角膜混浊和渗透性测试方法(见 OECD 437),离体鸡眼试验法(见 OECD 438),使用在半渗透插入物上生长的细胞进行荧光素泄漏试验的方法(见 OECD 460)和由基于细胞毒性在融合的单分子层兔角膜上皮(SIRC)细胞上进行的体外试验组成的体外短时间接触试验方法(见 OECD 491),以及使用人重建角膜样上皮的试验,即所谓重建人类角膜样上皮(RhCE)试验(见 OECD 492)。这些 OECD 试验均未经医疗器械浸提液验证。

## 参 考 文 献

- [1] GB/T 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分:动物福利要求(GB/T 16886.2—2011, ISO 10993-2:2006, IDT)
- [2] ISO 9394:2012 Ophthalmic optics—Contact lenses and contact lens care products—Determination of biocompatibility by ocular study with rabbit eyes
- [3] ISO 10136-1:1993 Glass and glassware—Analysis of extract solutions—Part 1: Determination of silicon dioxide by molecular absorption spectrometry
- [4] ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- [5] Agner T., Noninvasive measuring methods for the investigation of irritant patch test reactions. A study of patients with hand eczema, atopic dermatitis and controls. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh.)*. 1992, 173 pp. 1-26
- [6] Alépée N., Tornier C., Robert C., Amsellem C., Roux M.-H., Doucet O. et al., A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic™ RhE) for full replacement of the Draize skin irritation test. *Toxicol. In Vitro*. 2010, 24 pp. 257-266
- [7] Casas J.W., Lewerenz G.M., Rankin E.A., Willoughby J.A.Sr, Blakeman L.C., McKim J.M. Jr et al., In Vitro Human Skin Irritation Test for Evaluation of Medical Device Extracts. *Toxicol. In Vitro*. 2013, 27 pp. 2175-2183
- [8] Coleman K.P., Grailer T.P., McNamara L.R., Rollins B.L., Christiano N.J., Kandárová H. et al., Preparation of irritant polymer samples for an in vitro round robin study. *Toxicol. In Vitro*. 2018, 50 pp. 401-406
- [9] De Jong W.H., Hoffmann S., Lee M., Kandárová H., Pellevoisin C., Haishima Y. et al., Round robin study to evaluate the reconstructed human epidermis (RhE) model as an in vitro skin irritation test for detection of irritant activity in medical device extracts. *Toxicol. In Vitro*. 2018, 50 pp. 439-449
- [10] Draize J.H., Woodand G., Calvery H.O.(1944), Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1944, 82 pp. 337-390
- [11] Draize J. H. Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs, and cosmetics, Austin, Texas, Association of food and drug officials of the United States, Texas State Department of Health, 1959
- [12] Faller C., Bracher M., Dami N., Roguet R., Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicol. In Vitro*. 2002, 16 pp. 557-572
- [13] Hagi-Pavli E., Williams D.M., Rowland J.L., Thornhill M., Cruchley A.T., Characterizing the immunological effects of oral healthcare ingredients using an in vitro reconstructed human epithelial model. *Food Chem. Toxicol.* 2014, 74 pp. 139-148
- [14] Horita K., Tomita C., Yasoshima M., Matsunaga K., Optimal evaluation time point for

patch testing to predict skin irritation of commercial topical drugs. *J. Dermatol.* 2015, 42 pp. 851-860.

[15] Kandárová H., Hayden P., Klausner M., Kubilus J., Kearney P., Sheasgreen J. (2009), *In Vitro Skin Irritation Test: Improving the Sensitivity of the EpiDerm Skin Irritation Test Protocol*. ATLA 37, 671-669, 2009

[16] Kandarova H., Willoughby J.A., De Jong W.H., Letasiova S., Milasova T., Bachelor M.A. et al. , *Pre-validation of an in vitro skin irritation test for medical devices using the reconstructed human tissue model EpiDerm™ Toxicol. In Vitro.* 2018, 50 pp. 407-417

[17] Kandárová H., Bendova H., Letasiova S., Coleman K.P., De Jong W.H., Jirova D., *Evaluation of the medical devices benchmark materials in the controlled human patch testing and in the RhE in vitro skin irritation protocol. Toxicol. In Vitro.* 2018, 50 pp. 433-438

[18] Lee C.H., Maibach H. I., *The sodium lauryl sulfate model; an overview. Contact Dermat.* 1995, 33 pp. 1-7

[19] Mosmann T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods.* 1983, 65 pp. 55-62

[20] Olsen D.S., Lee M., Turley A.P., *Assessment of test method variables for in vitro skin irritation testing of medical device extracts. Toxicol. In Vitro.* 2018, 50 pp. 426-432.

[21] Pellevoisin C., Tornier C., Bremond C., Rollins B., Briotet D., Turley A. et al. , *Skin irritation of medical devices; In vitro assay with EPISKIN reconstructed human epidermis (RhE). Toxicol. Lett.* 2016, 258 (S63) p. viii

[22] Pellevoisin C., Videau C., Briotet D., Grégoire C., Tornier C., Alonso A. et al. , *SkinEthiC™ RhE for in vitro evaluation of skin irritation of medical device extracts. Toxicol. In Vitro.* 2018, 50 pp. 419-425

[23] *SOP of in vitro skin irritation of medical devices extracts with SkinEthiC™ RhE. EPISKIN SA, Lyon (France), Available at <https://www.episkin.com/~media/Files/SOP-SkinEthiC-RhE-Irritation-Medical-devices>, 2018*

[24] *In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT). Protocol For use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm™ (EPI-200-SIT). MK-24-007-0023. Available at <https://www.mattek.com/wp-content/uploads/Medical-Devices-Testing-Protocol-201603010.pdf>[https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SIT-Skin-Irritation\\_MK-24-007-0023\\_10\\_02\\_19.pdf](https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SIT-Skin-Irritation_MK-24-007-0023_10_02_19.pdf), 2017*

[25] Nomura Y., Lee M., Fukui C., Watanabe K., Olsen D., Turley A., Morishita Y., Kawakami T., Yuba T., Fujimaki H., Inoue K., Yoshida M., Ogawa K., Haishima Y., *Proof of concept testing of a positive reference material for in vivo and in vitro skin irritation testing. J Biomed Mater Res B Appl Biomater,* 2018, 106(8) pp. 2807-2814

[26] Scott L., Eskes C., Hoffmann S., Adriaens E., Alepée N., Bufo M. et al. , *A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. Toxicol. In Vitro.* 2010, 24 pp. 1-9

[27] Wahlberg J.E., Wahlberg E.N., *Quantification of skin blood flow at patch test sites. Contact Dermat.* 1987, 17 pp. 229-233[25] Wahlberg J.E., Mailbach H.I., *Nonanoic acid irritation—A*

positive control at routine patch testing? *Contact Dermat.* 1980, 6 pp. 128-130

[28] Wahlberg J.E., Mahlberg H.I., Nonanoic acid irritation—A positive control at routine patch testing? *Contact Dermat.* 1980, 6 pp. 128-130

[29] Walters R.M., Khanna P., Hamilton M., Mays D.A., Telofski L., Human Cumulative Irritation Tests of Common Preservatives Used in Personal Care Products: A Retrospective Analysis of Over 45 000 Subjects. *Toxicol. Sci.* 2015, 148 pp. 101-107

[30] York M., Griffiths H.A., Whittle E. et al. , Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential, *Contact Dermatitis*, 1996, 34, pp. 204-212

[31] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre Eye irritation testing, Monograph 11, Brussels, Belgium, 1988

[32] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines for testing of chemicals No. 405, Acute eye irritation/corrosion. OECD Publications, Paris, 2017

[33] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines for testing of chemicals. No. 430, In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER). OECD Publications, Paris, 2015

[34] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Test No. 431: In vitro skin corrosion; reconstructed human epidermis (RhE) test method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, 2019

[35] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guidelines for testing of chemicals. No. 437. Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. OECD Publications, 2020

[36] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, 2018

[37] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines for testing of chemicals. No. 460. Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. OECD Publications, Paris, 2017

[38] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Test No. 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, 2020.

[39] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, 2019

[40] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment, No. 34, OECD Publishing, Paris, 2005

[41] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia 2016. London: TSO; 2016

[42] European Pharmacopoeia, 10th Edition, European Pharmacopoeia, Council of Europe, B.P. 907, F-67029 Strasbourg, France, 2019

[43] United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2020

[44] Commission Regulation (EU) 2019/1390 of 31 July 2019 amending, for the purpose of its adaptation to technical progress, the Annex to Regulation (EC) No 440/2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) (Text with EEA relevance) OJ L 247, 26.9.2019

---







中华人民共和国  
国家标准  
医疗器械生物学评价  
第23部分：刺激试验

GB/T 16886.23—2023/ISO 10993-23:2021

\*

中国标准出版社出版发行  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

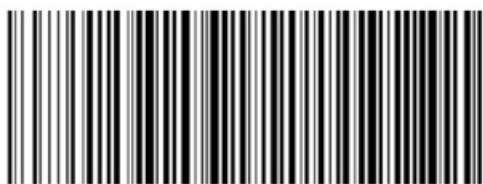
服务热线: 400-168-0010

2023年11月第一版

\*

书号: 155066 · 1-74232

版权专有 侵权必究



GB/T 16886.23-2023