

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、光变态反应）
研究的技术指导原则
（第二稿）

二 00 四年三月十八日

目 录

[概述]	4
一、 定义	4
二、 背景	5
三、 适应范围	6
四、 重点内容	6
[基本内容]	6
一、 基本原则	6
二、 过敏反应	7
(一) 试验中应考虑的问题	7
(二) I型过敏反应	7
1. 定义	7
2. 主动皮肤过敏试验	8
3. 主动全身过敏试验	8
4. 被动皮肤过敏试验	8
5. 抗体滴度检测	9
(三) II、III型过敏反应	9
(四) IV型过敏反应	10
三、 光变态反应	10
(一) 皮肤光变态反应试验	11
(三) 光变态反应试验中应考虑的问题	11
四、 数据分析及评价	12
五、 常见问题及处理	13
六、 不同剂型的中药、天然药物的一般要求	15
[参考文献]	16

[附录]	17
一、 主动皮肤过敏试验	17
二、 主动全身过敏试验	19
三、 被动全身过敏试验	20
四、 III型过敏试验	22
五、 IV型过敏试验	22
(一) Buehler分析和豚鼠最大值法	22
(二) 啮齿类局部淋巴结试验	23
六、 皮肤光变态反应试验	25
[起草说明]	26
[著者]	29

中药、天然药物免疫毒性（过敏性、光变态反应） 研究的技术指导原则

[概述]

一、定义

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。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，超敏反应（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，分布在皮肤中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。

二、背景

从 70 年代后期开始,欧美等先进国家开始研究药物对机体免疫系统的毒性研究。90 年代以来,逐渐将免疫毒性作为药物安全性评价的一项重要内容。随着中药走向世界,许多高新技术也广泛应用于中药新药的研发过程,其研究内容也日趋与国外化药新药研究接轨。中药作为一种外源性化学物质,进入机体后,同样对机体免疫系统产生不同程度的毒副作用。在中药新药研究过程中,研究其对机体免疫系统的影响及机理,是中药临床前安全性研究及评价的一项重要内容。以往中药新药的安全性研究中,很少关注或检查免疫系统,故也极少发现受试物的免疫毒性作用。因免疫系统方面的功能改变能在某种意义上预示药物的不良反应,且免疫系统对毒物具有很高的敏感性。因此,需在新药评价过程中,逐渐建立一套评价方法,在常规的安全性研究中探索并发现药物的免疫毒性以及及引起的免疫系统的功能性改变等。

传统观念认为,中药平和、安全,但近年来,伴随中药及其新制剂的不断增多,如注射剂品种的不断增多,使用范围的日益扩大,由中药引起的不良反应特别是变态反应也在逐年增多。以下几方面可能是导致中药变态反应发生的主要原因:(1)中药自身的特点:中药成分复杂,按生理活性可分为有效成分、辅助成分、无效成分、组织物及杂质等,其中不乏有导致机体的过敏物质,如动、植物蛋白,多肽,多糖等大分子物质,它们同时具有免疫原性和反应原性,属于完全抗原,可直接刺激机体免疫系统产生免疫应答,使机体产生抗体或致敏淋巴细胞,最后导致变态反应;一些小分子化学物质属于半抗原,进入人体后与蛋白质结合成完全抗原而致敏。(2)中药及其制剂中的致

敏原，除药物本身成分外，其制剂中的添加剂、助溶剂、稳定剂、着色剂、稀释剂及在制备过程中产生的杂质和药物本身的氧化、还原、分解、聚合等形成的杂质均能成为过敏原而致机体过敏，从而诱发各种类型的变态反应。(3)中药复方制剂：复方制剂包含多种不同药物，混在一起制成煎剂、注射剂、丸剂及外用制剂等。各种药物成分在体外就有可能发生相互作用，进入体内后在消化、吸收及体内转化过程中，也会有互相作用发生，这无疑也会成为发生超敏反应的原因。鉴于此，中药免疫毒性特别是变态反应的研究是不可忽视的临床前安全性评价的重要内容之一。

三、适用范围

该技术指导原则适用于拟用人和/或已上市的中药、天然药物的免疫毒性研究。这些药物指非口服给药途径的中药、天然药物，包括中药注射剂及其他局部用药的制剂。

四、重点内容

本技术指导原则的重点内容主要包括免疫毒性评价中的过敏反应试验和光过敏试验内容。

[基本内容]

一、基本原则

免疫毒性研究必须执行《药品非临床研究质量管理规范》(GLP)。

在进行试验设计中，应遵循随机、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，充分考虑和结合药理学、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

（一）试验中应考虑的问题

中药、天然药物应进行何种变态反应研究，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，如注射剂需进行全身主动过敏试验和皮肤被动过敏试验，透皮吸收剂需进行皮肤主动过敏试验等。

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，如皮肤主动过敏试验、全身主动过敏试验、皮肤被动过敏试验、小鼠耳廓肿胀试验（MEST）、啮齿类局部淋巴结实验（LLNA）、Buehler 分析法、豚鼠最大值法（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。

过敏试验均应设立阳性对照和阴性对照。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。

过敏试验中的受试物应能充分代表临床试验受试物和上市药品，因此受试物应采用制备工艺稳定、符合临床试用质量标准规定的样

品，一般用中试样品，并注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等。如不采用中试样品，应有充分的理由。如果由于给药容积或给药方法限制，可采用原料药（提取物）进行试验。试验中所用溶媒或赋形剂应标明批号、规格、生产厂家。

（二）I 型过敏反应试验

1、定义

I 型超敏反应又称速发型，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，当同一变应原再次进入机体后，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 型超敏反应通常用皮肤主动过敏试验（ACA）、全身主动过敏试验（ASA）和皮肤被动过敏试验（PCA）等考察，对于吸入途径药物常采用呼吸道敏感性检测。

2、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。

本试验的目的就是要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。

3、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。

本试验的目的即观察受试物给药后对动物引起的过敏反应。

中药注射剂引起的过敏反应临床上较多见，尤其是引起全身性过敏反应，甚至过敏性休克等非常严重的副反应。因此，中药注射剂全身主动过敏试验更显得有特殊意义。

4、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。

5、抗体滴度测定

IgE 是引起 I 型变态反应的主要原因，检测血清或体液中的 IgE 水平对明确是否存在 I 型变态反应和认识药物诱发变态反应的机制具有重要意义。

当过敏试验出现阳性或可疑阳性，以及一些具有潜在致敏性的物质，建议进行本试验。

6、试验方法

可参见附录中试验方法。

（三）II型和III超敏反应

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。

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。

可参照附录中的试验方法。

(四) IV 型过敏反应试验

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。

可参照附录中的试验方法。

三、光变态反应 (光过敏反应) 试验

光敏反应 (photosensitivity reactions) 是用药后皮肤对光线产生的不良反应, 包括光毒反应 (phototoxic reactions) 和光变态反应或光过敏反应 (photoallergic reactions) 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。

本试验的目的为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。

（一）皮肤光变态反应试验

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。光变态反应属 IV 型（迟发型）变态反应。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。

可参照附录中的试验方法。

（二）光变态试验中应考虑的问题

1、动物选择

建议首选白色豚鼠或家兔。

2、照射光源及波长的选择

可采用氙灯、石英灯或混合光源（包括 UVA 和 UAB）或单纯紫外光源（UVA）。波长宜包括中、长波紫外线 280-400nm 波段，因结

构不同的药物敏感波长不同，应利用对不同受试物敏感的波长段进行试验。通过预试验，对照射剂量、光强度和照射时间及照距等进行确定。

3、受试物

对受试物的要求同过敏试验。

建议选用临床用药浓度（或等效剂量），光变态反应激发浓度可用适当稀释的浓度，以除外光毒反应。

4、阳性光感对照物

光变态反应可选用溴化水杨酰苯胺。

5、给药时间

光照前应尽量保证受试物及对照物有足够的时间穿透皮肤角质层，以与表皮细胞发生作用，一般在 60min 左右为宜。

6、结果表述

光敏试验的主要环节均应以照片记录及表示。

7、试验系统

完善的光敏反应评价系统是评价药物光敏反应的基础。合理的评价系统应依据药物的光敏反应机制，由体外光化学模型、体外生物学模型及实验动物模型共同组成。在光化学反应模型中利用不同波长的 UVA 照射，先确定受试物发生光敏反应的最敏感波长，以为进一步的生物学评价奠定基础。

四、数据分析及评价

（一）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、死亡动物数及病理组织学检查结果，并提供相应的照片，以利用对结果的分析 and 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病理组织学检查）

(二) 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。

(三) 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。

(四) 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。对试验结果应进行综合评判, 方可对中药新药是否具有免疫毒性做出合理正确的结论。

(五) 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。

(六) 免疫抑制与肿瘤的关系复杂而有争议。在大多数情况下, 若在长期毒性试验中发现了肿瘤发生率升高, 这种作用可能与遗传毒性、激素作用或其他明确的机理相关。然而对一些受试物, 致癌作用不易在非临床试验中发现, 在此情况下应考虑具有免疫抑制的潜在作用。

五、常见问题及处理

(一) 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

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,进行II-IV型过敏反应试验。

(二)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(pseudoallergic reaction),也称为类变态反应(anaphylatoid reaction)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。在中药不良反应的分析资料中,符合变态反应临床诊断标准者高达40%~66%,但通过对发病有关因素的分析可发现,这些“变态反应”中有不少发生于第一次用药,即无用药治疗史,缺乏致敏的机会,于第一次用药时引发I型过敏反应,此种情况多发生于中药注射剂用药浓度过高和给药速度过快时。对此种情况建议引起足够的重视,因它具有潜在的危险性,应在临床前安全性评价中加强相关研究。

(三)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。外用中药也易引发变应性或刺激性,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。

(四)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。

(五)中药注射剂宜单独使用,应尽量避免多种药物联合应用。若临床拟订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。

(六) 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,为严重变态反应的体外检测打下基础。此外,应重视中药间的相互作用及交叉过敏的试验研究。

(七) 免疫毒性评价中,试验动物结果外推到人时会遇到许多问题,即动物试验资料在安全性评价中存在其以下局限性:(1)动物试验往往在较高的剂量下进行,且接触时间较短,因此用动物试验资料进行安全性评价时存在高剂量向低剂量、短时间暴露向长时间暴露的外推问题。(2)动物在遗传背景、组织结构、生理功能等方面与人有较大种属差别。(3)动物试验中免疫功能检测的细胞通常来源于免疫器官(脾脏、胸腺、淋巴结等),所得结果可较好地预测受试物对免疫系统潜在的影响;但人群免疫功能检测其细胞主要来自外周血,在外周血中淋巴细胞数仅是淋巴细胞总数的1%。不仅是数量上的差异,不同来源的细胞处在不同的发育阶段,反应不同,所得的结果也不完全相同。

综上,尽管免疫毒性检测在安全性评价中尚有许多问题,但在新药的毒理学研究中仍应加强免疫毒性检测的内容,以对新药的安全性做出全面的评价。此外,也因人群免疫毒理学研究中存在的下述困难,决定了动物免疫毒理学评价的重要性。(1)在人群中观察到免疫功能损伤需要的时间较长,因人群接触的剂量较低,也难以观察到剂量-反应关系。(2)人群免疫毒理学研究中缺乏特异性指标,往往用非特异性指标,故需要足够的观察例数。(3)对免疫功能检测结果评定时缺乏正常值或参考值。有时检测结果在参考值范围内,但与对照组有明显的升高或降低,应如何评价?与疾病发生的关系等也需要进一步研究。(4)人群免疫毒性检测也缺乏非损伤性方法。

六、不同剂型的中药、天然药物试验项目的选择

(一) 静脉注射剂：应进行全身过敏性试验、皮肤被动过敏试验等，必要时需进行抗体滴度测定，以及Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型变态反应试验。

(二) 肌肉注射剂：应进行全身过敏性试验，皮肤被动过敏试验。

(三) 皮肤给药制剂：应进行皮肤过敏性试验，必要时需进行光敏性试验。

(四) 中药、天然药物超敏反应与制剂种类密切相关，相同成分不同中药制剂的超敏性等可能明显不同，特别是对超敏研究预试验结果提示有一定超敏作用的药物，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。

(五) 应根据药物的特殊性，可进行试验项目的调整。需考察刺激性和溶血性试验的相关制剂，应参照局部刺激性和溶血性指导原则进行。

[参考文献]

1. 皮肤用药的毒性试验. 《中药新药研究指南》 中华人民共和国卫生部药政管理局 1993年 209-212
2. 皮肤用药毒性试验. 袁伯俊, 王治乔主编. 《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. 徐叔云主编. 《药理实验方法学》(第三版) 226
5. Principles and methods of Toxicology. Fourth edition, edited by A. Wallace Hayes, Taylor & Francis, Philadelphia. 2001.
6. FDA; Guidance for Industry Immunotoxicology Evaluation of Investigational New Drugs
7. 龚诒芬. 免疫毒性检测指标的敏感性与预测分析. 卫生研究. 1995, 24 (特辑): 12-14

8. 薛彬, 龚诒芬. 免疫毒性与安全评价. 卫生毒理学杂志. 1989, 3(1): 53
9. 乔赐彬, 李云波. 免疫毒理学常用方法及其评价. 国外医学卫生学分册 1987, 6: 329
10. 王红星. 用 Beagle 犬观察中药注射剂过敏反应的体会. 中药药理与临床. 2002, 18(2): 8
11. 张建英, 祁丕东, 杨平. 中药注射剂致过敏反应初探. 临床药学. 2002, 11(2):64
12. 赖宇红, 陈浩桢, 杨卫荣. 中药注射剂变态反应研究函待加强. 中药新药与临床药理. 2002, 13(5): 324-326
13. 王倩, 张艳丛, 解丽君, 等. 我国 1990-1999 年中药不良反应的文献分析. 中国药房. 2000, 11(5): 226
14. 陈琳, 贾战生, 林永信, 等. 血清 IgE 水平检测及变应原皮试诊断 I 型变态反应的意义. 第四军医大学学报. 2001, 22(4): 344-346

[附录]

一、主动皮肤过敏试验

(一) 动物选择

建议选用豚鼠。给药前背部两侧脱毛，脱毛区应不小于 $3 \times 3 \text{cm}^2$ 。

(二) 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。

(三) 对照设置

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）。

（四）给药范围及停留时间

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。

（五）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。

（六）结果描述

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

（七）结果判断

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
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
无红斑	0

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、主动全身超敏试验

（一）动物选择

常选用豚鼠。做过敏试验后的豚鼠不能再进行重复应用。

（二）受试物

大部分受试物进行过敏试验时，可直接用受试物本身作为致敏液，某些产品可用其原料的半水解物或受试物与佐剂 1: 1 的混合液作为致敏原，以提高试验灵敏度。

（三）致敏

致敏时常选择容易产生抗体的方法，如皮下、腹腔或肌肉注射等。如给豚鼠隔日肌肉注射受试物 0.5ml，共 3-5 次。

（四）剂量设置

通常设置两个剂量组，低剂量一般采用临床拟用量的最高剂量，高剂量组为低剂量组的数倍。

（五）攻击

分两组，分别于首次注射后第 14-21 天一次攻击。攻击途径通常采用静脉注射途径，以致敏剂量的 2-5 倍经静脉，观察注射后有无过敏症状。若采用其他给药途径常引起脱敏。

（六）对照设置

试验应设立阳性对照药组、赋形剂对照组等，阳性对照药可选用 1-5mg/只的牛血清白蛋白或卵蛋白或其他已知的致敏阳性物质。

（七）结果判断

根据表 3 观察过敏反应症状。

攻击注射后，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，观察有无由于药物作用引起的类似过敏反应症状，以供结果判断时参考。

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。

（八）判断标准

可根据表 4 评价标准判断过敏反应强弱。一无症状；+不安、哆嗦、搔鼻、喷嚏、排尿、呼吸急促等；++除上述症状外，呼吸困难和运动障碍；+++除上述症状外，呼吸衰竭直至痉挛，但可恢复；++++死亡。

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 立毛	9 排粪	16 喘息
3 发抖	10 流泪	17 痉挛
4 搔鼻	11 呼吸困难	18 横转
5 喷嚏	12 罗音	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
1-10 症状	++	过敏反应阳性
1-19 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

(一) 试验动物的选择

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。选择动物时应注意 PCA 反应是由 IgE 介导的。

(二) 试验分组

应设立阴性、阳性对照组和受试物 2 个剂量组。阴性对照组应给予同体积的溶媒，阳性对照组给予卵白蛋白或天花粉或已知致敏阳性药物。

(三) 致敏途径及方式

应按临床拟给药途径。隔日致敏一次，共 3-5 次。末次致敏后 10 天左右采血，制备抗血清。

(四) 试验方法选择

可采用大鼠同种被动皮肤过敏试验、小鼠被动皮肤过敏试验或小鼠耳异种皮肤过敏试验。

(五) 试验操作

将各组合 IgE 的抗血清分别用生理盐水稀释成不同倍数(通常采用 1:10-1:50 稀释度)，在动物背部脊柱两侧脱毛区皮内注射各对应组的抗血清，24 或 48 小时后，各组动物进行抗原攻击，静脉注射与致敏剂量相同的激发抗原(含 0.5-1% 的伊文斯蓝染料)，30 分后将动物处死，摘出背部皮肤，测量皮肤内侧的蓝色反应斑直径，同时拍摄照片。或用比色法测定

(六) 评价方法

有两种方法，一种是呈阳性反应的最高稀释倍数的抗体效价为指标。另一种是固定的血清稀释倍数后以色斑的大小或光密度值为指标。直径在 5mm 以上者判定为阳性。应提供蓝斑照片。

(六) 蓝色反应斑的测定

色斑大小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。

四、III型超敏反应

引起III型超敏反应的抗原需持续存在，以利于与相应抗体结合形成免疫复合物。可采用家兔(最易形成 Arthus 反应)或大鼠 Arthus 反应试验进行评价。将受试物或阳性药卵白蛋白和 Freund's 完全佐剂给家兔每周肌肉注射 1ml，共 4 次。末次注射后第 10 天，背部剪毛后皮内注射受试物或 1%卵白蛋白，每点注射 0.2ml，抗原攻击后 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 小时观察每点局部皮肤红肿的最大直径与反应程度，求平均值。反应程度按分级进行分析、判断。

受试物的给药途径和给药时间由受试物的药效学、临床拟用药情况等特点决定。

五、IV型超敏反应试验

(一) Buehler 分析和豚鼠最大值法 (GPMT)

试验动物皮内或涂皮给予诱导剂量，经过 10-14 天的诱导期，此时免疫反应发生，然后给予激发剂量，以观察是否出现了过敏反应。在诱导期和攻击期的皮肤反应及其程度均应进行对比，并与伪处理组

进行比较。

1、实验动物

最好选择年轻成年的豚鼠。动物数量和性别取决与所选择的试验方法，两种性别均可使用。如果使用雌性动物，应选择未产和未孕的动物。Buehler 试验试验组不少于 20 只、对照组不少于 10 只。GPMT 试验试验组不少于 10 只、对照组不少于 5 只。

2、对照

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。为确保激发反应源于过敏性而非刺激性，应设立溶剂对照组，所选择的溶剂应不干扰或改变试验结果的判断。

3、给药剂量

取决与所选择的方法。Buehler 试验中，致敏剂量应足够高，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。GPMT 试验中，致敏剂量应足够高以产生轻 - 中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、结果观察

皮肤反应应分级并在方法学所确定的激发时间进行判定和记录，一般为 24 和 48 小时。对于异常的反应，应相应地调整时间。应记录开始和结束时动物的体重。

5、试验步骤

5. 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 天在未给药的胁腹部贴 6 小时以局部激发。去除封闭片 24 和 48 小时后观察结果。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。

5. 2 GPMT 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 小时后观察结果。同 Buehler 试验一样，如果结果难以判定，一周后再次激发，如果初试选择的动物数量只有 10 只而结果难以判断，应再增加 10 只试验动物和 5 只对照动物。

6、数据分析

试验数据建议以表格的形式整理，包括每一动物的皮肤反应，根

据方法所确定的诱导和激发的时间。至少应该包括红斑和水肿的分级资料和异常反应的记录, 提供每一组过敏的比例和每一动物过敏程度(轻、中、重)。

(二) 啮齿类局部淋巴结试验(LLNA)

产生皮肤过敏的受试物可刺激所管辖的淋巴结内的淋巴细胞增生, 在合适的条件下, 这种增生与剂量成比例。该项试验可客观、定量的对受试物引起的过敏反应进行评价。

1、试验动物

应选择8-12周CBA/Ca or CBA/J系雌性小鼠(未产和未孕), 按年龄配对(最好相差不到一周)。

2、受试物的制备

固体受试物使用前应用合适的溶剂或赋形剂溶解和稀释。液体受试物可直接进行试验和稀释以后使用。

3、溶剂选择

根据受试品的最大浓度选择溶剂, 推荐的溶剂有丙酮/橄榄油(4:1 v/v), N, N-二甲基甲酰胺, 丁酮, 丙烯, 乙二醇, 二甲亚砜, 其它合适的溶剂也可以选择。所选择的溶剂应不干扰试验结果的评价, 其最大浓度应能达到该物质的最大皮肤暴露浓度, 应尽量保证亲水性物质能润湿皮肤并不立即挥发。

4、对照

应设立阳性和阴性对照组。阳性对照应保证方法的可行性, 阳性对照物在合适的暴露水平应能产生阳性结果(刺激指数(SI) ≥ 3 , 刺激指数是受试组 ^3H -甲基胸腺嘧啶脱氧核苷或 ^{125}I 碘苷(^{125}IU)进入淋巴结的量与溶剂对照组的比率), 优先选择的阳性对照物为桂皮醛和巯基苯并噻唑, 其它合适的对照物也可以选择, 氨基苯甲酸乙酯应尽可能避免。阳性对照物应该溶解在能引起一致反应的溶剂里(如丙酮/橄榄油), 以使其产生持久的反应。如果选择的是非标准的溶剂, 此溶剂必须在评价结果前, 首先进行LLNA试验。

5、试验方法

应至少设立三个剂量。剂量的选择可参考毒性, 溶解性, 刺激性,

结构 - 活性关系和其它试验结果等信息。为避免假阴性，应选用尽可能高的浓度。最大浓度应避免明显的系统毒性和过度的局部刺激，LLNA 的结果为阴性时，同时进行的阳性对照相对于阴性对照的 SI 必须大于 3。

6、实验步骤

第 1 天于每鼠耳廓背部涂抹受试物 25 μ l，连续 3 天。第 4 和第 5 天无处理。第 6 天由每鼠的尾静脉注射包含 20 μ Ci 3 H - 胸腺嘧啶脱氧核苷或 2 μ Ci 125 IU 和 10^{-5} M 氟脱氧尿嘧啶核苷的 PBS 250 μ l。5 小时后，取小鼠耳部淋巴结置于 PBS 溶液中，用 200 网的不锈钢滤网过滤制成淋巴结细胞（LNC）单细胞悬液，用 PBS 洗 2 次，5% 三氯醋酸中 4 $^{\circ}$ C 沉淀 18 小时后提取 DNA。 3 H - 胸腺嘧啶脱氧核苷测定：沉淀用 1ml TCA 分散，转入 10ml 闪烁液体中，用 B - 闪烁计数器读取数据并以每分钟衰变数/只小鼠表示；对于 125 IU 法，1ml TCA 沉淀直接转入 gamma 计数器计数并以每分钟衰变数/只小鼠表示。

7、结果观察

每天最少观察一次，包括局部的刺激性和全身毒性作用等，在给药前和尸解时称重，以有助于判断系统毒性。

8、评价和计算结果

淋巴结细胞的增生反应用除去背景值后的每一动物每分钟放射性元素蜕变率来表达。应计算每组平均值和标准差。最后的结果以 SI 表示，SI = 试验组的平均衰变率 / 溶剂对照组的平均衰变率。除了评价 SI 的比值外，还应对量 - 效关系进行统计分析（如 ANOVA）并对 SI 进行配对比较。

9、数据分析

至少在一个浓度下，试验组 SI \geq 3，可视为 LLNA 试验阳性，可认为该药物为皮肤过敏剂。然而 SI 的大小不是唯一的评价指标，应对每一个体的数据进行统计学分析，以提供全面的评价。影响评价的因素包括 SI 的确定、统计分析、量效关系的强度、化学毒性、溶解性、溶剂和阳性对照的一致性。

强烈的刺激性可通过产生显著的淋巴细胞增生而导致 LLNA 试验出现假阳性，但由于刺激性导致的淋巴细胞增生量效关系范围窄，

因此量效关系可以帮助判断强刺激反应，同时结合耳廓部位肿胀情况可以帮助从强刺激性中区分出弱的过敏反应。应详细报告实验方法，列表记录各组每只动物的每分钟衰变数/只小鼠、SI 值及他们的平均值和标准差、毒性症状，说明量效关系。

六、皮肤光变态反应试验

(一) 最小红斑量 (MED) 的确定

在动物脊柱脱毛范围内 (面积)，在固定光源和距离下，以长波紫外线分档累计光照法照射，确定最小红斑量 (MED)。

(二) 致敏

于脱毛区 ($2 \times 4 \text{cm}^2$) 四角各注射弗氏完全佐剂各 0.1ml。并于脱毛区涂 20% 十二烷基硫酸钠溶液，再将受试物涂于该部位，一定时间后拭去表面残留药物。阳性对照药可选用溴化水杨酰苯胺。

(三) 照射

以 280-400nm 波长紫外线照射涂药部位，以产生显著红斑为准。隔日重复涂抹十二烷基硫酸钠和给受试物，并照射涂药部位的步骤，共 5 次。

(四) 激发

于末次致敏后 2 周，在准备的皮肤区再次涂药，浓度宜低于致敏浓度，以免刺激和光毒反应。光照前应尽量保证受试物及对照物有足够的时间穿透皮肤角质层，以与表皮细胞发生作用，一般在 60 分钟左右为宜。光照时以不引起红斑反应的 $1/2-2/3$ MED 的亚红斑量紫外线照射。

(五) 结果判断

照射后 1-72 小时内观察皮肤反应。凡与受试物多次接触并在紫外线照射后出现皮肤炎症、甚至全身反应者，均可认为是该受试物引起光变态反应的光感物质。

[起草说明]

一、关于起草本指导原则的重要性的意义

近年来，中药及其新制剂的不断增多，使用范围的日益扩大，由中药引起的不良反应及药源性疾病也在逐年增多。其中变态反应约占近70%，变态反应类型也是多方面的，其中以皮肤过敏反应最为常见，以过敏性休克最为凶险。但中药引起的变态反应在不良反应中的重要性，也并非仅由于它占有多大比重，而是因为它与抗生素及其它化学药物的变态反应一样，其发生难以预测，且有些反应危重，甚至导致死亡。因此，重视中药制剂，特别是中药注射剂，包括单方、复方中药注射剂和含动、植物蛋白中药注射剂的安全性评价具有重要意义。此外，因中草药以现代制剂形式，特别是注射剂的形式用于治疗疾病还缺尽可能多的试验资料，如对其有效成分的和无治疗作用成分的确认及其化学分析、药理学特性、毒副作用、致敏力及与其它成分间的相互作用等还缺乏足够的深入细致的基础研究。因此，要做到合理应用还有不少问题需要解决。

因此，本指导原则旨在阐明进行免疫毒性研究特别是过敏试验（变态反应试验）的目的、意义、重要性和必要性，以及如何通过更合理、客观的试验研究或手段发现或揭示中药新药的不良反应，指导临床安全用药。

二、关于免疫毒性评价指标及系统的确立

为提高免疫毒性检测水平，应建立灵敏、特异、可靠、简便的检测方法。目前许多国家都已建立了适合于本国免疫毒性的检测方案，但这些方案的检测项目及内容还在不断的变化与更新，我国也应根据不断发展的情况，在试验研究的过程中不断完善免疫毒性评价的方法。应建立什么样的评价系统和指标是需要进一步讨论的问题。建议除对全身的免疫毒性检测外，也应十分重视局部免疫损伤，如肺部、

肠道系统、肝、肾、皮肤等局部免疫毒性的评价方法，以期对外源化合物经不同途径进入体内，对全身及局部免疫系统的影响做出全面的评价。

三、关于加强中药注射剂超敏反应基础研究的问题

由于中药成分复杂，药理作用机理不甚明了，注射剂生产工艺不尽严格，质量标准尚不能完全控制其内在的诸多成分，且现行的质量标准中的安全性试验（如热原、溶血、异常毒性等）很少列入动物致敏性试验，因此，对一些可能出现安全性隐患的药物是否需将动物致敏试验列入质量标准中，实行批检，其必要性和可行性如何。因目前临床前毒理学研究中的动物过敏性试验的高阴性结果与临床高阳性结果的不相关性的存在，即过敏性试验因存在显著的种属差异影响到动物试验外推到人的评价，故应如何要求进行相应的基础研究。此外，鉴于中药注射剂临床应用不良反应特别是变态反应的较多存在，因具有作用发生快、后果严重等特点，是否应要求进行剂型选择的可行性论证，特别是将传统中药的口服改为静脉给药的制剂，应明确注射剂是否的确优于口服制剂，尤其是静脉滴注液。

四、关于如何选择超敏反应试验方法的问题

在何种情况下要求进行 I、II、III、IV 型超敏反应试验，应根据药物自身特点具体问题具体分析。如中药复方注射剂，含动、植物蛋白的中药注射剂，应建议要求进行四种变态反应试验，必要时进行抗体滴度的测定等。应在何种试验中进行上述试验的问题，建议 II、III 型变态反应试验可在长期毒性研究中进行，皮肤给药的药物必要时进行 IV 型变态反应试验。

五、关于皮肤被动过敏反应试验中动物种属的选择问题

介导各种动物的 PCA 反应的抗体有两类：一为 IgG 类抗体，其与组织细胞亲和力不强，大约在注射后 10 小时内即从局部皮肤消失，主要介导 2-4 小时的 PCA 反应；另一为 IgE 抗体，它与组织细胞有较强的亲和力，注射后至少可存留 2 天，介导 24-72 小时的 PCA 反应。外源性支气管哮喘是属于 IgE 介导的速发型变态反应，动物 24-72 小时 PCA 反应也是由 IgE 类抗体介导的，两者相似。

以往的研究资料中多采用豚鼠进行皮肤被动过敏反应试验。但现有的资料中提到因豚鼠的 PCA 反应主要是由 IgG 介导的，故不主张用豚鼠进行该项试验，建议用大鼠、小鼠或家兔进行。但由于豚鼠也可产生 IgE 抗体，故若采用豚鼠进行研究，建议应充分考虑到其 IgE 产生的时间对试验的影响问题。

[著者]

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