附件6

口腔黏膜刺激试验方法

Oral mucous irritation test

1 范围

本方法适用于评价牙膏对口腔黏膜组织潜在的刺激作用。

2 试验目的

确定和评价牙膏对动物口腔黏膜组织是否有刺激作用及其程度。

3 定义

口腔黏膜刺激 oral mucosa irritation

口腔黏膜组织接触受试物后所产生的水肿、炎性变化及组织损伤等反应。

4 试验的基本原则

将受试物置于受试动物的一侧颊囊内，对照物置于另一侧颊囊内，在规定的时间间隔内多次接触，肉眼观察并记录动物颊囊接触部位的刺激程度，并于末次接触后24小时取材进行组织学评价。

5 试验方法

5.1 试样

5.1.1 受试物：受试物直接使用，单次放置量为0.4 g或0.4 mL。

5.1.2 对照物：0.9%氯化钠注射液（生理盐水），用量同受试物，直接使用。

5.2 实验动物和饲养环境

5.2.1 健康的SPF级金黄地鼠（拉丁学名：Mesocricetus auratus），6 ~8周龄。同一品系，雌雄不限，雌性动物应未孕。

5.2.2 至少使用3只动物。

5.2.3 试验前动物应在实验动物房环境内至少适应3天。实验动物及实验动物房应符合国家相关规定。选用标准配合饲料，饮水不限制。

5.3 试验步骤

5.3.1 动物准备与麻醉

用适当的麻醉剂麻醉动物，检查动物双侧颊囊有无异常（剔除颊囊黏膜异常的动物）。翻转动物颊囊用生理盐水或蒸馏水清洗干净后进行试验。

5.3.2 试样接触

5.3.2.1 将受试物置于动物一侧颊囊底部，对照物置于另一侧颊囊底部。试样与黏膜接触5 min，接触时间结束后将颊囊翻出，去除试样，用生理盐水或蒸馏水清洗接触部位，清洗时间一般为1 min~2 min，直至将试样完全清除。重复上述操作4次，每次操作间隔1 h（含接触与清洗时间）。每次重复放置试样前肉眼检查颊囊，并记录异常情况。末次接触后的24 h肉眼观察颊囊并取与试样接触的颊囊组织进行组织学评价。

5.3.2.2 在5.3.2.1试验过程中，根据表1判定肉眼观察结果。在试验周期内的任意时间点，3只动物中如有1只及以上出现重度水肿、红斑、糜烂或溃疡现象，可直接判定为重度口腔黏膜刺激反应，无需再进行组织学评价。

5.4 结果观察

5.4.1临床观察

5.4.1.1 试验期间观察动物，记录异常表现，包括局部、全身及异常行为等。

5.4.1.2 肉眼观察试验部位，根据表1判定有无红斑、水肿、糜烂及溃疡等情况，并比较同一动物的试验侧颊囊和对照侧颊囊，记录每侧颊囊的状况，注意试验侧与对照侧的差异。

 表1 口腔黏膜临床观察评价表

|  |  |
| --- | --- |
| 临床表现 | 反应程度 |
| 红斑无红斑 | 无 |
| 极轻微红斑（勉强可见） | 极轻 |
| 清晰红斑 | 轻度 |
| 中度红斑 | 中度 |
| 重度红斑（紫红色）至焦痂形成、糜烂、溃疡 | 重度 |
| 水肿无水肿 | 无 |
| 极轻微水肿（勉强可见） | 极轻 |
| 清晰水肿（肿起边缘清晰） | 轻度 |
| 中度水肿（肿起约1 mm） | 中度 |
| 重度水肿（肿起超过1 mm，并超出接触区） | 重度 |

5.4.2 组织学观察

5.4.2.1 组织切片制作

末次接触后24 h，取试样接触部位的颊囊，10%中性福尔马林缓冲液固定，常规石蜡包埋，半连续切片，间隔取片5张，H-E染色。

5.4.2.2 组织学观察及记分

对黏膜组织进行组织病理学观察，并根据口腔黏膜组织反应记分表（表2）计算每只动物得分。其中白细胞浸润情况应至少在20倍物镜下选取3 ~5个有代表性的视野观察，每只动物的得分为所有观察视野的平均分。将试验组中所有动物的组织反应记分相加之和，再除以试验动物总数，得出试验组平均记分，对照组同法计算。

表2 口腔黏膜组织反应记分表

|  |  |
| --- | --- |
| 组织反应 | 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 |
| 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 |
| 极少 | 1 |
| 轻度 | 2 |
| 中度 | 3 |
| 重度伴血管破裂 | 4 |
| 水肿 |  |
| 无 | 0 |
| 极少 | 1 |
| 轻度 | 2 |
| 中度 | 3 |
| 重度 | 4 |

6 结果评价

6.1 临床观察评价

在试验周期内的任意时间点，3只动物中如有1只及以上出现重度红斑、水肿、糜烂或溃疡现象，则可直接判定该受试物为重度口腔黏膜刺激反应，其它情况以下述组织学评价为准。

6.2 组织学评价

6.2.1 若1只动物对照侧颊囊组织学评价记分之和大于9时，则考虑认为是试验操作时造成的损伤，有必要进行重复试验。

6.2.2 试验组平均记分减去对照组平均记分得出刺激指数，并根据表3对口腔黏膜组织反应程度进行分级。

表3 口腔黏膜组织反应分级

|  |  |
| --- | --- |
| 刺激指数（X） | 反应程度 |
| 0 | 无 |
| 0＜X≤4 | 极轻 |
| 4＜X≤8 | 轻度 |
| 8＜X≤11 | 中度 |
| 11＜X≤16 | 重度 |

7 结果判定

根据临床观察评价进行结果判定，临床观察为重度口腔黏膜刺激反应是不可接受的（见6.1）；依据6.2.2口腔黏膜组织反应分级，认为中度、重度口腔黏膜刺激反应是不可接受的。

8 试验结果的解释

本结果通过评估受试物对口腔黏膜的刺激性，旨在为理解其对人体的潜在影响提供了初步数据。鉴于动物与人类生理反应的差异，试验结果外推到人的可靠性有限，必要时建议在适当情况下进行临床验证。