

附件 1

免疫毒性试验技术指导原则

（征求意见稿）

中国食品药品检定研究院

2023 年 9 月

目 录

一、概述.....	1
二、基本原则.....	1
(一) 一般原则.....	1
(二) 具体问题具体分析.....	1
(三) 试验研究策略.....	2
三、基本内容.....	2
(一) 免疫毒性评价应考虑的因素.....	2
(二) 证据权重分析.....	3
(三) 初始筛选免疫毒性试验.....	3
(四) 附加免疫毒性试验设计及方法选择.....	5
四、免疫毒性评价要点.....	8
(一) 免疫抑制.....	8
(二) 免疫刺激.....	9
(三) 超敏反应.....	10
(四) 自身免疫.....	10
(五) 炎症反应.....	11
五、结果分析及评价.....	11
六、参考文献.....	12
七、术语和释义.....	13
八、附录.....	13

一、概述

免疫系统包括参与免疫反应的各种细胞、器官/组织，如胸腺、淋巴结、脾、扁桃体以及分布在全身体液和组织中的淋巴细胞和浆细胞等。免疫毒性是指暴露于各种环境因素（包括外源性化合物）导致的对免疫系统的任何不良影响，包括免疫失调（抑制或刺激）、超敏反应、自身免疫和慢性炎症。免疫毒性试验的目的是探讨外源性化合物对机体免疫系统产生的不良影响及机理。本指导原则旨在为化妆品原料的免疫毒性评价提供可供参考的试验设计及程序，并为评价方法的选择提供技术指导。本指导原则适用于可能对机体免疫系统产生不良影响的化妆品原料的免疫毒性评价。

本指导原则是在现行法规和标准以及当前科学认知水平下制定的，随着法规和标准的更新完善，以及科学技术的发展，将适时进行调整。

二、基本原则

（一）一般原则

免疫毒性试验的设计应符合毒理学试验随机、对照、重复的基本原则，试验数据应真实、完整、准确、可追溯，试验结果统计分析应科学合理。

（二）具体问题具体分析

免疫毒性试验的设计应遵循“具体问题具体分析”的原则。根据受试物特点、现有数据、试验目的等选择合适的试

验方法，设计适宜的试验方案，并结合其他毒理研究信息对试验结果进行全面的评价。

（三）试验研究策略

免疫毒性研究方法包括以非功能性试验为主的初始筛选试验以及以功能性试验为主的附加免疫毒性试验研究。应通过对相关因素（见章节“三、基本内容”）的证据权重分析来决定是否需要进行附加免疫毒性试验研究。

三、基本内容

（一）免疫毒性评价应考虑的因素

识别化妆品原料潜在的免疫毒性风险，需考虑的因素包括化妆品原料与已知免疫毒性化合物的结构相似性；其功能作用机制；初始筛选试验结果等。

1. 结构相似性

与已知免疫抑制剂或免疫刺激物质结构类似的化合物应考虑进行附加的免疫毒性试验研究。

2. 功能作用机制

如果化妆品原料的功能作用机制提示其可能影响免疫功能时，应考虑进行附加的免疫毒性试验研究。

3. 初始筛选试验

初始筛选试验主要为非功能性试验，检测指标包括血液学及血液生化、免疫器官的重量、形态及组织病理学，血液淋巴细胞亚群分布，血清中免疫球蛋白、补体的水平等。

（二）证据权重分析

应基于上述原料与已知免疫毒性化合物的结构相似性、功能作用机制以及初始筛选试验结果等因素进行证据权重分析，以确定是否需要进行附加免疫毒性试验研究。如上述单一因素的研究结果充分提示原料存在潜在的免疫毒性风险，应进行附加免疫毒性试验研究。如有两个或多个因素的研究结果提示原料存在潜在的免疫毒性风险，即使单一因素的证据不充分，也应进行附加免疫毒性试验研究。如果未进行附加免疫毒性试验研究，应提供充分的研究数据。此外，在常规毒性研究中，最大耐受剂量或接近最大耐受剂量能够导致与应激相关的免疫系统的改变，有充分证据说明出现的免疫学改变与应激相关时，才可以不进行附加的免疫毒性试验研究。

（三）初始筛选免疫毒性试验

初始筛选试验应评价以下免疫毒性相关指标，这些指标可整合到90天重复剂量毒性试验中。

1. 血液学及血液生化

推荐将白细胞总数和绝对白细胞分类计数用于免疫毒性评价。血清球蛋白水平的变化可提示血清免疫球蛋白水平发生变化。虽然血清免疫球蛋白并不是免疫抑制的敏感指标，但在特定情况下，免疫球蛋白水平、白蛋白/球蛋白比值检测有助于更好地了解药物的靶细胞或作用机制。

2. 大体病理学和脏器重量

剖检时应评价所有淋巴组织的大体病理学改变，并称量记录胸腺、脾脏、肾上腺（可选：黏膜附近的淋巴结或周围淋巴结的重量。胸腺随着年龄的增长而萎缩可能会对胸腺重量的评估造成影响。

3. 组织病理学检查

剖检后应评价胸腺、脾脏、淋巴结（黏膜附近的淋巴结或周围淋巴结）、骨髓的组织病理学改变。胸腺、脾脏、骨髓细胞的组织病理学改变应被视为系统免疫毒性的指征。应对引流淋巴组织或接触给药部位（暴露于最高浓度药物）的淋巴组织进行检查。吸入途径的应包括支气管相关淋巴组织（BALT）；吸入或鼻腔途径的（如果可能）应包括鼻相关淋巴组织（NALT）；经皮途径的应包括邻近部位的引流淋巴结。申请人应根据经验自行选择应进行检查的特定淋巴结和额外的淋巴结。

在记录淋巴组织的改变和报告受试物相关的改变时，推荐对淋巴组织不同区室的改变进行病理学分区室半定量描述。

4. 增加的功能检测

为增加筛选阶段免疫毒性的可预测性，在常规毒性检测指标基础上需增加血液淋巴细胞亚群分布、免疫球蛋白（IgA、

IgE、IgM) 含量、补体 (如 C3a、C5a) 及其他免疫活性物质等指标的检测。

(四) 附加免疫毒性试验设计及方法选择

基于风险, 证据权重分析显示需要进行附加免疫毒性试验研究, 应进行相关评价以验证受试物潜在的免疫毒性, 并明确免疫细胞和免疫功能受影响的程度。这些研究也有助于确定受影响的细胞类型、影响的可逆性和作用机制。

1. 附加免疫毒性试验的设计

附加免疫毒性试验研究中, 动物种属、品系、剂量、给药期限和给药途径应尽可能与常规毒性试验研究一致, 通常使用啮齿类实验动物。试验通常选择三个剂量: 高剂量应高于未见不良反应剂量 (NOAEL), 而低剂量应不引起免疫调节功能的损伤。推荐设计多个剂量组, 以确定剂量-反应关系和未见免疫毒性剂量, 同时设立空白和/或溶剂对照组、阳性对照组以确保试验的准确性和重复性。

2. 附加免疫毒性试验方法的选择

附加免疫毒性试验主要为功能性试验, 包括特异性细胞免疫、体液免疫、免疫表型分析、非特异性细胞免疫 (巨噬细胞功能检测、NK细胞活性测定) 等。每个功能试验的测定方法很多, 进行附加免疫毒性试验时, 每个功能试验应至少选择一种方法进行。

2.1 细胞免疫

细胞免疫功能的检测方法主要有：（1）T淋巴细胞增殖试验（MTT法），其原理是当淋巴细胞受ConA刺激后发生母细胞转化，活细胞特别是增殖细胞通过线粒体水解酶将MTT分解为蓝紫色结晶而显色，其光密度值能反映细胞的增殖情况。（2）细胞毒性T细胞杀伤试验（CTL），细胞毒性T淋巴细胞是指CD8⁺T淋巴细胞对靶细胞具有特异性的细胞毒性。在评价细胞免疫功能评价中，常取动物脾淋巴细胞进行细胞毒性T淋巴细胞实验，检测采用放射法或流式细胞术。（3）迟发型超敏反应（DHR）是指受试物激发致敏淋巴细胞释放介质而导致组织损伤，检测可采用Buehler 试验（BT）等。

2.2 体液免疫

体液免疫功能的检测方法主要有：（1）绵羊红细胞（SRBC）作为抗原的抗体生成细胞试验（Antibody Plaque Forming Cell，简称PFC试验，也称溶血空斑试验）该方法通过计数脾脏中特异性抗体生成细胞的数量来反映抗体的产量，经充分验证能够有效预测化合物的潜在免疫毒性。体液免疫反应具有动物品系依赖性，在小鼠表现得更为明显。（2）SRBC为抗原的ELISA法，钥孔戚血蓝素（KLH）作为抗原的ELISA法。该检测方法操作简便，便于整合到常规毒理学研究中。（3）免疫电泳法和血清溶血素法，直接测定外周血中特异性抗体的浓度或滴度。

2.3 免疫表型分析

免疫表型分析指采用抗体进行免疫细胞亚型的鉴定和/或免疫细胞亚型的计数。免疫表型试验通常采用流式细胞术或免疫组织化学方法。

流式细胞术用于特定细胞群计数时不属于功能性检测。基于体外分子标记技术的流式细胞术可用来测定淋巴细胞的抗原特异性免疫应答。推荐采用淋巴细胞亚型的绝对数量和百分比对暴露后动物相关的变化进行评价。

如果常规毒性试验中发现免疫毒性指征，可采用免疫组化对相关组织进行分析。另外，能够观察到淋巴组织中某一特定区域的细胞类型的改变。当采用免疫表型研究表征或鉴别特定免疫细胞群的改变时，应根据观察到的变化（如CD4⁺和CD8⁺ T淋巴细胞或其它亚群的数量及比值的改变）选择待评价免疫器官和/或外周血。免疫表型研究易于结合常规毒性研究进行，在给药期和恢复期均可以检测免疫表型的变化。

2.4 巨噬细胞功能检测

用于评价受试物对巨噬细胞功能的影响。主要有巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验、巨噬细胞溶酶体酶测定、巨噬细胞表面受体检测、流式细胞法等。除体内试验外，部分试验也可用于评价在体外暴露于受试物或来自暴露后动物（离体实验）的巨噬细胞/中性粒细胞的功能。

2.5 NK细胞活性测定

如果免疫表型分析显示自然杀伤（NK）细胞数量发生变化，或常规毒性试验发现病毒感染率升高，或基于其它一些原因，可进行NK细胞活性试验。通常，NK 细胞试验采用已经给予受试物的动物组织（如脾脏）或血样进行离体试验。主要采用微量培养法和乳酸脱氢酶（LDH）释放法，其原理是观察NK细胞对敏感的肿瘤细胞的溶解作用，当细胞受到NK细胞的杀伤后，LDH释放至细胞外。也可采用流式细胞法，通过检测标记的靶细胞凋亡比例，即可反映出NK细胞的活性。

四、免疫毒性评价要点

（一）免疫抑制

免疫抑制即免疫系统的广泛抑制，可致机体的易感性增加和肿瘤性疾病的风险增加。当受试物的潜在免疫抑制作用在已有常规毒性研究中不能明确免疫系统受影响的特定部分/功能时，应考虑进行免疫毒性研究以评估对免疫系统的影响。免疫抑制的检测采用多层级方式，第一层级免疫抑制试验为初始筛选阶段，主要由非功能性试验组成，增加血液淋巴细胞亚群分布及NK细胞活性等功能试验可增加筛选阶段的预测性；第二层级试验主要是功能性试验。特异性和敏感性随层级逐级增加。第一层级中产生的免疫抑制指征有免疫器官重量、细胞数目、细胞群以及免疫球蛋白的变化；第二层级中可采用特异性的免疫功能检测，如评价免疫期间对体液免疫功能的影响，可采用ELISA等方法检测特异性抗体、

采用PFC试验检测特异性抗体生成细胞的数量；评价对特异性细胞免疫反应的影响，可采用淋巴细胞增殖试验等；评价NK细胞活性可采用微量培养法或LDH释放法等。

单一的毒性或免疫抑制研究不能用于评价全部的免疫相关参数，有必要识别最重要的指示参数并选择合适的方法来评定受试物的免疫抑制。免疫抑制试验最好结合全身毒性试验，因为全身毒性试验采用系列剂量的受试物对全身主要器官系统的反应进行评价。常规毒性试验可参照（三）中“常规毒性研究”的免疫毒理学参数进行免疫毒性的测定。如常规毒性试验中观察到的反应可以直接预测其在人体的反应时，则不需要附加的免疫毒性研究。

（二）免疫刺激

免疫刺激是指具有增强免疫系统活性的物质通过直接刺激免疫相关信号通路或通过抑制/激活免疫相关调节因子等间接作用激发免疫系统活性，从而引起的一种免疫毒性的类型。在大多数情况下，免疫刺激不会导致对传染性疾病抵抗力的降低，但可能会增加过敏性和自身免疫性疾病的风险。

用于免疫抑制的试验方法也适用于免疫刺激的检测。那些可以非特异性刺激免疫系统的物质，最好采用已诱导致敏或自身免疫的动物模型进行评价研究。目前还没有建立能够将动物数据外推至人的用于检验过敏症和自身免疫的有效动物模型。当在实验动物上无法充分暴露免疫毒性风险时，

应采用离体组织或系统，如人源免疫细胞，开展相关免疫毒性试验。

除了化妆品原料本身的免疫刺激性，还应考虑污染物或残留物的免疫刺激活性。

（三）超敏反应

作用物具有抗原特性被免疫系统识别，同样地，也可以作为变应原诱发超敏反应。最常见的超敏反应类型有速发型超敏反应（I型）和迟发型超敏反应（IV型）。I型超敏反应由IgE介导，可以通过检测特异性IgE的产生，对于I型超敏反应尚没有好的预测性试验，最经典的诱发方法包括被动过敏反应检查法。IV型超敏反应包括抗原特异性细胞炎症反应，可参考《化妆品安全技术规范》中“皮肤变态反应试验”方法，如Buehler 试验（BT）等。

（四）自身免疫

自身免疫性疾病在很大程度上是由遗传性因素引起的，经确认至少有4种机制可诱导自身免疫性疾病，即正常细胞内的物质如释放进入循环被识别为异物（隐蔽抗原）、由于化学、物理或生物学改变可转变为免疫原性的（自身抗原）、可诱导免疫应答，与正常自身抗原交叉反应（异物抗原）、发生在免疫功能细胞内的突变等。因此常规毒性试验不太可能检测出自身免疫的诱发潜能。目前提出的自身免疫预测性试验模型主要是腭窝淋巴结试验的改良方法，该试验中引流

淋巴结的增殖反应被认为是致敏反应诱发的指示，包括自身免疫。

（五）炎症反应

免疫毒性物质能与免疫系统的非特异性成分（即粒细胞、巨噬细胞和其他能产生和释放炎症介质的细胞类型）相互作用。局部炎症反应是很常见的，评价炎症反应程度最直接的方法就是对炎症部位进行病理学观察。

五、结果分析及评价

免疫系统的应答是一个十分复杂的过程，因此，观察化妆品原料对机体可能存在的免疫毒性作用的研究应该考虑全面、深入，不能以少数实验结果来评价其免疫毒性作用，应根据化妆品的暴露途径、免疫应答的特点，结合动物的生理特性并选择合适的动物进行，对免疫毒性的试验数据进行分析时，应该对全部数据进行综合评价，以便有充分的数据对免疫毒性风险进行合理的评估。根据所观察到的各种免疫毒性反应出现的时间、持续时间及严重程度等，分析各种反应在不同剂量时的发生率、严重程度。对观察结果进行归纳分析，判断每种反应的剂量-反应及时间-反应关系。

附加研究未检测到免疫毒性的风险，则无需进行进一步的试验；附加研究显示可能存在免疫毒性风险，但无法提供充足的数据进行合理的风险-获益决策。在这种情况下，进一步的试验可能有助于为风险-获益决策提供充分的信息。

任何常规毒性试验（如急性毒性试验、亚慢性毒性试验（90天）、致畸试验、慢性毒性/致癌性试验等）发现的免疫毒性作用，都应该予以评估。

六、参考文献

- 1.国家药品监督管理局.化妆品安全技术规范.(2015.12)
- 2.SCCS. The SCCS Notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation (12th revision). (2023.5)
- 3.ICH. ICH:S8 Immunotoxicology Studies for Human Pharmaceuticals.(2003.11)
- 4.国家食品药品监督管理局，化妆品安全技术规范（2015年版），2015.12
5. OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents(407).(2008.10)
- 6.ISO/TS 10993-20 Principles and methods for Immunotoxicology testing of medical devices.(2006.8)
- 7.国家药品监督管理局药品审评中心.药物免疫毒性非临床研究技术指导原则(征求意见稿).(2022.9)
- 8.国家药品监督管理局药品审评中心.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（2005.3）
- 9.WHO.Guidance for Immunotoxicity Risk Assessment for

Chemicals.(2012)

10.EPA.Health Effects Test Guidelines:OPPTS 870.7800

Immunotoxicity(1996.6)

11.ISO/TS 10993-6 Biological evaluation of medical devices.(2007.5)

12.厚生労働省医薬食品局.免疫毒性试验指南（案）
[S].2004:1

13.EMA:CPMP/SWP/1042/99 Note for Guidance on Repeated Dose Toxicity.[S].2000:1

14.FDA.Nonclinical Evaluation of the Immunotoxic Potential of Pharmaceuticals Guidance for Industry.(2023.6)

七、术语和释义

（一）免疫毒性（Immunotoxicity）

免疫毒性是毒理学学科最新和最重要的分支之一，是指外源性化合物和物理因素对机体免疫系统产生的不良影响。

（二）免疫抑制（Immunosuppression）

是指对于免疫应答的抑制作用。免疫力低下容易受到细菌、病毒、真菌等感染，甚至容易长肿瘤。

（三）免疫刺激（immunostimulation）

是指对于免疫应答的刺激作用。通常指激活非特异性免疫，增强机体免疫应答。

八、附录

化妆品原料免疫毒性试验方法

附录

化妆品原料免疫毒性试验方法

Test method for immunotoxicity of cosmetic raw materials

1 范围

本方法规定了化妆品原料免疫毒性的定义、试验基本原则、要求和方法。
本方法适用于化妆品原料的免疫毒性检测。

2 试验目的

该测试方法用于评价化妆品原料与机体接触后所产生的免疫毒性反应的潜在可能性。

3 定义

3.1 免疫毒性 immunotoxicity

受试物诱导免疫系统发生功能紊乱或异常的抑制性或刺激性反应。

3.2 体液免疫 humoral immunity

抗原进入机体后，刺激 B 细胞产生效应 B 细胞和记忆细胞，进而产生抗体，与相应的抗原产生免疫反应。

3.3 细胞免疫 cell-mediated immunity

又称细胞介导免疫。狭义的细胞免疫仅指 T 细胞介导的免疫应答，即 T 细胞受到抗原刺激后，分化、增殖、转化为致敏 T 细胞，对抗原的直接杀伤作用及致敏 T 细胞所释放的细胞因子的协同杀伤作用。T 细胞介导的免疫应答的特征是出现以单核细胞浸润为主的炎症反应和/或特异性的细胞毒性。广义的细胞免疫还包括原始的吞噬作用以及 NK 细胞介导的细胞毒作用。

4 试验的基本原则

本方法中的免疫毒性试验，可以评价受试物是否改变或损伤免疫系统的机能状态。评价指标包括：免疫组织、免疫器官的重量及细胞结构；临床血液生化分析；血液学检查；体液免疫功能；细胞免疫功能。不同组的动物给予不同剂量的受试物至少 30 d，每天对动物进行观察，记录所出现的任何临床毒性表现。染毒结束后，处死动物，对上述的评价指标进行检测或分析；其中有些试验中需要用抗原将动物致敏。

5 试验方法

5.1 实验动物及饲养环境

5.1.1 动物种系的选择

选用健康啮齿类动物，首选小鼠或大鼠，并使用常用的动物品系。如果使用其他种属的动物则应说明理由。

5.1.2 动物的性别和数量

各组的每个观察指标测定时至少应包含 10 只动物（雌雄各 5 只）。若计划在试验过程中处死动物，则应增加计划处死的动物数。此外，对照组和高剂量组应设立附加组，每组至少包含 10 只动物（雌雄各 5 只），染毒结束后继续观察一段时间（30d），以评价免疫毒性作用是否可以恢复、是否持续存在、是否具有迟发性等情况。

动物在实验室中至少适应 3 天，6 周~8 周龄时开始实验，试验时每一性别的动物体重不应超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。如果已知受试物对其中一种性别的动物更敏感，则应使用这种性别的动物。雌性动物应未产、未孕。

5.1.3 饲养环境

实验动物室应符合国家相应规定。选用标准配合饲料，不限制饮水量。

5.2 受试物

5.2.1 受试物配制：固体受试物应溶解或悬浮于适合的溶剂中，使用前稀释至适当浓度；液体受试物可以直接加入试验系统和/或用前稀释至适当浓度。受试物应在使用前新鲜配制，否则须确认贮存不影响其稳定性。

5.2.2 剂量设置

对于免疫毒性试验，常常期望得到受试物剂量反应关系和无免疫毒性作用的剂量水平。因此，试验时至少要设 3 个剂量组。高剂量应不使动物产生明显的应激、营养不良或死亡；但最好可使动物产生一些可测量的一般中毒表现。低剂量最好不使动物产生任何免疫毒性作用。

5.3 对照

5.3.1 阴性对照：在每项试验中，应设立溶剂对照组，而且溶剂对照组中还应另外包含一些动物，用于评价免疫毒性的可恢复性、持续性以及迟发性时作为对照。溶剂免疫毒性未知时，还应设立一个不作任何染毒的空白对照组。

5.3.2 阳性对照：为了说明方法的敏感性，应使用已知的免疫抑制剂(如环磷酰胺)作为阳性对照物，每个观察指标至少需要 10 只动物。

5.4 染毒方式

受试物或溶剂经口和/或经皮和/或经吸入染毒至少 30 d，具体的染毒途径应与 90 d 重复剂量毒性试验的染毒途径一致。

5.5 动物观察

观察期限至少为 30 d。附加组动物在停止染毒受试物后至少再观察 30 d，以观察免疫毒性作用是否恢复、是否持续存在、是否具有迟发性。每天对动物至少进行 1 次细致的临床观察，记录中毒症状的出现时间、严重程度及其持续时间。观察应包括如下方面但并不仅限于此：皮、毛；眼、黏膜；呼吸系统；自主性和中枢神经系统；循环系统；肢体运动功能；行为特征；抗感染能力等。

每周测量 1 次动物的摄食量和饮水量。动物染毒前称体重，之后每周 1 次，处死前再次称体重。

任何濒死动物一被发现就应与其他动物分开并被安乐死。对试验过程中的任何濒死的或死亡的动物都应进行大体解剖。

5.6 免疫毒性相关检查

试验结束后，各剂量组和对照组各取 10 只动物进行临床检查。动物处死前应隔夜禁食。

5.6.1 血液学检查

在试验结束后检测指标包括：白细胞总数及分类计数等。

5.6.2 血液生化检查

检测指标可包括：球蛋白、白蛋白/球蛋白比值及免疫球蛋白分类（IgG、IgM、IgA 和 IgE）水平测定等，必要时可进行其他的临床生化分析。

5.6.3 大体解剖及组织病理学检查

所有动物都应进行大体解剖，包括：测量体重、胸腺、脾脏的湿重（取出后应尽快称量以免脏器干燥），必要时可选淋巴结。

各剂量组和对照组各取 10 只动物，取下列组织器官以及病变器官，用适当的固定液进行固定保存，用于组织病理学检查。这些组织器官包括：胸腺、脾脏、骨髓（股骨、胸骨或肋软骨部位的骨髓）、有代表性的淋巴结（黏膜附近的淋巴结或周围淋巴结）、所有肉眼可见的损伤。

5.7 免疫毒性试验

5.7.1 体液免疫试验

首先用抗原免疫动物，然后采用抗体形成细胞试验（也称溶血空斑试验）方法或酶联免疫吸附（ELISA）检测抗体滴度的方法评价受试物对体液免疫的影响，应采用两种方法中的一种进行试验。

5.7.1.1 抗体形成细胞试验（Antibody Plaque Forming Cell, PFC）

抗体形成细胞试验通过计数脾脏中特异性抗体生成细胞的数量来反映抗体的产量，可用于检测染毒受试物 30d 对脾脏内产生抗体的细胞的毒性作用。试验时，应对如下因素进行考虑：

- (1) 于染毒的第 26 天经静脉注射 T 细胞依赖性抗原绵羊红细胞(Sheep Red Blood Cells, SRBCs); 应对各种种属和品系的动物在注射抗原后测定 PFC 的最佳时间作出评价。
- (2) 测定每批补体的活性。
- (3) 引用某种方法时应对方方法进行整体引用, 对方法所做的任何修改应予以说明并能证明其合法性和合理性。
- (4) 为了验证试验方法的敏感性, 应设立经免疫抑制剂(如环磷酰胺)染毒的阳性对照组。
- (5) 使用双盲法进行 PFC 计数。
- (6) 测定脾细胞的活性。

5.7.1.2 免疫球蛋白定量测定

该试验评价受试物是否影响抗体对抗原的反应性。在染毒结束前 4d~5d, 用适当的胸腺依赖性抗原免疫动物后, 经过适当的时间再次用抗原免疫动物, 然后测定每只动物血清中 IgG 和 IgM 的滴度。测定抗体滴度的时间点应足够多, 以便对染毒组和对照组动物的初级抗体反应和次级抗体反应进行比较。测定抗体时受试物的染毒时间至少为 30 d。试验时, 应考虑: 测定血清中 IgG 和 IgM 滴度的方法应足够敏感以便测得每只动物的 IgG 和 IgM 滴度。ELISA 方被认为是一种灵敏、可靠、重复性好的方法。

5.7.2 特异性细胞免疫试验

为了评价染毒受试物 30 d 对特异性细胞免疫反应的影响, 应采用下列三种方法中的一种进行试验。

5.7.2.1 淋巴细胞增殖试验 (lymphocytes multiplication test)

该方法可以证明染毒受试物 30 d 对同种异品系淋巴细胞刺激引起的淋巴细胞增殖能力的影响。首选通过测量放射性标记物 (一般为 3H-胸腺嘧啶, 简称 3H-TdR) 掺入 DNA 的量来说明淋巴细胞的增殖, 也可采用 BrdU-ELISA/FCM、MTT 等方法。采用 3H-TdR 掺入试验时, 应对如下因素进行考虑:

- (1) 应答细胞来自对照组和染毒组动物的脾细胞, 在无菌条件下制备脾细胞。应答细胞的 DNA 合成没有采取阻断处理;
- (2) 刺激细胞来自未经染毒的同种异品系动物的脾细胞, 在无菌条件下制备脾细胞。刺激细胞的 DNA 合成用丝裂霉素或 X 线处理进行阻断;
- (3) 测定应答细胞和刺激细胞的活力;
- (4) 应设 3 份或 4 份对照, 用于证明收获细胞的效益保证刺激细胞的非反应性、测定 DNA 合成的基础水平;
- (5) 对空白对照和溶剂对照同时进行测定;
- (6) 用每个培养皿中掺入应答细胞的放射性标记物的量来表示脾细胞的增殖程度, 表示为每分钟居里数 (curie per minute, CPM)。要计算净 CPM(nCPM), 即, 应答细胞被刺激细胞刺激后掺入的 CPM 均值减去未经刺激的脾细胞掺入 CPM 的均值。染毒组与对照组差异的百分比表示为: $[1-(\text{染毒组 nCPM}/\text{对照组 nCPM})]$;

(7) 不同的淋巴细胞增殖试验存在许多不同，应说明所引用的试验方法及详细的试验步骤，说明主要试剂的来源，最好也说明这些试剂的纯度；

(8) 为了证明方法的灵敏性，应设立阳性对照组，用已知的免疫抑制剂进行染毒。

5.7.2.2 迟发型过敏 (Delayed-type Hypersensitivity, DTH) 反应

该方法是一种检测受试物对实验动物诱导性 DTH 影响的体内方法。一般来说，动物被胸腺依赖性抗原致敏，之后用相同的抗原进行激发，激发后 24 h~48 h，比较染毒组和对照组 DTH 反应的差异。开展该试验时，应对如下因素进行考虑：

(1) DTH 检测方法有数种，如 Buchler 试验 (BT) 等。应选用灵敏度高、可重复性好、并适用于所选用实验动物品系的方法；不同的方法中下列参数也可能不同，如致敏及激发动物所用抗原的性质，免疫性注射的次数及途径，免疫激发的时间，同位素的使用等。试验时选用的这些参数及其他相关的参数应可以使所选用的实验动物产生足够的 DTH 反应；

(2) 测定 DTH 反应前，应对动物染毒至少 30 d。

5.7.2.3 细胞毒性 T 淋巴细胞 (Cytotoxic T-lymphocyte, CTL) 检测

该方法用于证明染毒受试物 30d 对 CTL 生成的影响。常取动物脾淋巴细胞进行细胞毒性 T 淋巴细胞实验，检测采用放射法或流式细胞术。放射法使用同种异品系肿瘤抗原对 CTL 进行诱导 (体内或体外诱导)，然后，来自染毒组和对照组动物的脾细胞与 ^{51}Cr 标记的同种异品系肿瘤细胞共孵育，4h 后，肿瘤细胞所释放的放射性标记物的量可以说明 T 淋巴细胞溶解肿瘤细胞的能力。试验时，应对如下因素进行考虑：

(1) 应设立对照组来测定效应细胞不存在时靶细胞释放的放射性标记物的本底量和放射性标记物的总的释放量；

(2) 应可以证明试验中所选用的动物可产生 CTLs，所选用的试验方法应适合于诱导动物 CTL 的生成；

(3) CTL 检测有数种不同的方法，引用某一种方法时应做到完全引用，对方法进行修改时应予以说明，合适的情况下应说明主要试剂的来源、活性和/或纯度。

5.7.3 非特异性细胞免疫反应

通过测定 NK 细胞的功能、巨噬细胞数及其吞噬作用可以评价染毒 30 d 受试物对非特异性细胞免疫的影响。

5.7.3.1 NK 细胞的活性 (natural killer cell activity)

建议采用 Reynolds 和 Herberman 的微量培养法来检测染毒 30 d 受试物对 NK 细胞活性的影响，也可采用 LDH 释放法等其他适合的方法。微量培养法是将染毒组和未染毒组动物的脾细胞与 ^{51}Cr 标记的 YAC-1 淋巴瘤细胞共培养。靶细胞与效应细胞共培养 4h 后，靶细胞中释放的放射性标记物的量可用于表示 NK 细胞杀伤肿瘤细胞的能力。开展该试验时，应对如下因素进行考虑：

(1) 应设立几个对照以说明在没有效应细胞存在时，靶细胞释放放射性标记物的本底量以及放射性标记物总的释放量；

(2) 试验使用除 YAC-1 淋巴瘤细胞之外的靶细胞也许是合适的。任何情况下都应测定靶细胞的存活力；

(3) 也许需要对方法的某些步骤进行修改，但是，引用某种方法时应对方方法进行整体引用，对方方法所做的任何修改都应予以说明并能证明其合法性和合理性；应说明主要试剂的来源，最好也能说明这些试剂的活性或纯度。

(4) NK 细胞的活性可与 90 天重复剂量毒性试验一起进行，在染毒 90 天后检测。

5.7.3.2 巨噬细胞检测

该试验可以评价染毒 30 d 受试物对巨噬细胞数及其吞噬功能的影响。应对如下方面进行检测：

(1) 试验中应计数腹腔细胞的总数及分类计数；

(2) 评价在有或没有促进因子(如， γ -干扰素或细菌脂多糖)存在的情况下腹腔细胞对外源性物质(如，鸡红细胞、荧光微球等)的吞噬作用。

(3) 有数种不同的巨噬细胞检测方法，如鸡红细胞吞噬法、巨噬细胞溶酶体酶测定、巨噬细胞表面受体检测、流式细胞法等，因此，应对所选用的方法进行描述并说明方法引证的来源；如果对所选用的方法作了一些修改，则应说明修改的合理和合法性。

5.7.4 淋巴细胞亚群测定

淋巴细胞亚群测定试验属于免疫表型分析，目的是对淋巴细胞亚型进行鉴定和计数，通常采用流式细胞术。应对如下方面进行检测：

(1) 对全血、外周血或从淋巴组织分离的免疫细胞如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等进行计数；

(2) 检测免疫细胞表面标志物的改变，评估 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞或其它亚群的数量及比值。

(3) 淋巴细胞亚群测定可结合 90 天重复剂量毒性试验一起进行，可设计不同的检测时间点监测其动态变化。

6 结果评价

6.1 结果的处理

可通过表格形式总结试验结果，显示试验开始时各组动物数、出现免疫毒性反应的动物数、免疫毒性损伤的类型和每种损伤的动物百分比。对所有数据应采用适当的统计学方法进行评价，统计学方法应在试验设计时确定。

6.2 试验结果的评价

免疫毒性试验结果应结合前期试验结果，如血液学、血清免疫球蛋白含量、免疫器官重量、组织病理学(胸腺、脾、肾上腺、淋巴结)等，并考虑到免疫毒性效应指标结果进行综合评价。根据所观察到的各种免疫毒性反应出现的时间、持续时间及严重程度等，分析各种反

应在不同剂量时的发生率、严重程度。对观察结果进行归纳分析，判断每种反应的剂量-反应及发生率-程度关系。在综合分析的基础上得出未观察到反应的剂量水平，为剂量、观察指标的选择提供依据，还可表明是否需要进行额外的研究。

7 结果解释

免疫毒性试验能够提供受试物在反复接触机体后的毒性作用资料。其试验结果仅可在很有限的程度上外推到人，但它可为确定人群的允许接触水平提供有用的信息。

附件 2

《免疫毒性试验技术指导原则（征求意见稿）》起草说明

为规范开展化妆品原料的安全评价工作，根据《化妆品监督管理条例》《化妆品注册备案管理办法》《化妆品新原料注册备案资料管理规定》及相关法律法规、强制性国家标准和技术规范的要求，中国食品药品检定研究院（以下简称中检院）组织起草了《免疫毒性试验技术指导原则（征求意见稿）》（以下简称《技术指导原则（征求意见稿）》）。现将起草的有关情况说明如下：

一、起草的必要性

2021 年 5 月 1 日，《化妆品监督管理条例》和相关配套法规已正式施行。《化妆品新原料注册备案资料管理规定》中规定“国内外首次使用的具有较高生物活性的寡肽、多肽、蛋白质类新原料，应当提供上述第 1~12 项毒理学试验资料，还应当同时提交皮肤吸收/透皮试验和免疫毒性试验资料”。另外，由于部分原料与已知免疫毒性化合物的结构相似性、发挥功能的作用机制等因素，可能存在引发机体产生免疫毒性反应的风险。因此，有必要对免疫毒性试验的相关技术问题开展系统性研究，制定相应的技术指导原则，以规范和指导化妆品原料免疫毒性的研究和评价。

二、制定原则

（一）依法依规原则。《技术指导原则（征求意见稿）》遵循依法依规原则，贯彻落实《化妆品监督管理条例》及配套法规文件中关于化妆品和新原料的法规要求，研究免疫毒性试验的具体要求，切实为化妆品和新原料的安全评价提供技术指导，也为技术审评以及监管提供依据。

（二）公开透明原则。《技术指导原则（征求意见稿）》起草过程中，坚持“公开透明、广泛参与”原则，充分参考国内外相关法规和技术标准，积极征求监管部门、专家、行业协会意见，同时根据意见反馈情况科学合理地进行修改完善。

三、主要内容

本指导原则对免疫毒性评价应考虑的因素、分析策略、试验设计及方法选择等方面进行了详述；从免疫抑制、免疫刺激、超敏反应、自身免疫反应、炎症反应等方面对化妆品原料免疫毒性评价的关注点进行了阐述。《技术指导原则（征求意见稿）》主要内容包括：概述；基本原则；基本内容；免疫毒性评价要点；结果分析及评价；参考文献；术语与释义；附录。在附录中，还提供了免疫毒性试验的具体试验方法。

四、需要说明的问题

（一）关于初始筛选试验的设置

免疫毒性试验研究通常采用基于风险、证据权重的策略，分层开展；免疫毒性研究方法包括初始筛选试验以及附加免疫毒性试验。为有效确定在初始筛选试验后是否需要进一步开展附加毒性试验，《技术指导原则（征求意见稿）》中参照欧洲药品评价局（EMA）《重复剂量毒性》的“附录B 免疫毒性指南”，在初始筛选试验中增加血液淋巴细胞亚群分布、免疫球蛋白（IgA、IgE、IgM）含量、补体（如 C3a、C5a）及其他免疫活性物质等指标的检测。

（二）关于具体试验方法的选择

在《技术指导原则（征求意见稿）》中，提供了各种不同类型免疫毒性反应的基本试验方法。免疫毒性试验的设计应符合毒理学试验随机、对照、重复的基本原则，根据化妆品的暴露途径、免疫应答的特点，结合动物的生理特性并选择合适的动物进行；进行附加免疫毒性试验时每个功能试验应至少选择一种方法进行。

对免疫毒性的试验数据进行分析时，必须对所有的数据进行评价，以便有充分的数据对免疫毒性风险进行合理、全面的评价。