
附件 4

皮肤致敏性整合测试与评估策略

应用技术指南

(征求意见稿)

目 录

一、概述	1
二、适用范围	2
三、基本原则	2
四、可用的替代方法	2
五、注意事项	4
附录 1	5
附录 2	7
附录 3	8
附录 4	9

一、概述

皮肤变态反应（过敏性接触性皮炎 Allergic contact dermatitis, ACD），是皮肤对一种物质产生的免疫源性皮肤反应。皮肤变态反应试验是评价化妆品原料致敏性的常用方法，随着动物福利及科学技术的发展，国际上也逐步开展采用体外试验、非测试的毒性预测方法等多种毒理学评价工具组合的皮肤致敏性整合测试与评估策略，用于评价化妆品原料的潜在致敏风险。

目前科学上普遍认可皮肤过敏是以蛋白质共价结合为起始事件，经过细胞、组织器官等一系列生物学应答，最终导致过敏性接触性皮炎这一有害结局。皮肤致敏性整合测试与评估策略基于皮肤致敏有害结局路径（Adverse Outcome Pathway, AOP）以及针对其中各关键事件（Key Events, KEs）研发的系列替代毒理学试验，整合待评估原料相关数据进行证据权重分析，对化妆品原料潜在的皮肤致敏性风险进行评价。



图1 皮肤致敏AOP示意图

在皮肤致敏性AOP中，关键事件KE1为分子起始事件，关键事件KE2和KE3分别为角质形成细胞应答和树突状细胞应答，关键事件KE4为组织器官反应（淋巴T细胞增殖）。

二、适用范围

本应用指南适用于化妆品原料皮肤致敏性评价。采用皮肤致敏性AOP检测关键事件KE1—KE3的毒理学试验方法组成“3选2试验”策略，其适用范围应符合所选所有试验方法适用性的要求。

三、基本原则

结合化妆品原料的特点，基于皮肤致敏 AOP 的机制，形成固定的逐步获取和评估检测数据的顺序测试策略，根据所获得的检测结果决定是否开展后续检测，可对化妆品原料皮肤致敏性进行危害识别。在策略中应说明覆盖了 AOP 中哪些关键事件、试验方法的选择顺序、对已知不确定性的考虑（如所选试验方法局限性、阳性结果判定的阈值边界范围等）内容。

四、可用的替代方法

目前，《化妆品安全技术规范》中用于检测皮肤致敏性的替代方法包括：皮肤变态反应：局部淋巴结试验（LLNA:DA 和 LLNA: BrdU-ELISA），体外皮肤变态反应试验：直接多肽反应试验（DPRA）、氨基酸衍生生化反应试验方法（ADRA）、人细胞系活化试验（h-CLAT）、U937 细胞激活试验方法（U-SENS）和角质细胞荧光素报告基因测试 LuSens 方法（LuSens）。

表 1 《化妆品安全技术规范》收录的皮肤致敏性替代试验汇总表

关键事件	《化妆品安全技术规范》收录的方法	结果判定要求
------	------------------	--------

关键事件	《化妆品安全技术规范》收录的方法	结果判定要求
KE1	化妆品用化学原料体外皮肤变态反应：直接多肽反应试验（DPRA）	详见附录 1
	体外皮肤变态反应 氨基酸衍生生化反应试验方法（ADRA）	需说明阈值边界范围
KE2	体外皮肤变态反应 角质细胞荧光素报告基因测试 LuSens 方法（LuSens）	详见附录 2
KE3	体外皮肤变态反应 人细胞系活化试验（h-CLAT）	详见附录 3
	体外皮肤变态反应 U937 细胞激活试验（U-SENS）	需说明阈值边界范围
KE4	皮肤变态反应：局部淋巴结试验：DA（LLNA:DA）	可得出受试物致敏能力和强度
	皮肤变态反应：局部淋巴结试验：BrdU-ELISA（LLNA:BrdU-ELISA）	

其中局部淋巴结试验（LLNA:DA 和 LLNA: BrdU-ELISA）用于检测 KE4，试验结果能得出受试物的致敏能力和强度，这些结果可在有限的范围内外推到人类。

DPRA 和 ADRA 试验用于检测 KE1；LuSens 试验用于检测 KE2；h-CLAT 和 U-SENS 试验用于检测 KE3。“3 选 2 试验”策略应从 KE1—KE3 中任意选择两个关键事件，分别选择相应的替代方法对两个关键事件进行检测，如两项试验结论一致且试验结果均不在阈值边界范围内，则根据一致的结论判定化妆品原料是否具有皮肤致敏性；否则选择第三项关键事件相应的替代方法开展检测，根据三项试验中两项一致的试验结论判定化妆品原料是否具有皮肤致敏性；若三项试验结论存在矛盾（一项为阳性结果、一项为阴性结果、一项结果在阈值边界范围内）或其中两项以上试验结果均在阈值边界范围内，则判定无法确定皮肤致敏性风险。

五、注意事项

“3 选 2 试验”策略的可靠性受组成策略的试验方法的适用性和局限性、原料理化性质等多种因素综合影响，预测结果存在一定的不确定性，需在评估过程中予以说明。例如，采用 h-CLAT 方法时，要求受试物具有可溶性，对正辛醇-水分配系数 (LogKow) >3.5 的原料，易出现假阳性的结果，可采用其他检测该关键事件的试验方法组成策略或选择其他皮肤致敏性评价方法。

虽然每一项试验方法具有明确的阳性结果判定阈值，但接近阈值的检测结果在组成策略时，会降低结论的可信度，通过统计试验方法验证数据可获得阳性判定的阈值边界范围 (**borderline range, BL**)，检测结果在阈值边界范围内的可采用其他检测该关键事件的试验方法组成策略或选择其他皮肤致敏性评价方法。

本指南及附录仅以《化妆品安全技术规范》收录的试验方法作为“3 选 2 试验”策略示例，还可参考国际权威替代方法验证机构及经济合作及发展组织 (OECD) 已验证的方法，如 OECD 化学品测试指南、整合测试与评估策略指导文件等，需说明数据解释程序及不确定分析 (如阈值边界范围等)。

附录 1

直接多肽反应试验 (DPRA)

本方法适用于单一组分(定量组成的物质, 且其中一种主要成分含量至少 80% (W/W))化妆品用化学原料或已知组成成分的多组分原料(定量组成的物质, 且其中一种以上成分含量大于等于 10%, 小于 80%)。

按照 DPRA 的要求开展检测。根据试验结果判定标准, 当采用 1: 10 半胱氨酸多肽和 1: 50 赖氨酸多肽模型判定时, 阳性结果判定值为 6.38%, 阈值边界范围为 4.95%—8.32%; 当采用 1: 10 半胱氨酸多肽模型判定时, 阳性结果判定值为 13.89%, 阈值边界范围为 10.56%—18.47%。结果判定策略如表 2。

表 2 DPRA 结果判定策略表

1: 10 半胱氨酸多肽和 1: 50 赖氨酸多肽模型结果判定				
0% ≤ 消耗百分比的均值 < 4.95%	是	消耗百分比的均值在 3%-10%之间	是	阴性
			否	按 DPRA 要求复测
消耗百分比的均值 > 8.32%	是	消耗百分比的均值 > 10%	是	阳性
			否	按 DPRA 要求复测
4.95% ≤ 消耗百分比的均值 ≤ 8.32%	是	进行第二次试验, 并按照 DPRA 要求判定结果: -如两次结果为阳性, 则判定为阳性; -如两次结果为阴性, 则判定为阴性; -如两次结果均在 4.95%-8.32%之间, 则判定在 阈值边界范围内 。 如两次试验结果不一致, 可进行第三次试验, 并根据 两次一致的结果进行判定 ; 如两次结果均在阈值边界范围内或一次结果在阈值边界范围内、一次阳性结果、一次阴性结果, 则最终判定为在 阈值边界范围内 。		
1: 10 半胱氨酸多肽模型结果判定				
0% ≤ 消耗百分比 <	是	消耗百分比在 9%-17%	是	阴性

10.56%		之间	否	按 DPRA 要求复测
消耗百分比>18.47%	是	消耗百分比>17%	是	阳性
			否	按 DPRA 要求复测
10.56%≤消耗百分比≤18.47%	是	<p>进行第二次试验，并按照 DPRA 要求判定结果：</p> <ul style="list-style-type: none"> -如两次结果为阳性，则判定为阳性； -如两次结果为阴性，则判定为阴性； -如两次结果均在 10.56%-18.47%之间，则判定在阈值边界范围内。 <p>如两次试验结果不一致，可进行第三次试验，并根据两次一致的结果进行判定；如两次结果均在阈值边界范围内或一次结果在阈值边界范围内、一次阳性结果、一次阴性结果，则最终判定为在阈值边界范围内。</p>		

征求意见稿

附录 2

角质细胞荧光素报告基因测试 LuSens 法

本方法适用于可用 LuSens 细胞培养液或 DMSO 配制试验溶液的化妆品用化学原料。

按照 LuSens 的要求开展检测。根据试验结果判定标准，阳性结果判定值为 1.5 倍，阈值边界范围为 1.28—1.76 倍。结果判定策略如表 3。

表 3 LuSens 结果判定策略表

与溶剂对照组相比，诱导倍数 ≥ 1.76 ，有统计学差异；且至少两个连续测试浓度细胞存活率 $\geq 70\%$	是	至少三个测试浓度无细胞毒性	是	阳性			
			否	按 LuSens 要求复测			
与溶剂对照组相比，诱导倍数 < 1.28 ，且至少一个测试浓度细胞存活率 $< 70\%$ （或最大无细胞毒性测试浓度达到 $2000 \mu\text{M}$ ）	否		是	阴性			
			否	与溶剂对照组相比， $1.28 \leq$ 诱导倍数 < 1.76 ，有统计学差异；且至少两个连续测试浓度细胞存活率 $\geq 70\%$	是	至少三个测试浓度无细胞毒性	在阈值边界范围内
按 LuSens 要求至少进行两次平行试验： -如两次结果为阳性，则判定为阳性； -如两次结果为阴性，则判定为阴性； -如两次结果均为 1.28-1.76 之间，则判定在阈值边界范围内。 如两次试验结果不一致，可进行第三次试验，并根据两次一致的结果进行判定；如两次结果均在阈值边界范围内或存在一次在阈值边界范围内、一次阳性结果、一次阴性结果，则最终判定在阈值边界范围内。							

附录 3

人细胞系活化试验 (h-CLAT)

本方法适用于可用 THP-1 细胞培养液、生理盐水或 DMSO 配制试验溶液的化妆品用化学原料，对正辛醇-水分配系数 (LogKow) > 3.5 的化学品，易出现假阴性的结果，需采用其他试验进一步确证受试物的致敏性。由于缺乏机体代谢过程，本方法不适用于对前抗原（即需要通过酶活化的物质）和半抗原（即需要通过氧化活化的物质）物质的致敏性检测。

按照 h-CLAT 的要求开展检测。根据试验结果判定标准，阳性结果判定值 CD86 诱导值为 150%，阈值边界范围为 122%—184%，CD54 诱导值为 200%，阈值边界范围为 157%—255%。结果判定策略如表 4。

表 4 h-CLAT 结果判定策略表

CD54 诱导值≤157% 和 CD86 诱导值≤122%	是			阴性
CD54 诱导值≤255% 和 CD86 诱导值≤184%	是	细胞活性≥50%	否	阴性
			是	在阈值边界范围内
CD54 诱导值>255% 和/或 CD86 诱导值>184%	是	细胞活性≥50%	否	阴性
			是	阳性
按 h-CLAT 要求至少进行两次平行试验： -如两次结果为阳性，则判定为 阳性 ； -如两次结果为阴性，则判定为 阴性 ； -如两次结果均在阈值边界范围内，则判定为 在阈值边界范围内 。 如两次试验结果不一致，可进行第三次试验，并根据 两次一致的结果进行判定 ；如两次结果均在阈值边界范围内或存在一次结果在阈值边界范围内、一次阳性结果、一次阴性结果，则最终判定为 在阈值边界范围内 。				

附录 4

化妆品原料“3 选 2 试验”策略应用示例

注：实例所用数据非真实数据，仅为展示策略步骤

1. 待评估物质信息

无色透明液体， $\text{LogKow} < 3.5$ ，同时符合开展 DPRA、LuSens 和 h-CLAT 试验的要求。其他信息略。

2. “3 选 2” 试验策略示例

步骤一：开展 DPRA 试验，采用 1: 10 半胱氨酸多肽和 1: 50 赖氨酸多肽模型判定结果，检测半胱氨酸和赖氨酸消耗百分比的均值为 30%，结果判定为阳性（消耗百分比的均值 $> 8.32\%$ 且 $> 10\%$ ），中度反应。

步骤二：开展 LuSens 试验，检测结果与溶剂对照组相比，诱导倍数小于 1，且最大测试浓度细胞存活率为 65%，其余测试浓度细胞存活率均大于 70%，结果判定为阴性（与溶剂对照组相比，诱导倍数 < 1.28 ，且至少一个测试浓度细胞存活率 $< 70\%$ ）。

步骤三：由于上述 2 个试验结论不一致，开展 h-CLAT 试验进行确证，检测结果 CD86 诱导值为 200%，CD54 诱导值为 300%，所有测试浓度细胞存活率均大于 80%，结果判定为阳性（CD54 诱导值 $> 255\%$ 和 CD86 诱导值 $> 184\%$ ，细胞活性 $\geq 50\%$ ）。

步骤四：综合 3 选 2 试验结果，DPRA 和 h-CLAT 结论一致，判定该物质致敏性为阳性。

《皮肤致敏性整合测试与评估策略应用技术指南（征求意见稿）》起草说明

为配合开展化妆品安全评估工作，提升和促进安全评估相关技术的应用能力，依据《化妆品安全技术规范（2015年版）》（以下简称《技术规范》）等相关法律法规和规范性文件要求，国家药监局化妆品监管司组织中国食品药品检定研究院（以下称中检院）起草了《皮肤致敏性整合测试与评估策略应用技术指南（征求意见稿）》（以下称《指南（征求意见稿）》）。现将起草的有关情况说明如下：

一、起草原则

《指南（征求意见稿）》要求和规定逐步与国际接轨，对于已经比较成熟的、被国际权威组织认可并应用的方法，原则上予以接受。对某些内容结合我国标准制修订和行业实际应用情况进行具体化和明确化，在尽量提高操作性的同时，兼顾了技术发展的前瞻性。《指南（征求意见稿）》制定过程中还遵循了科学性和合理性、协调性和有效性，通俗性和规范性之间的关系。

二、与我国已有相关标准的关系

《技术规范》中用于检测皮肤变态反应的方法包括：皮肤变态反应试验、皮肤变态反应：局部淋巴结试验：DA（LLNA:DA）、皮肤变态反应：局部淋巴结试验：BrdU-ELISA（LLNA: BrdU-ELISA）、化妆品用化学原料体外皮肤变态反应：直接多肽反应试验（DPRA）、体外皮肤变态反应 氨基酸衍生生化反应试验方法（ADRA）、体外皮肤变态反应 人细胞系活化试验（h-CLAT）、体外皮肤变态反应 U937 细胞激活试验方法（USENS）。其中皮肤变态反应试验、LLNA:DA、LLNA: BrdU-ELISA 均使用动物（豚鼠、小

鼠)进行试验,试验结果能得出受试物的致敏能力和强度,这些结果可在有限的范围内外推到人类。DPRA 和 ADRA 方法针对皮肤致敏性有害结局路径(AOP)中的第一个关键事件进行检测,h-CLAT 和 USENS 方法针对第三个关键事件进行检测。

《指南(征求意见稿)》基于皮肤致敏性 AOP 的机制过程,将《技术规范》中现有替代方法进行有序整合,形成“3选2试验”策略,以弥补单一检测方法的局限性,进一步提高替代试验方法的可靠性和应用水平,为化妆品原料安全评估提供替代试验的毒理学数据。

三、与国际同类标准的关系

2016年,OECD发布了“关于皮肤致敏整合测试与评估方法(IATA)中使用的定义的方法报告和各信息源的指导文件”(Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for skin sensitization),该指导文件中提供了形成 IATA 的原则和框架、确定的方法(Defined Approach, DA)概述和整合策略示例等。2021年,OECD又发布了“皮肤致敏性确定的方法指南”(Guideline No.497 Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitisation),该指南文件明确了“3选2试验”等策略,可用于化学物质皮肤致敏性危害识别。

《指南(征求意见稿)》基本覆盖 OECD No.497 中“3选2”试验策略的内容和原则,结合《技术规范》制修订计划,仅将 OECD 指南中将 KE2 检测方法由 KeratinoSens 替换为 LuSens, LuSens 与 KeratinoSens 同为 OECD TG442D 中认可的 KE2 检测方法,形成策略时 LuSens 的阈值边界范围参考欧盟动物替代方法验证机构 ECVAM 2022 年更新发布的 LuSens 方法操作标准(DB-ALM Protocol No.184 Annex 5)。

四、需要说明的问题

(一) 关于可用的方法。本《指南（征求意见稿）》在参考国际相关技术指南的基础上，结合《技术规范》标准制修订情况，充分考虑行业需求、方法认可情况和可操作、可推广等多方面因素研究制定。

(二) 关于动态更新。随着替代方法等技术逐步发展，国内外标准等不断情况，将继续研究相关评估工具，进一步完善和丰富整合策略。

征求意见稿