

附件 1

90 天经口毒性试验方法（征求意见稿）

90-day Oral Toxicity Study

1 范围

本方法规定了啮齿类动物 90 天经口毒性试验的基本原则、要求和方法。

本方法适用于评价化妆品原料的 90 天经口毒性。

2 试验目的

通过本试验可获得在一定时期内经口重复暴露可能产生的健康危害的信息，了解其作用靶器官、剂量-反应关系、可逆性以及蓄积的可能性，并估计未观察到有害作用水平（NOAEL）和/或观察到有害作用最低水平（LOAEL），为慢性毒性试验剂量、观察指标、毒性终点的选择及建立人体暴露的安全阈值提供依据。

3 定义

3.1 未观察到有害作用水平 no observed adverse effect level（NOAEL）

在规定的试验条件下，用现有的技术手段或检测指标未观察到任何与受试物有关的毒性作用的最大剂量。

3.2 观察到有害作用最低水平 lowest observed adverse effect level（LOAEL）

在规定的试验条件下，受试物引起实验动物组织形态、功能、生长发育等有害效应的最低剂量。

3.3 靶器官 target organ

实验动物出现由受试物引起的明显毒性作用的器官。

3.4 蓄积毒性 cumulative toxicity

机体以低于急性中毒阈值的剂量反复接触受试物，吸收量大于排出量逐渐累积或毒作用累加，引起功能性或器质性损害的能力。

4 试验的基本原则

受试物以不同剂量每日经口给予各组实验动物，至少设立 3 个剂量组和 1 个对照组，每组 1 个剂量水平，连续给予至少 90 d。通过全面的临床观察、血液学、血液生化、大体解剖和组织病理学检查，系统性地确定靶器官、剂量-反应关系，并最终确定 NOAEL 和/或

LOAEL，为慢性毒性研究和人类风险评估提供关键安全性依据。

5 试验方法

5.1 受试物制备

当受试物需使用溶媒配制成溶液或混悬液时，溶媒首选水，其次为植物油（如橄榄油、玉米油等），不溶于水或油的受试物亦可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液或糊状物。如果使用其他溶媒时，必须先了解其毒性特点并说明理由。

5.2 实验动物和饲养环境

5.2.1 动物种系的选择

常规选择啮齿类动物，首选大鼠。一般选用 6~8 周龄 SPF 级大鼠，试验开始时动物体重差异不应超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。若该试验为慢性试验的预备试验，则在两个试验中所用的动物品系应当相同。

5.2.2 动物的性别和数量

每一剂量组实验动物至少应有 20 只（雌雄各半），雌性应为未妊娠和未经生产的动物。试验结束时的动物数需达到能够有效评价受试物毒性作用的数量。应在对照组和最高剂量组各增加 10 只动物（雌雄各半），作为恢复期卫星组。若计划在试验过程中处死动物，则至少应设对照组和最高剂量组的中期卫星组，每组至少 10 只动物（雌雄各半）。

5.2.3 动物饲养

实验动物及动物试验环境、饲料、饮水应符合国家相应规定。试验期间，动物自由饮水和摄食。动物按组别、性别分笼饲养，每笼动物数量应满足动物最低需要的空间，不影响动物自由活动和观察动物的体征为宜。

5.3 剂量设计

剂量设计参考 28 天重复剂量经口毒性试验剂量或急性经口毒性 LD_{50} 剂量，也可开展剂量范围探索研究。试验时至少设 3 个剂量组和 1 个对照组。除不接触受试物外，对照组的其他条件均与试验组相同。最高剂量的设计应在引起毒效应的前提下又不造成动物死亡或严重反应，否则将会影响结果的评价。低剂量水平应不出现任何毒性作用。若掌握人群接触水平，则最低剂量应高于人群的实际接触水平。中间剂量可引起较轻的可观察到的毒性作用。若设置多个中间剂量组，则各组的剂量应引起不同程度毒性作用。各剂量的组间距以 2~4 倍为宜，一般不超过 10 倍。

5.4 限值试验

在本项试验中，如果剂量超过 1000mg/kg BW/d 的限值时仍未产生可观测到的毒性效应，且可依据结构相似化合物已有信息预期受试物毒性时，可考虑不必进行 3 个剂量水平的全面试验。除非预期的人体暴露量表明需要更高剂量，否则应采用限值试验。

5.5 受试物给予

试验开始前至少要有 5 d 检疫期并使实验动物适应实验室饲养环境。实验动物随机分组。可通过灌胃、掺入饲料或饮水途径给予受试物。原则上动物每周 7 d 给予受试物，连续至少 90 d。试验期间所有动物给予受试物的方式应完全相同。若为给予受试物的目的加入其他溶剂或添加剂，这些溶剂或添加剂不应影响受试物的吸收或引起毒性作用。恢复期卫星组动物于给予受试物 90 d 后停止接触受试物。

5.5.1 灌胃法

灌胃体积一般不超过 10 mL/kg BW，且各组的灌胃体积相同，每日在大致相同时间灌胃，前 4 周每周称重 2 次，之后每周称重 1 次，根据体重调整灌胃体积。如为水溶性的受试物，最大灌胃体积可达到 20 mL/kg BW。如为油性液体，灌胃体积应不超过 4 mL/kg BW。当受试物使用溶媒配制时，对照组应给予相同体积的溶媒。

5.5.2 掺入饲料法

以不影响动物摄食、营养平衡为原则，将受试物与饲料充分混匀并保证受试物配制物的稳定性和均一性。受试物掺入量一般不超过 5% (w/w)，>5% 时需调整饲料营养素水平，使各剂量组与对照组饲料营养素水平一致。必要时可设置未处理对照组，以区分是由于适口性差还是由于毒性反应导致的食物摄入量减少。

5.5.3 掺入饮水法

以不影响动物饮水量为原则，将受试物与水混匀并保证溶液的稳定性及均一性。每日新鲜配制。

5.6 观察指标

5.6.1 临床观察

观察时间应至少为 90 d。恢复期卫星组动物在给予受试物结束后继续观察至少 28 d（具体时限应根据观察到的效应适当调整），不作任何处理，以了解毒性作用的可逆性、持续性及迟发性。每日应至少观察动物 1 次，观察时间段尽量相同，或在预期毒性反应出现的时间段观察，记录毒性反应的症状、发生时间、持续时间等。如果出现毒性反应，则应适当增加每日观察次数。

观察应至少包括如下内容：皮肤和被毛的改变、眼和黏膜变化、呼吸、循环、植物神经和中枢神经系统、肢体运动和行为活动等改变。

5.6.2 体重、摄食量及饮水消耗量

应记录每周动物的体重，计算每周动物的摄食量。当采用饮水法给予受试物时，应准确记录动物每周饮水量。如受试物经掺入饲料或饮水给予动物时，应计算和报告受试物各剂量组实际摄入剂量 (mg/kg BW)。

5.6.3 眼科检查

在首次给予受试物前、末次给予受试物后及恢复期观察结束时，至少应对最高剂量组和

对照组动物进行眼科检查。若发现动物有眼科变化，则应对所有动物进行检查。

5.6.4 临床检查

试验结束后，动物应禁食过夜，麻醉后采血，用于血液学、血液生化检查。

5.6.4.1 血液学检查

在中期观察结束（如有设置）、试验结束、恢复期结束时进行检查。应测定血细胞比容、血红蛋白浓度、红细胞计数、网织红细胞计数、白细胞计数和分类、血小板计数、凝血功能（凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间，必要时可增加凝血酶时间和纤维蛋白原）。

5.6.4.2 血液生化检查

在中期观察结束（如有设置）、试验结束、恢复期结束时进行检查。血清或血浆检查指标包括电解质平衡、碳水化合物代谢、肝功能、肾功能等方面，具体指标包括：钠、钾、葡萄糖、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、尿素、尿素氮、肌酐、总蛋白和白蛋白、总三碘甲状腺原氨酸、总甲状腺素、促甲状腺刺激激素，以及至少两种反映肝功能的酶（如丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、 γ -谷氨酰基转移酶和山梨醇脱氢酶等）。

根据受试物的毒性特征和临床表现，必要时可测定其他酶（肝脏或其他来源）、胆汁酸、总胆红素、其他激素（如睾酮、雌二醇、卵泡刺激素、黄体生成素）。

如果受试物的已知特性可能或被怀疑会影响相关代谢谱，还应进行以下指标测定：钙、磷、甘油三酯、特定激素、高铁血红蛋白和胆碱酯酶等。

此外，还可根据所观察到的毒性作用进行其他更大范围的血液生化检查，以便进行全面的毒性评价。

5.6.5 尿液检查

一般不需要进行。只有当怀疑存在或观察到相关毒性作用时方需进行尿液检查，在试验结束时建议采用代谢笼收集动物尿液，记录尿液外观，测定尿比重、pH、尿蛋白、尿糖和潜血等。

5.6.6 本底资料

如本实验室同物种、同品系且采集条件相似的历史性本底资料不够充分时，必要时可在试验开始前考虑进行血液学和血液生化学指标的测定。

5.6.7 病理检查

5.6.7.1 大体解剖

所有动物均应进行全面的大体解剖，内容包括动物的外观、所有孔道，颅腔、胸腔、腹腔及其内容物。观察并记录大体解剖出现异常的脏器。

需要剖检的脏器有：脑（大脑、小脑、延髓/脑桥）、脊髓（包括颈、胸、腰段）、垂体、甲状腺、甲状旁腺、胸腺、食管、唾液腺、胃、大肠和小肠（十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠）、肝、胰、肾、肾上腺、脾、心脏、肺（含气管）、主动脉、卵巢、子宫、子宫颈、阴道、睾丸、附睾、前列腺+精囊（含凝固腺）、乳腺、膀胱、有代表性的淋

巴结（一个与受试物给予途径相关，另一个在较远距离）、坐骨神经、骨骼肌、胸骨（包括骨髓）、股骨（包括关节面）、皮肤、眼（如眼科检查中观察到异常）和病变组织。将上述组织和器官保存在固定液中，以便日后进行病理组织学检查。

需称量的脏器有：肝、肾、肾上腺、睾丸、附睾、前列腺+精囊（含凝固腺）、子宫、卵巢、胸腺、脾、脑、心脏、甲状腺、垂体。并计算脏器系数（以 g/100g BW 或 mg/100g BW 表示）。上述脏器应在分离后尽快称重以防水分丢失。

当受试物毒性作用提示可能为靶器官时，且未包含在上述已列出的脏器范围内，也需要剖检并进行组织病理学检查。

当受试物可能有内分泌效应时，应关注内分泌敏感指标。必选指标有睾丸、附睾、肾上腺、前列腺+精囊（含凝固腺）、子宫、卵巢、垂体、甲状腺的重量和甲状腺（含甲状旁腺）、肾上腺、垂体、睾丸、附睾、前列腺+精囊（含凝固腺）、卵巢、子宫、子宫颈、阴道、乳腺组织的病理学检查，以及阴道涂片（剖检时采集）。可选指标有胰岛的组织病理学检查，及精子参数分析（包括精子数量、精子形态学和精子活力测定）。上述分析可仅限于最高剂量组和对照组动物，但若观察到与受试物相关的内分泌效应，则应对所有动物进行检查。

5.6.7.2 病理组织学检查

应对下述组织和器官进行检查：

（1）所有最高剂量组和对照组动物的上述组织和器官，如最高剂量组动物的组织或器官有病理组织学病变，则应扩展至其他剂量组动物相应的组织和器官。

（2）各剂量组动物大体解剖肉眼观察有异常的组织或器官。

（3）各剂量组动物的靶器官。

（4）在受试物剂量组出现毒性作用的组织或器官，恢复期卫星组应对其进行病理组织学检查。

6 试验结果的评价

6.1 结果的处理

所有数据应通过表格形式汇总，显示试验开始时各组动物数、试验期间死亡或人道处死的动物数量及时间、出现毒性症状的动物数和症状描述（包括出现时间、持续时间和严重程度），以及出现病变的动物数、病变类型及各类型病变动物的百分比。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阶段予以确定。

6.2 结果评价

90 天经口毒性试验结果应结合前期试验结果，并结合毒性效应指标、大体解剖结果及病理组织学检查结果进行综合评价。安全性评价应包括受试物给予剂量与是否出现毒性反应、是否有蓄积毒性、毒性反应的发生率及其程度之间的关系。这些反应包括行为或临床异常、体重、摄食量、肉眼可见的损伤、靶器官、临床检查、病理检查以及其他一般或特殊的

毒性作用。在综合分析的基础上得出 90 天经口毒性的 NOAEL 和/或 LOAEL，为慢性毒性试验的剂量、观察指标的选择提供依据。

7 试验结果的解释

90 天经口毒性试验能够提供受试物在经口反复接触时的毒性作用资料。其试验结果仅在很有限的程度上外推到人，但它可为确定人群安全接触水平或健康指导值提供有用的信息。

90 天经口毒性试验方法（征求意见稿）起草说明

为加强化妆品的监督管理，进一步提高化妆品使用安全性，国家药监局化妆品标准化技术委员会组织开展了《90 天经口毒性试验方法》的修订工作。现就工作有关情况说明如下：

一、起草原则

本方法的修订在充分考虑动物福利的前提下，本着规范性、科学性、合理性、可操作性和实用性的原则，在《化妆品安全技术规范》（2015 年版）亚慢性经口毒性试验的基础上，结合经济合作发展组织（OECD）No.408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents、《28 天重复剂量经口毒性试验方法》（国家药监局 2024 年第 12 号通告）、《食品安全国家标准 90 天经口毒性试验》（GB 15193.13-2015），以及起草单位开展亚慢性经口毒性试验的经验，对受试物剂量设计、受试物给予、临床观察、血液学检查指标、血液生化检查指标、尿液检查、病理检查指标等方面进行具体化和明确化，突出体现适用性与可操作性。

二、起草过程

国家药监局化妆品标准化技术委员会于 2025 年 1 月委托开展亚慢性经口毒性试验的修订工作。起草单位在收集国内外有关重复剂量经口、经皮毒性评价的标准、规范及相关文献资料的基础上，起草了本标准文本及起草说明，形成方法草案。2025 年 9 月通过化妆品标准化技术委员会安全评价分技术委员会初审。起草单位根据初审结论对标准草案进行修改完善。

三、与我国已有相关标准的关系

本方法在《化妆品安全技术规范》（2015 年版）亚慢性经口毒性试验的基础上，结合我国已发布的国家标准《食品安全国家标准 90 天经口毒性试验》（GB 15193.13-2015）、《28 天重复剂量经口毒性试验方法》（国家药监局 2024 年第 12 号通告），主要针对化妆品原料的特点，结合既往工作经验和研究基础，细化相关技术指标，最终完善评价程序和试验方法，以保证标准的统一性、科学性和先进性。

四、与《规范》中原方法的对比情况

本方法同《规范》中原方法比较，修订的《90 天经口毒性试验方法》修改了标题、试验目的、定义、试验的基本原则、试验动物的要求、剂量设计、受试物给予、临床观察、眼科检查、临床检查指标、尿液检查、病理检查指标等内容。

五、国际相关标准情况

本方法以 OECD 2025 年 6 月发布的 No.408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in

Rodents 为依据进行修订，结合国内实验条件及操作的具体情况，撰写的方法内容基本涵盖了实验对象、实验操作和结果分析的技术要求。