

附件 2

90 天经皮毒性试验方法（征求意见稿）

90-day Dermal Toxicity Study

1 范围

本方法规定了动物 90 天经皮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 天经皮毒性。

2 试验目的

通过本试验可获得在一定时期内经皮肤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皮给予各组实验动物，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等，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

若受试物为固体，应将其粉碎并用水，或无皮肤刺激性、不影响受试物经皮吸收的溶媒和/或赋形剂充分湿润，以保证受试物与皮肤有良好的接触。若采用介质，应考虑该介质对

受试物皮肤通透性的影响。液体受试物一般采用原样，根据剂量设计选用适宜的溶剂稀释后（若需）进行试验。

5.2 实验动物和饲养环境

5.2.1 动物种系的选择

可采用成年大鼠、兔或豚鼠进行试验，也可使用其他种属的动物，但需说明理由。建议试验开始时实验动物的体重范围为：大鼠200~300 g（不超过9周龄）；兔2.0~3.0 kg；豚鼠350~450 g。试验开始时同性别体重差异应在平均体重的±20%之内。当该试验作为慢性试验的预备试验时，则在两项试验中所使用的动物品系应当相同。

5.2.2 动物的性别和数量

主试验组每一剂量组实验动物数，啮齿类一般不少于10只/性别，非啮齿类一般不少于5只/性别，皮肤健康完整。雌性应为未妊娠和未经产的动物。应至少在对照组和最高剂量组增加动物作为恢复期卫星组，若计划在试验过程中处死动物则每个组别增加动物，啮齿类一般不少于5只/性别，非啮齿类一般不少于2只/性别。

5.2.3 动物饲养

实验动物及动物试验环境、饲料、饮水均应符合国家相应规定。试验期间，动物自由饮水和摄食。给予受试物期间，建议动物单笼饲养。

5.3 剂量设计

试验剂量的设计可参考急性经皮毒性LD₅₀剂量、预试验剂量或相关结构化合物经皮毒性剂量进行。试验时至少要设3个剂量组和1个对照组。如果需要，还应设置溶媒和/或赋形剂对照组。本方法采用等面积给予受试物的方式，即动物在相同体表面积的皮肤区域（如背部脱毛区）给予受试物，应记录受试物浓度（mg/mL或%）和单位面积涂敷量（mg/cm²）。在暴露部位面积不变的情况下，应通过改变受试物浓度进行剂量调整，而不应通过增加厚度或体积来达到增加受试物剂量的目的。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致造成动物死亡或严重反应。低剂量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。

若受试物引起严重的皮肤刺激效应，则应降低受试物的使用浓度，尽管这样可导致原来在高剂量下出现的其他毒性作用减弱或消失。若在试验早期动物的皮肤受到严重损伤，则有必要终止试验，并使用较低的浓度重新开始试验。

5.4 限值试验

本项试验中，如果剂量超过1000 mg/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

动物在试验前至少要在实验室饲养环境中适应5 d时间。给予受试物前24 h，将动物躯干背部受试物暴露区的被毛剪掉或剃除。大约每周要对受试物暴露部位去毛。在使用剪刀或剃刀进行去毛时应特别小心，以防损伤动物的皮肤而引起皮肤通透性的改变。受试物暴露部位的

面积不应小于动物体表面积的 10%，应通过动物体重确定受试物暴露部位的面积。若受试物毒性较大，则可相对减小受试物暴露区域的面积，但受试物应尽可能薄而均匀地涂敷于整个受试物暴露区域。在给予受试物操作期间应采用合适的装置（如透气性胶带、纱布、无刺激性封闭套）封闭受试物暴露区域，以保证受试物与皮肤有良好的接触，并防止受试物脱落和动物舔食。

实验动物每周 7 d 每天经皮暴露 6 h，连续至少 90 d。给予受试物结束后用温水轻柔擦拭受试物暴露部位皮肤，去除残留受试物；脂溶性受试物可先用植物油（如橄榄油、玉米油等）擦拭再用温水洗净。恢复期卫星组动物于给予受试物 90 d 后停止暴露。

5.6 观察指标

5.6.1 临床观察

观察时间至少为 90 d。恢复期卫星组在实验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、眼和粘膜变化、呼吸、循环、植物神经和中枢神经系统、肢体运动和行为习惯等改变。应计算每周饲料消耗量，记录每周体重变化。

5.6.2 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，若发现眼科变化则应对所有动物进行检查。

5.6.3 临床检查

试验结束后，动物应禁食（不同动物品系采用不同的禁食期），麻醉后采血用于血液学、血液生化检查。

5.6.3.1 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（如凝血酶原时间、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）。

5.6.3.2 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。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。

5.6.3.3 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。

5.6.3.4 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血液学和血液生化学指标的测定。

5.6.4 病理检查

5.6.4.1 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、小肠和大肠（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、胆囊（如存在）、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（正常皮肤和受试物暴露区的皮肤）、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。

需要称量的脏器有：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。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、乳腺的组织病理学检查，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。

5.6.4.2 病理组织学检查

应对下述组织和器官进行病理组织学检查：

（1）所有最高剂量组和对照组动物上述组织和器官，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天经皮毒性试验结果应结合前期试验结果，并结合毒性效应指标、大体解剖和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天经皮毒性的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天经皮毒性试验能够提供受试物在经皮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天经皮毒性试验方法（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天经皮毒性试验方法》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）亚慢性经皮毒性试验的基础上，结合经济合作发展组织（OECD）No.411: Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study和No.408: Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents，以及相关试验经验，对受试物剂量设计、给予方法、检测指标等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皮毒性试验的修订工作。起草单位通过查阅国内外相关文献资料等，结合以往工作经验和研究基础，形成方法草案。后委托3家省级药品检验机构对标准文本及方法修订对照表进行标准复核。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）亚慢性经皮毒性试验的基础上，结合试验实际情况及化妆品原料安全性评价的要求，参考国内和国际上关于亚慢性经皮毒性试验指导原则进行了修订，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

与《规范》中原方法比较，修订的《90天经皮毒性试验》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、剂量设计和分组、临床检查指标、病理检查指标等内容。

五、国际相关标准情况

亚慢性经皮毒性试验的国际相关标准主要由OECD制定，其发布的No.411: Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study是国际上广泛认可的标准，该标准规定了亚慢性经皮毒性试验的范围、术语和定义、试验基本原则、试验方法、试验数据和报告等内容。但OECD No.411目前仍为1981年5月12日发布的版本，截至2025年9月，尚未有更新记录。OECD No.408: Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents于2025年6月进行了更新。