附件5

**化妆品原料免疫毒性试验**

**研究技术指导原则**

中国食品药品检定研究院

**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 2

（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

一、概述

[免疫系统](https://baike.so.com/doc/5404909-5642666.html%22%20%5Ct%20%22https%3A//baike.so.com/doc/_blank)是机体执行免疫防控及免疫应答的重要系统，由免疫器官（脾脏、胸腺、扁桃体等）、免疫细胞（淋巴细胞、巨噬细胞、树突状细胞等）和免疫活性物质（抗体、细胞因子、补体等）组成。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物质对机体免疫系统产生的不良影响及机理。

本指导原则参照人用药品注册技术要求国际协调会（ICH）《人用药物免疫毒性研究》、欧洲药品评价局（EMEA）《重复剂量毒性》等相关内容，并结合化妆品原料安全评价的特点进行制定。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，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”）的证据权重分析来确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。如初筛试验出现阳性或可疑结果，应考虑进行附加的免疫毒性试验研究。

**（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

 剖检时应评价所有器官/淋巴组织的大体病理学改变，并称量记录胸腺、脾脏、肾上腺的重量，可根据具体情况选择黏膜附近的淋巴结或周围淋巴结进行称量。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。

1. 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。

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 淋巴细胞试验，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腘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与收益决策。在这种情况下，进一步的试验可能有助于为风险与收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.(2005.9)

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 Immuno-

toxicology 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 Inmunotoxicity 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](https://www.so.com/link?m=bTW3g3s4351TTKUIlUyBHlZKISH7nzC4H6gk2K1QWgWeKOAq9v+jA1pB1Fn3Qlo5fKJGtFxG2LZf0EU3H5RV/96RiXbXLtbGq+QXvpmLK/SoDh/QfV1rebrt/RuGh+iGa+U75Eg629hH0RQYPZVtAHji+/HR+Zhq0G4cT0XSGfyQsvPzOqAZSzewYseQlR7jheKkjtTA3BIHfy4pL28KjOBBf629pqMPS" \t "https://www.so.com/_blank).免疫毒性试验指南（案）[S].2004:1

13.EMEA: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](https://baike.so.com/doc/6589278-6803054.html%22%20%5Ct%20%22https%3A//baike.so.com/doc/_blank)的抑制作用。[免疫力低下](https://baike.so.com/doc/6723546-6937672.html%22%20%5Ct%20%22https%3A//baike.so.com/doc/_blank)容易受到[细菌](https://baike.so.com/doc/5403235-5640924.html%22%20%5Ct%20%22https%3A//baike.so.com/doc/_blank)、病毒、真菌等感染，甚至容易长肿瘤。

1. 免疫刺激（[immunostimulation](http://www.baidu.com/link?url=FEzsL56jCgjNjJUMNm5i9gQQsCPiHxTcXgf8Qen1u5M6s7l31-bB2vVOCEHxMQSDcVNOaT-MmG1gAOvxWEXF-np2QJX7mP60Af9XbB3Mo009Y94xW3qAtilJwKkE8h3r" \t "https://www.baidu.com/_blank)）

是指对于[免疫应答](https://baike.so.com/doc/6589278-6803054.html%22%20%5Ct%20%22https%3A//baike.so.com/doc/_blank)的刺激作用。通常指激活非特异性免疫，增强机体免疫应答。