

附件 5

免疫毒性试验方法

Immunotoxicity test

1 范围

本方法规定了动物免疫毒性试验的基本原则、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

本方法用于评价化妆品原料免疫毒性反应的潜在可能性。

3 定义

3.1 免疫毒性 immunotoxicity

受试物对机体免疫系统结构与功能造成损害作用的能力，包括机体免疫系统的组织或器官损伤、免疫功能的抑制或增强。

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 细胞介导的细胞毒性作用。

4 试验的基本原则

本方法用于评价受试物是否改变或损伤免疫系统的机能状态。免疫毒性试验应分层级开展，初始筛选免疫毒性试验是在重复剂量毒性试验免疫毒性相关检查基础上增加淋巴细胞亚群分布、免疫球蛋白含量测定等项目。初始筛选试验提示存在免疫毒性风险时，则需开展附加免疫毒性试验。

附加免疫毒性试验时，给予不同剂量组受试物至少 28 d，每天对动物进行观察，记录所出现的任何临床毒性表现。给予受试物结束后处死动物，对相应的评价指标进行检测或

分析。

5 初始筛选免疫毒性试验

5.1 初始筛选试验方法

采用初始筛选免疫毒性试验，对受试物潜在免疫毒性进行初步评估。初始筛选试验可整合至重复剂量毒性试验中。为发现免疫毒性指征，需评价以下指标：

（1）血液学检查：白细胞总数及分类计数等。

（2）血液生化检查：球蛋白、白蛋白/球蛋白比值。

（3）大体病理学检查：淋巴器官/组织。

（4）脏器重量/脏器系数：胸腺、脾脏的湿重，必要时可选代表性淋巴结进行称重，并计算脏器系数。

（5）组织病理学检查：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（黏膜附近或周围淋巴结）、所有肉眼可见的损伤。

此外，免疫毒性初始筛选试验还应增加以下指标的检测：

（1）免疫球蛋白分类（IgG、IgM、IgA 和 IgE）水平测定。

（2）淋巴细胞亚群测定：该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，通常采用流式细胞仪测试。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；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。

5.2 试验结果的评价

初始筛选试验结果，应基于淋巴细胞亚群分布、免疫球蛋白分类的结果，并考虑重复剂量毒性试验中的免疫毒性相关检查，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、淋巴结）等结果进行综合评价。上述检查项目出现异常时，即受试物各剂量组与溶剂对照组比较存在统计学上的显著差异（但应考虑动物正常的参考范围和变化，存在毒理学意义的改变），提示受试物存在潜在免疫毒性风险，应开展附加免疫毒性试验研究，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。

6 附加免疫毒性试验

附加免疫毒性试验包括：体液免疫、特异性细胞免疫、巨噬细胞检测、NK 细胞活性四个方面，每个方面应至少选择一种试验方法进行。

6.1 体液免疫试验

给予受试物后用抗原免疫动物，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。

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

6.1.1.1 受试物

固体受试物应溶解或悬浮于合适的溶剂中，临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/或临用前稀释至适当浓度。受试物应在临用前新鲜配制，否则须确认贮存不影响其稳定性。

6.1.1.2 实验动物及饲养环境

6.1.1.2.1 动物种系的选择

选用健康啮齿类动物，推荐使用小鼠（近交系）或大鼠。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。雌性动物应未孕、未产。试验开始时每一性别的动物体重差异应控制在 $\pm 20\%$ 内。

6.1.1.2.2 动物的性别和数量

每一个剂量组和对照组至少应该有 20 只动物（雌雄各半）。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。

6.1.1.2.3 饲养环境

实验动物和实验动物设施应符合国家相应规定。选用标准配合饲料，不限制饮水量。

6.1.1.3 剂量分组

至少要设三个剂量组、一个溶剂对照组和一个阳性对照组，如果受试物采用未知免疫毒性的溶剂时，还应设立一个不作任何处理的空白对照组。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。阳性对照组可选用已知的免疫抑制剂（如环磷酰胺等）作为阳性对照物。

6.1.1.4 受试物给予

开始给予受试物前至少要有 3 ~ 5 d 时间使实验动物适应实验室饲养环境。实验动物随机分组。受试物或溶剂经口和/或经皮和/或经吸入给予，给予受试物途径一般与 90 d 重复剂量毒性试验的途径一致。每周给予受试物 7 d，至少 28 d。

6.1.1.5 临床观察

试验期间，每天对动物至少进行 1 次临床观察，记录毒性症状的出现时间、严重程度及其持续时间。观察应包括但不限于以下方面：皮肤、被毛；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。动物给予受试物前称体重，之后每周 1 次，处死前再次称体重。

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

6.1.1.6 试验方法

给予受试物结束前 4 d，经静脉注射 T 细胞依赖性抗原绵羊红细胞（SRBCs），通过计数动物脾脏中特异性抗体生成细胞的数量来反映抗体的产量，可用于检测受试物对脾脏

内产生抗体的细胞的毒性作用。试验时，应考虑如下因素：

(1) 注射 T 细胞依赖性抗原 SRBCs，应对动物注射抗原后测定 PFC 的最佳时间作出评价。

(2) 测定每批补体的活性。

(3) 使用双盲法进行 PFC 计数。

(4) 测定脾细胞的活性。

6.1.2 免疫球蛋白定量测定

6.1.2.1 受试物、实验动物、剂量分组、受试物给予方式及临床观察

同 6.1.1.1 ~ 6.1.1.5。

6.1.2.2 试验方法

在给予受试物结束前 4 d，用牛血清白蛋白免疫动物，2 周后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（通常选择 3 ~ 5 个），以便对受试物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给予时间至少为 28 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。该试验评价受试物是否影响抗体对抗原的反应性。

6.2 特异性细胞免疫试验

采用下列 3 种试验方法中的任一种进行试验，评价给予受试物至少 28 d 对特异性细胞免疫反应的影响。如选择淋巴细胞增殖试验或细胞毒性 T 淋巴细胞检测，可与 NK 细胞活性共用一组动物。

6.2.1 淋巴细胞增殖试验

6.2.1.1 受试物、实验动物、剂量分组、受试物给予方式及临床观察

同 6.1.1.1 ~ 6.1.1.5。

6.2.1.2 试验方法

可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 MTT、BrdU-ELISA/FCM 等方法。该方法可以证明给予受试物至少 28 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。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受试物组动物的脾细胞，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) 刺激细胞来自未给予受试物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，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。受试物组与对照组差异的百分比表示为： $[1 - (\text{受试物组 nCPM} / \text{对照组 nCPM})]$ 。

(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，给予已知的免疫抑制剂。

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

6.2.2.1 受试物

同 6.1.1.1。

6.2.2.2 实验动物及饲养环境

选用近交系小鼠，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。雌性动物应未孕、未产。动物 6~8 周龄时开始试验，试验开始时每一性别的动物体重差异应控制在 $\pm 20\%$ 内。

动物的性别和数量、饲养环境同 6.1.1.2。

6.2.2.3 剂量分组、受试物给予方式及临床观察

同 6.1.1.3~6.1.1.5。

6.2.2.4 试验方法

在给予受试物结束前 4 d，用牛血清白蛋白致敏动物，1~2 周后用相同的抗原进行激发，激发后 24~48 h，比较受试物组和对照组 DTH 反应的差异，以激发前后反应的差值来表示 DTH 的程度。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。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，如耳肿胀法、足跖增厚法等，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，应对动物给予受试物至少 28 d。

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

6.2.3.1 受试物、实验动物、剂量分组、受试物给予方式及临床观察

同 6.1.1.1~6.1.1.5。

6.2.3.2 试验方法

该方法用于证明给予受试物至少 28 d 对 CTL 生成的影响。常取动物脾淋巴细胞进行细胞毒性 T 淋巴细胞试验，检测采用放射免疫法或流式细胞术。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，来自受试物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 4 h 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，考虑如下因素：

(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。

6.3 NK 细胞的活性

6.3.1 受试物、实验动物、剂量分组、受试物给予方式及临床观察

同 6.1.1.1 ~ 6.1.1.5。

6.3.2 试验方法

建议采用 Reynolds 和 Herberman 的微量培养法来检测给予受试物至少 28 d 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。微量培养法是将受试物组和对照组动物的脾细胞与 ^{51}Cr 标记的 YAC 淋巴瘤细胞共培养。靶细胞与效应细胞共培养 4 h 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。LDH 释放法是将受试物组和对照组动物的脾细胞与靶细胞（YAC 细胞）共培养。靶细胞与效应细胞共培养 4 h 后，靶细胞中释放的乳酸脱氢酶含量可用于表示 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无效应细胞存在时，靶细胞释放放射性标记物或乳酸脱氢酶的本底量以及放射性标记物或乳酸脱氢酶总的释放量。

(2) 试验可使用除 YAC 细胞之外的靶细胞，任何情况下都应测定靶细胞的存活力。

(3) 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；如果对所选用的方法作了一些修改，则应说明修改的科学性和合理性。

6.4 巨噬细胞检测

6.4.1 受试物、实验动物、剂量分组、受试物给予方式及临床观察

同 6.1.1.1 ~ 6.1.1.5。

6.4.2 试验方法

评价给予受试物至少 28 d 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）存在的条件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，推荐鸡红细胞吞噬法和流式细胞法，也可采用

巨噬细胞溶酶体酶测定、巨噬细胞表面受体检测法等，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，则应说明修改的科学性和合理性。

6.5 结果处理

(1) 对于计数资料，表格应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。

(2) 对于计量资料，一般采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， $F \text{ 值} < F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； $F \text{ 值} \geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个试验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

(3) NK 细胞活性需进行数据转换， $X = \sin^{-1} \sqrt{P}$ ，式中 P 为 NK 细胞活性，用小数表示，然后再进行方差分析。

(4) 以吞噬百分率或吞噬指数表示巨噬细胞的吞噬能力。吞噬百分率需进行数据转换， $X = \sin^{-1} \sqrt{P}$ ，式中 P 为吞噬百分率，用小数表示，然后再进行方差分析。

6.6 结果评价

附加免疫毒性试验研究的结果应与初始筛选试验结果一起评估。在评价时应综合考虑生物学意义和统计学意义。评估包括：

(1) 对异常指标进行综合分析：与溶剂对照组比较是否存在统计学的显著差异，是否在背景数据范围内波动，受试物的剂量与异常指标的发生与否、发生率和严重性之间的关系，以及指标的相互关联性等，判断受试物是否引起了某一方面免疫功能异常。

(2) 受试物组体液免疫试验、特异性细胞免疫试验、巨噬细胞检测、NK 细胞活性四个方面中任一试验结果出现异常，均认为该受试物具有潜在的免疫毒性。

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。