附件1

**皮肤变态反应试验技术指导原则**

**（征求意见稿）**

中国食品药品检定研究院

2023年5月

目 录

[一、概述 1](#_Toc127013428)

[二、基本原则 1](#_Toc127013429)

[三、基本内容 2](#_Toc127013430)

[**（一）实验动物的选择、管理** 2](#_Toc127013431)

**(二) 实验动物数量**..........................................................................................2

[**（三）受试物的配制** 2](#_Toc127013432)

[**（四）受试物剂量的设计** 2](#_Toc127013433)

[**（五）对照组的设置**](#_Toc127013434) 3

**（六）诱导接触和激发接触**...........................................................................3

[四、结果评价](#_Toc127013437) 4

[**（一）局部封闭涂皮试验（Buehler Test, BT）** 4](#_Toc127013438)

[**（二）豚鼠最大值试验 (Guinea Pig Maximinatim Test , GPMT)**](#_Toc127013439) 4

[五、参考文献](#_Toc127013441) 5

[六、术语和释义](#_Toc127013442) 5

[七、附录](#_Toc127013443) 5

一、概述

皮肤变态反应（skin sensitization ，allergic contact dermatitis）是皮肤对一种物质产生的免疫原性皮肤反应。在人类这种反应可能以瘙痒、红斑、丘疹、水疱、融合水疱为特征。动物的反应不同，可能以皮肤红斑和水肿为特征。

皮肤变态反应试验旨在确定重复接触化妆品原料或产品对哺乳动物是否可引起变态反应及其程度。为化妆品原料或产品安全性毒理学试验的重要组成部分。

本指导原则根据《化妆品注册备案管理办法》、《化妆品注册备案资料管理规定》、《化妆品新原料注册备案资料管理规定》、《化妆品注册和备案检验工作规范》等要求制定，适用于化妆品和新原料的研究及安全评估。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，随着科学研究的进展，本指导原则中的相关内容将不断完善与更新。

二、基本原则

皮肤变态反应试验应在遵循安全性评价普遍规律的基础上，结合受试物的特点，进行规范性试验，对试验结果进行全面分析评价。

试验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。

本指导原则仅阐述皮肤变态反应试验需要重点关注的问题，试验时需具体情况具体分析。

三、基本内容

**（一）****实验动物的选择、管理**

一般选用健康、成年雄性或雌性豚鼠，雌性动物应未孕或未曾产仔。实验动物环境应与动物等级相匹配并符合国家相应规定。实验动物饲料应选用标准配合饲料，需注意补充适量维生素C。

**（二）实验动物数量**

局部封闭涂皮试验:试验组至少20只，对照组至少10只。豚鼠最大值试验：试验组至少10只，对照组至少5只。如

果试验结果难以确定受试物的致敏性，应增加动物数，试验组至少20只，对照组至少10只。

**（三）受试物的配制**

对于化妆品终产品，可选择原样或按照产品使用方法配制受试物，并明确配制方法和使用浓度。当一种产品含有两个或两个以上部分，分别和/或混合检验的样品，应根据实际检验部分列出所有受试物和对应部分,并设阴性对照。

对于化妆品新原料，根据原料特性，选择原物或根据原料的溶解性选择适宜的溶剂进行配制或稀释，并设阴性对照。

**（四）****受试物剂量的设计**

在正式试验前需进行预试验，诱导接触受试物浓度为能引起皮肤轻度刺激反应的最高浓度，激发接触受试物浓度为不能引起皮肤刺激反应的最高浓度。

**（五）对照组的设置**

试验时应同时设置阳性对照、阴性对照。

1.阳性对照组：

在实验室开展变态反应试验初期，或使用新的动物种属或品系时，需同时设阳性对照组。使用已知的能引起轻度/中度致敏的阳性物每隔半年检查一次。激发接触后24h、48h，局部封闭涂皮法均至少有30%动物出现皮肤过敏反应；皮内注射法均至少有60%动物出现皮肤过敏反应。

2.阴性对照组：

在诱导接触时仅涂以溶剂作为对照，在激发接触时涂以受试物。对照组动物和受试物组动物必须为同一批。

**（六）诱导接触和激发接触**

1. 局部封闭涂皮试验（Buehler Test, BT）

取受试物样品约0.2 mL（g）于0d、7d、14d诱导三次。末次诱导后14-28d激发。对照组同法操作。

2. 豚鼠最大值试验 (Guinea Pig Maximinatim Test , GPMT)

采用皮内注射0.1 mL相应的溶液进行第一次诱导。第一次诱导后的第7d，用涂有0.5g(mL)受试物的滤纸敷贴，进行第二次诱导。对无皮肤刺激作用的受试物，可加强致敏。对照组仅用溶剂作诱导处理。诱导接触后第21d，用涂有0.5g(mL)受试物的滤纸片激发。对照组同法操作。

四、结果评价

按照《化妆品安全技术规范》中变态反应试验皮肤反应积分表进行评分，并按照致敏强度分级表判定致敏强度。

(一) 局部封闭涂皮试验（Buehler Test, BT），激发接触后24h和48h观察皮肤反应。皮肤反应主要分为红斑和焦痂形成，以及水肿形成两种表现。当皮肤涂敷部位出现严重红斑（紫红色）至轻微焦痂形成，记4分；当出现中度至重度红斑或重度水肿（皮肤隆起约1 mm或超过1 mm）时，均分别记3分；当出现明显红斑或轻度水肿（皮肤隆起轮廓清楚）时，均分别记2分；当出现轻微红斑或轻微水肿时，均分别记1分。当受试物组动物出现皮肤反应积分≥2时，可判定该动物出现皮肤变态反应阳性。如结果可疑，于第一次激发后一周重新激发，对照组操作步骤同受试物组或按豚鼠最大值试验 (Guinea Pig Maximinatim Test , GPMT) 的方法进行评价。

（二）豚鼠最大值试验 (Guinea Pig Maximinatim Test , GPMT)，激发接触结束，除去涂有受试物的滤纸后24、48和72h，观察皮肤反应。当皮肤出现重度红斑和水肿时，记3分；当出现重度红斑和融合红斑时，记2分；当出现散在或小块红斑时，记1分。当受试物组动物皮肤反应积分≥1时，可判定变态反应阳性。如结果可疑，于第一次激发后一周，给予第二次激发，对照组操作步骤同受试物组。

按照《化妆品安全技术规范》中致敏强度表进行受试物致敏强度分级，当致敏率为0时，可判为未见皮肤变态反应。

五、参考文献

1. 国家药品监督管理局.化妆品安全技术规范.2015.

2. OECD. Guideline for the testing of chemicals No.406: Skin Sensitization. 2022.

3. 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国国家职业卫生标准 化学品毒理学评价程序和试验方法 第7部分：皮肤致敏试验: GBZ/T 240.7-2011.

六、术语和释义

1.诱导接触（induction exposure）:指机体通过接触受试物而诱导出过敏状态的试验性暴露。

2. 诱导阶段（induction period）：指机体通过接触受试物而诱导出过敏状态所需的时间，一般至少一周。

3. 激发接触（challenge exposure）：机体接受诱导暴露后，再次接触受试物的试验性暴露，以确定皮肤是否会出现过敏反应。

七、附录

试验方法可参照《化妆品安全技术规范》中收录的“皮肤变态反应试验”。