



替代方法在化妆品检测中的应用分析

程树军¹, 秦瑶², 柯逸晖^{1,2}, 陈志杰², 黄健聪²

(1. 广东检验检疫技术中心, 广州 510642; 2. 广州市华代生物科技有限公司, 广州 510535)

【摘要】 体外方法是不可缺少的生物学检测与研究工具, 已普遍用于化妆品法规性测试、生物学机制研究和功效性原料的筛查。体外方法包括法规认可和列入标准测试指南的替代方法, 用于风险评估和毒性预测的非生物测试方法, 以及大量多元和个性化的方法。这些方法可用于产品监管、原料筛查、配方优化、组合测试和定制化评估, 覆盖化妆品质量和安全评价的整个过程。随着全行业共识的形成和应用经验的积累, 建立在检测标准基础上的方法创新和优化将不断涌现, 这些技术将支撑行业的健康发展, 有助于提高竞争力和开发适应消费者需求的产品。

【关键词】 替代方法; 化妆品; 体外; 应用

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 10-0101-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.10.020

The application analysis of alternative method in cosmetics assessment

CHENG Shu-Jun¹, QIN Yao², KE Yi-Hui^{1,2}, CHEN Zhi-Jie², HUANG Jian-cong²

(1. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510642, China;

2. Chn-Alt Biotech Co., Ltd, Guangzhou 510535)

【Abstract】 In vitro method as indispensable biological research and testing tools, has been widely used in cosmetics compliance test, biological mechanism research and functional materials screening. These methods include alternative methods which have been accepted by regulations and standardized test guide, non-testing method used for risk assessment and prediction, and a lot more diversification and individualization of in vitro methods. With the consensus formation of the whole industry and increase of application experience, innovation and optimization in vitro method will be constantly emerge. These technologies will be beneficial to improve competitiveness and to develop products to meet the needs of consumers.

【Key words】 Alternative methods; Cosmetics; In vitro assessment; Application

生物医学研究和应用中动物实验的减少(reduction)、优化(refinement)和代替(replacement)的3R原则提出60多年来已逐渐得到普及并成为共识, 技术人员也愿意关注实验动物的福利伦理并主动实践减少和优化的2R原则。但以不使用动物为核心的1R原则由于投入和研发时间长难度大一直以来进展缓慢。进入21世纪后, 现代生物技术的

飞速发展推动毒理学测试走向现代化, 代替动物实验的1R原则进入快速轨道。欧盟关于化妆品动物实验禁令的实施和化学品REACH法规的影响, 以及之后越来越多的国家将替代动物实验列为化妆品法规, 推动了替代技术的监管认可^[1]。近年来, 以美国为首推行的“21世纪毒性测试观念与远景”, 使得大量体外新技术从基础研究转化为体外方法

[基金项目] 广东省科技计划项目(2015A030402005); 国家认监委认证认可科技支撑计划项目(2017RJWKJ10)。

[作者简介] 程树军(1971-), 博士, 研究员, 研究方向: 化妆品测试替代方法研发和标准化。E-mail: chengsj@126.com

应用于皮肤生物学和化妆品领域^[2]。

1 非动物检测方法分类

凡是利用无知觉材料(如计算机模型、体外细胞、重建组织、离体器官、低等生物等)替代活体哺乳动物的安全性与功效性的测试都可称为体外方法(*in vitro* methods),经过严格验证并被法规接受,用于取代毒理学动物实验的体外方法可称为绝对“替代方法”。根据实验系统和适用范围的不同,体外方法可分为三类。

1.1 非测试方法

非测试方法(non-testing methods)又称为“硅片方法”(in silico methods),广义是指任何基于计算机开发的预测方法。基于计算机的强大功能,很多毒性测试与功效评估的计算机方法被开发出来,用于预测化合物对人体健康和环境的影响,例如定量构效关系(structure-activity relationship),分类法(grouping approaches),交叉参照(read-across)、毒理学阈值(threshold of toxicological concern, TTC)和专家系统(expert systems)等。这些方法在经济合作与发展组织(OECD),欧盟、美国和日本等国家和地区发展较快,例如已经有不少 QSAR 模型和工具应用到化妆品毒理学安全性评估中,例如,OECD QSAR Toolbox、Toxtree、CAESAR、TEST 及 HESS 等,毒性终点涉及经皮吸收、皮肤刺激、眼刺激、皮肤致敏、急性毒性、重复剂量染毒、生殖发育、遗传和致癌等。欧盟消费者委员会(SCCS)认为针对化妆品杂质以及含量极小的化妆品原料安全性评估,可以使用 TTC 方法。在工业化学品领域,交叉参照已经被多个国家的管理机构所接受^[3],也被我国新化学物质申报登记指南所认可。我国国家食品药品监督管理总局(CFDA)发布的《化妆品新原料申报与审评指南》中也提到:可以根据该原料理化特性、定量构效关系、毒理学资料、临床研究、人群流行病学调查以及类似化合物的毒性等资料情况,增加或减免试验项目。总的来说,中国化妆品非测试方法的认识刚起步,开发和应用与国外都还存在一定的差距,还需要更多的经验积累和借鉴。

1.2 替代方法

狭义的替代方法或称之为“绝对替代”方法,是指经过科学验证程序证明其相关性和可靠性,用于替代传统动物实验并被监管机构所认可的体外方法。因此,替代方法的结果应当与预期回答的毒性

终点之间建立预测关系,即体外实验获得的数据与体内有害效应之间建立预测模型。如体外细胞毒性预测啮齿类动物的急性经口毒性,在细胞活性的半数抑制浓度(IC_{50})与动物半数致死剂量(LD_{50})间建立线性关系;基于 3D 表皮模型的皮肤刺激方法把细胞活性与体内刺激评分建立判定关系;皮肤致敏的细胞实验把免疫细胞表面标志物(CD86 和 CD54)的表达与致敏评分建立相关关系等^[1,2]。替代方法验证工作始于上世纪 90 年代,官方的验证机构如欧洲替代方法参考实验室(EURL-ECVAM)、美国替代方法多部门协调验证中心(ICCVAM)和日本替代方法验证中心(JaCVAM),完成验证的毒性测试替代方法已超过 50 项。

1.3 体外方法

广义的体外方法既包括符合法规要求的替代方法,还包括大量应用于化妆品原料和产品安全性或功效性测试的非动物和非临床测试方法。体外方法由体外实验系统、实验过程、指标及检测方法、结果和统计方法(预测模型)等 4 个基本要素组成,还包括实验原理、适用范围等界定方法应用领域的因素。如美白剂的组合测试方案包括了酪氨酸酶抑制、B16 或人黑色素细胞生成抑制、角质细胞摄取试验、斑马鱼测试等多个体外方法,抗光老化功效的体外测试组合包括酯酶抑制方法,成纤维细胞光老化测试和三维重建皮肤模型的方法等^[2]。这类方法紧跟皮肤生物学的发展,且与检测技术与装备的进步密切相关,因而新技术不断涌现、个性化方案很多,为产品的宣称提供数据支持。

2 替代方法在化妆品检测中的应用情况

首个法规认可的替代方法是 OECD 2004 年发布的指南 432,即 3T3 中性红摄取光毒性试验(in vitro 3T3 neutral red uptake phototoxicity test, 3T3 NRUP),目前列入指南的替代方法已经超过 20 项。我国接受替代方法成为国家标准和检验检疫行业标准(SN)始于 2006 年,累计发布标准约 30 项,国家 CFDA 在 2016 年 10 月吸收列入《化妆品安全技术规范》的首个替代方法是 3T3 NRUP。截止目前,OECD 先后发布的替代方法已覆盖皮肤吸收、光毒性、眼刺激、皮肤刺激、皮肤致敏、遗传毒性、内分泌干扰等毒性终点。目前国内常用的化妆品评测的体外方法见表 1^[2]。

表 1 目前可用的体外方法
Tab.1 The currently available in vitro testing methods

法规认可和有效的替代方法 Regulation accepted and validated alternative methods	法规/标准编号 No. of guides and standards
牛角膜浑浊和渗透性试验 Bovine corneal opacity and permeability test, BCOP	OECD 437, SN/T 4153
重建表皮模型腐蚀试验 In vitro skin corrosion; Human skin model test	OECD 431, GB/T 27830, SN/T 2245
重建表皮模型刺激试验 In vitro skin irritation reconstructed human epidermis test	OECD 439, SN/T 3948, SN/T 4577
大鼠经皮肤电阻试验 Rat skin transcutaneous electrical resistance test, TER	OECD 430, GB/T 27828
皮肤腐蚀的膜屏障试验 In vitro membrane barrier test for skin corrosion, CORRTOX	OECD 435, GB/T 27829
直接多肽结合试验 Direct peptide reactivity assay, DPRA	OECD 442C
人细胞系活化试验 Human cell line activation test, h-CLAT	OECD 442E
3T3 中性红摄取光毒性试验 In vitro 3T3 NRU phototoxicity test, 3T3-NRU-PT	OECD432, GB/T21769
荧光素漏出试验 Fluorescein leakage test, FL	OECD460
兔角膜细胞短期暴露试验 Short time exposure in vitro test, STE	OECD491
3D 角膜模型试验 Epiocular test, HCE	OECD492
体外皮肤吸收试验 Skin absorption; in vitro test	OECD428, GB/T 27818
雌激素受体拮抗剂和激动剂体外转染细胞试验 The stably transfected human estrogen receptor- α transcriptional activation assay	OECD 455
鸡胚绒毛膜尿囊膜试验 Hen's egg test chorio-allantoic-membran assay, HET-CAM	SN/T2329
急性经口毒性的细胞毒性预测 Cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral acute toxicity tests	OECD DG129, SN/T 2328
胚胎和发育毒性的小鼠胚胎干细胞试验 Cosmetics embryotoxicity and developmental toxicity of mice embryonic stem cell test	SN/T2330
胚胎毒性测试的植入后大鼠全胚胎试验 Chemicals embryotoxicity test-post-implantation embryo culture method	SN/T 3527
眼刺激的红细胞溶血试验 Red blood cell test for eye irritation	SN/T 3084. 2
眼刺激的中性红吸收法 Neutral red uptake assays for eye irritation	SN/T 3084. 1

注:OECD:经济合作和发展组织;GB:国家标准;SN:检验检疫行业标准。
Note. OECD: Organization for Economic Cooperation and Development;GB: National Standard;SN:Industry standard.

近年来,替代方法的发展呈现以下几个趋势。一是研发重点转向更复杂的毒理学领域,如皮肤致敏、肝脏毒性、生殖发育毒性和内分泌干扰等,如 2016 年发布的 DPRA、h-CLAT。二是整合评估策略(integrated assessment testing approach, IATA)的开发,尝试把单一的方法合理科学地组合使用,如眼刺激、皮肤刺激和皮肤致敏的 IATA 处于指南形成的不同阶段。整合策略不仅考虑了现行有效的方法,还加入了 QSAR、理化信息、人群暴露等^[4]。三是替代方法开发与毒理学新理论紧密结合,研发效率和导向性显著提高,如有害结局通路(adverse outcome pathway, AOP)原则的运用,出现了大量新

发现和新方法^[5];四是与风险评估结合,基于大数据的分析,建立从体外数据直接预测人体风险的模型。

3 替代方法在化妆品体外测试中的具体应用分析

3.1 原料和成品安全性测试

法规认可的替代方法主要以代替动物实验为目的,替代方法的预测模型、验证指标和判定依据多以动物实验数据为金标准,因此替代方法用于预测人类健康风险的准确性等于或优于动物实验。这些标准化的测试指南可用于化学品的分类/标识、产品安全性测试和上市监管。而且体外方法使

传统以形态学观察为主的半定量动物实验走向以量化参数为主的生物学测试,不仅提高了测试通量,而且测试结果更为客观和具有可比性^[6]。如秦瑶等分别用 CAMVA 方法和 BCOP 方法检测了 60 种化妆品的眼刺激性,结果显示 CAMVA 方法的特异性(阴性结果的预测率)为 97.6%,敏感性(阳性结果的预测率)为 100%,准确性达到 98.3%。BCOP 方法的敏感性为 100%,特异性为 83.3%,准确性达到 85%^[7]。表明替代方法可用于产品上市的监管,但不同方法的原理和适用范围存在差异,例如与 CAMVA 方法相比,BCOP 方法对于轻度到严重刺激性之间的预测不够精确^[6-8]。

3.2 产品制造过程测试

利用替代方法比较精确和可以定量的优点,可将其用于化妆品原料筛查。如对于同一原料的不同供应商或不同批次可能由于杂质、工艺或其它未知因素的影响造成某些毒性作用程度的不一致,利用替代方法的测试结果可为优先选择原料提供帮助,如可用短期暴露细胞实验筛选刺激性温和的表面活性剂^[9],用 BCOP 方法可筛选不同批次的原料供应商^[10]。同样,替代方法提供的多个检测参数为产品改进提供了线索,例如 BCOP 方法中,获得不同配方的浊度值、OD 值和体外评分,对于数据比较高的配方,可通过降低某种物质的含量、去除某个成份或改变配合比例对配方进行优化,确定最温和的产品。对于刺激-剂量效应关系的原料,还可以通过反复测试确定原料或成份在终产品中的安全浓度^[10]。

3.3 用于特殊人群和温和产品的测试

基于不同原理开发的替代方法提供了量化的数据和多种方法的组合,通过对测试数据的挖掘可满足企业个性化的需求。例如 BCOP 方法对于体外评分小于 3 的产品判定为无刺激性^[8],CAMVA 方法对于 EC50 少于 3% 的产品判定为无刺激性,重建三维表皮模型实验对于无刺激性的判定标准为组织活性大于 50%^[2]。通常认为优于临界值的数据其产品越温和,温和产品符合特殊人群产品的需求,如婴童、女性、老人等,这些产品以低刺激性或温和为追求目标。具体测试时可选标准方法,也可用改进方案或组合方案。例如可以把温和和产品刺激性的建议简单设定为 BCOP 体外评分在 1 以下,CAMVA 的 EC50 大于 70%,皮肤模型的组织活性大于 80% 等。

3.4 整合策略的使用

鉴于单一替代方法的不足,应当采用整合策略组合不同方法获得毒理学全面评估,组合方法的选择不仅要考虑方法的科学性和局限性,还要综合考虑方法的可用性、成本、技术难度等。组合模式也有多种方案,使用时可参考 OECD 发布的 IATA 指南^[4]。常用的替代方法组合见表 2。例如眼刺激的自下而上和自下而上方案均以 BCOP 为重要方法^[11],研究表明采用 CAMVA-BCOP 的组合方法预测产品的眼刺激性敏感性为 100%,特异性为 97.6%,准确性达到 98.3%,优于单一方法^[7]。另外,对于复杂的毒性终点,也建议采用组合模型,以避免单一方法覆盖机制不全的局限,例如,可把导致皮肤致敏发生的 AOP 不同阶段开发的替代方法组合起来,提高预测的准确性^[12,13]。把检测胚胎发育不同阶段的胚胎干细胞试验、全胚胎试验和斑马鱼实验组合起来,预测化合物的胚胎毒性。组合方案也多用于化妆品功效原料的筛查,如美白剂的整合测试策略组合了酪氨酸酶抑制、B16 或人黑色素细胞生成抑制、角质细胞摄取试验、斑马鱼测试等多个体外方法,抗光老化功效的体外测试组合包括酯酶抑制方法,成纤维细胞光老化测试和三维重建皮肤模型的方法等。

3.5 产品个性化宣称

企业内部使用的替代方法可以在标准方法的水平上提高要求,或满足消费者诉求,或追求更高的安全水平。优化方法主要用于适应产品差异化竞争、更精确获得实验数据、温和宣称及特殊人群需要^[1]。如利用皮肤模型对产品的皮肤刺激性进行评估时,可在标准方法检测细胞活性的基础上,增加刺激引进的白介素 1 α 的表达情况^[14],或测定皮肤模型表皮屏障电阻值的变化,也可改变暴露方式,如暴露和后孵育的时间和次数,如 BCOP 的改良^[10,15]。常见的替代方法优化方案见表 3。随着检测数据的积累和研究的深入,许多改进方案将被行业内提出并使用。

3.6 拓展应用领域

替代方法开发的初衷是满足大量化学品毒性测试的需要,目前成熟的方法主要用于皮肤接触化学品的毒性预测。但对于粘膜接触类物质的毒性测试尚无完整的替代方法解决方案,可在现有方法基础上建立合理化的应用模型,例如眼角膜具有上皮组织共有的多层角质细胞的屏障结构和功能,可

将其用于粘膜(口腔、阴道)刺激和皮肤刺激性的测试,为检测口腔护理品(牙膏、漱口水等)和卫生护理产品(纸尿裤、卫生巾等)的安全性提供数据^[10]。也有人将体外方法用于药品、消毒产品、医疗器械的评价^[16]。

表 2 替代方法的组合应用情况

Tab.1 The integrated application of alternative methods

毒性终点 Toxic endpoint	组合方案 Integrated strategy	主要应用 Main applications
眼刺激 Eye irritation	BCOP + CAMVA + HCE BCOP + STE BCOP + (Cytosensor) + HCE	提高预测的精确性,减少单一方法的不足 Increase accuracy of prediction, decrease the shortcoming of single method 扩大方法的应用范围 Extend the test method application field
皮肤致敏 Skin sensitization	DPRA + LuSens + U-SENS DPRA + Keratinosens TM + U-SENS DPRA + h-CLAT DPRA + LuSens Keratinosens TM + h-CLAT LuSens + U-SENS LuSens + h-CLAT	基于 AOP 的多通路组合皮肤致敏测试方案,提高预测的精确度 Test strategy based on AOP of multi-pathway integrated skin sensitization, to increase the accuracy of prediction
光毒性 Phototoxicity	3T3 NRU PT + 皮肤模型(skin model)	减少单一方法的不足;提高适用性 Decrease the shortcoming of single method, increase the applicability
多毒性终点 Multiple toxic endpoint	皮肤模型(Episkin) + h-CLAT	同时检测皮肤刺激、皮肤致敏及相互影响 Testing and study the interaction of skin irritation and skin sensitization at the same time

表 3 目前替代方法的优化应用情况

Tab.3 current conditions of optimizing application in alternative methods

标准方法 Standard methods	优化方案 Optimizing approaches	优点和主要应用 Advantages and typical application
BCOP	增加参数:角膜厚度检测、组织学观察、炎性因子测试;延长暴露时间;多重暴露;延长暴露后孵育时间 Add parameters: corneal thickness test, histological observation, inflammatory factor assay; prolong exposure time; multiple exposure; prolong time of post-incubation	更精确区分刺激性和了解作用机制;测试长时间接触的产品;多次反复接触产品或化妆品套装;刺激后的恢复作用 Distinguish irritation more accuracy and understand the mechanism; testing the safety for a long time expose products; multiple and replicating exposing to products and cosmetics suit; recovery after irritation
皮肤模型方法 Skin model methods	增加参数:炎性因子;延长暴露时间和后孵育时间 Add parameters: IL-1a inflammatory factor IL-1a; prolong exposure time and post-incubation time	更精确区分刺激性和了解作用机制;提高检测敏感性 Distinguish irritation more accurately and understand the mechanism; Increase the detection sensitivity
CAMVA	简化方法,不计算 EC50,只描述现象 Simplified method, no calculated EC50, only describe the phenomenon	用于配方比较和优化,刺激性预测,缩短检测时间 For comparing and optimizing the formula, predicting the irritation and shortening the test time
STE	增加中性红毒性测试 Add neutral red toxicity test	用于含活性成分和聚合物眼药水的刺激 For testing the irritation of the eyedrops containing active ingredients and polymers
DPRA	氨基酸衍生物反应试验 Amino acid derivative reactivity assay, ADRA	降低受试物浓度,提高精确度 Decrease the concentration of the products, increase the accuracy
h-CLAT	与 3D 皮肤模型共培养 Co-culture with 3D skin model	增加皮肤吸收,用于难溶物质、终产品和可能代谢活化物质的测试 Increase the skin absorption, for testing the dissolvable products, final products and the substances which can be metabolized and activated

4 化妆品替代方法应用趋势

随着替代技术的日益成熟,在全球化妆品毒性测试标准一体化和法规相互影响的背景下,我国化妆品全安性的测试会逐渐与国际标准趋同和接近,替代方法的应用范围和水平也会相应提高,并实现自主创新和形成特色。今后将会有越来越多的体外测试数据,回答原料和产品安全性的问题。替代技术的投入研发和使用也会带动相关学科和行业的发展,如细胞技术和模型、三维组织构建和产业化、替代方法专用设备、计算机模型、生物信息学和检测技术的进步。替代技术在化妆品行业的率先应用不仅惠及本产业,也有利于其它健康相关产业,同时对保护消费者权益也有促进作用。

参考文献:

- [1] 程树军,焦红.实验动物替代方法原理与应用[M].北京:科学出版社,2010:285-304.
- [2] 程树军.化妆品评价替代方法标准实施指南[M].北京:中国质检出版社,2017.
- [3] Patlewicz G, Ball N, Booth ED, et al. 2013. Use of category approaches, read-across and (Q) SAR: general considerations [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2013, 67(1):1-12.
- [4] OECD. OECD new guidance document on an integrated approach on testing and assessment(IATA) for skin corrosion and irritation [S]. Series on Testing and Assessment No. 203. 2013
- [5] 瞿小婷,程树军,秦瑶,等.有害结局通路指南及毒性测试应用分析[J].中国日用化学工业,2016,46(8):473-478
- [6] 黄健聪,秦瑶,程树军,等.牛角膜浑浊渗透试验方法预测眼刺激性的研究[J].中国卫生检验杂志,2014,24(14):1980-1983.
- [7] 秦瑶,程树军,黄健聪,等.整合 CAMVA 和 BCOP 方法检测化妆品的眼刺激[J].中国比较医学杂志,2014,24(6):78-82.
- [8] OECD. OECD guideline for testing of chemicals No.437: Bovine corneal opacity and permeability test method for identifying i) Chemicals inducing serious eye damage and ii) Chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage [S]. Paris: OECD, 2013:1-27.
- [9] Inácio AS, Mesquita KA, Baptista M, et al. In vitro surfactant structure-toxicity relationships: implications for surfactant use in sexually transmitted infection prophylaxis and contraception[J]. PLoS ONE, 2011 6(5): e19850
- [10] 秦瑶,柯逸晖,程树军,等.牛角膜浑浊和渗透性实验应用于个人护理产品评价的案例分析[J].日用化学科学,2017, (3):13-18.
- [11] Scott L, Eskes C, Hoffmann S, et al. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using bottom-up and top-down approaches[J]. Toxicol in Vitro, 2010, 24(1):1-9.
- [12] 柯逸晖,陈彧,程树军,等.直接多肽结合试验组合人细胞系活化试验预测皮肤致敏物的探讨[J].中国实验动物学报, 2016, 24(6):611-617.
- [13] Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, et al. Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy[J]. Arch Toxicol, 2015, 89(12):2355-83.
- [14] Walters RM, Gandolfi L, Mack CM, et al. In vitro assessment of skin irritation potential of surfactant-based formulations by using a 3-D skin reconstructed tissue model and cytokine response[J]. Altern Lab Anim, 2016, 44(6):523-532.
- [15] 陈彧,喻欢,程树军,等.结合组织学评分的牛角膜浑浊和渗透性方法研究[J].日用化学工业,2016,46(2):107-110.
- [16] Coleman KP, McNamara LR, Grailer TP, et al. Evaluation of an in vitro human dermal sensitization test for use with medical device extracts[J]. Applied In Vitro Toxicol, 2015, 1(2):118-130.

[收稿日期] 2017-02-09