

浙江省保健品化妆品行业协会文件

浙保化协〔2019〕43号

关于征求《美白类化妆品皮肤变态反应体外测试方法——人源细胞系激活试验法（征求意见稿）》等2项团体标准意见的函

各相关单位：

根据《关于发布2018年度浙江省保健品化妆品行业协会第二批团体标准立项的公告》（浙保化协〔2018〕21号），协会于5月23日批准由浙江省食品药品检验研究院牵头制定《染发类化妆品眼刺激性试验体外评价方法——牛角膜浑浊和渗透性试验（BCOP法）》等7项团体标准。现牵头单位联合安利（中国）研发中心有限公司、玫琳凯（中国）有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、珀莱雅化妆品股份有限公司等多家单位已完成《美白类化妆品皮肤变态反应体外测试方法——人源细胞系激活试验法（征求意见稿）》（见附件）等2项团体标准的制定。根据标准制定程序，本着公开、公平、公正的原则，现面向行业征求意见。

征求意见时间为 2019 年 11 月 14 日至 12 月 13 日，请于意见征求
结束日期前将《意见汇总表》反馈至浙江省保健品化妆品行业协会秘
书处。

电子邮箱：zjcos2015@163.com

电话：0571-85871052

地址：杭州市下城区费家塘路新天地商务中心 12 幢 10 楼

邮编：310004

附件：1. 《美白类化妆品皮肤变态反应体外测试方法--人源细胞
系激活试验法（征求意见稿）》等 2 项团体标准。

2. 《意见汇总表》。

浙江省保健品化妆品行业协会

2019 年 11 月 14 日

3301034028304

团 体 标 准

T/ZHCA

美白类化妆品皮肤变态反应体外测试方法
--人源细胞系激活试验法

Method of skin sensitization test in vitro for whitening cosmetic products

--Human Cell Line Activation Test

(征求意见稿)

发布

实施

前 言

本标准按GB/T 1.1-2009规则起草。

本标准由浙江省食品药品检验研究院提出。

本标准由浙江省保健品化妆品行业协会（ZHCA）归口。

本标准起草单位：浙江省食品药品检验研究院、安利（中国）研发中心有限公司、珀莱雅化妆品股份有限公司、杭州希科检测技术有限公司、玫琳凯（中国）有限公司、广东博溪生物科技有限公司、强生（中国）有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司。

本标准主要起草人：

美白类化妆品皮肤变态反应体外测试方法

--人源细胞系激活试验法

1 范围

本标准规定了美白类化妆品皮肤变态反应试验的一种体外评价方法。

本标准适用于美白类化妆品的皮肤变态反应评价，评价结果为阳性的，说明该产品存在潜在皮肤变态反应的风险，需结合其他体外方法进一步确认；评价结果为阴性的，需进一步采用其他试验方法加以确认。本方法为致敏反应通路上的一个节点，可用于提示致敏潜在风险，但本试验不能直接判断产品的致敏性，需结合致敏反应通路上的其它体外试验方法等进行综合分析。

本方法不适用于配方不稳定的产品或剂型不均一易发生分层的产品。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

OECD Guideline for the testing of chemicals (No.442E)

《化妆品安全技术规范》

3 术语及定义

3.1 美白类化妆品 指凡宣称有助于皮肤美白增白的化妆品。

其中按照功效成分分为两大类：仅通过物理遮盖形式达到皮肤美白增白效果的（包装上有标注）；通过添加抑制黑色素产生作用的美白功能性成分（包括抑制黑色素生成的美白剂、阻断黑色素转运的美白剂和剥脱剂），从而达到美白目的的产品。

3.2 人源细胞系激活试验 Human Cell Line Activation Test (H-CLAT)

利用皮肤过敏反应中激活的树突状细胞上特异性的表达的CD86和CD54表面抗原标志物显著增高的原理，通过测定特异性的表面抗原的表达升高来判断受试物是否可以引起体外皮肤变态反应。

4 试剂和材料

4.1 抗体

FITC 标记鼠源单克隆抗人 CD86 抗体，厂家：美国 BD 公司，货号：555657。

FITC 标记小鼠源 IgG1 抗体，厂家：美国 BD 公司，货号：555748。

FITC 标记鼠源单克隆抗人 CD54 抗体，厂家：DAKO 公司，货号：#F7143。

或厂家：美国 BD 公司，货号：555511。

FITC 标记小鼠源 IgG1 抗体，厂家：DAKO 公司，货号：#X0927。

或厂家：美国 BD 公司，货号：555749。

4.2 四季青新生小牛血清

厂家：浙江天杭生物科技有限公司，货号：22011-8612，使用经过 56℃ 灭活。

4.3 RPMI-1640 培养液

厂家：GIBCO 公司，货号：#22400-089

4.4 无钙镁的磷酸盐缓冲液

厂家：GIBCO 公司，货号：#14190-136

4.5 流式上样缓冲液（FACS）

含有 0.1%（w/v）牛血清的 DPBS 缓冲液

4.6 封闭液

含有 0.01%（w/v）球蛋白的流式上样缓冲液

4.7 Pen Strep

厂家：GIBICO，货号：15140-122

4.8 完全培养基

含有 10% 血清的 RPMI-1640 培养基，内含 0.05 mM 2-巯基乙醇和 1:100 的 Pen Strep

4.9 细胞株

THP-1（TIB-202™）细胞系，来源：美国 ATCC 细胞资源库。

试验前确认细胞增殖活力正常且 CD86 和 CD54 特异性表面标志物可以稳定表达。

4.10 溶剂

用 RPMI-1640 培养液作为溶剂，通过超声震荡等方式制成均一的混悬液，现用现配
配方不稳定的产品或剂型不均一易发生分层的产品不适用于本方法。

4.11 阳性对照

2,4-二硝基氯苯（2,4-Dinitrochlorobenzene, DNCB），厂家：SIGMA 公司。

4.12 阴性对照

完全培养基

5 仪器

5.1 电子天平：精度 0.01g。

5.2 水平式离心机：可设置 2-4℃、离心力 300-400g 的温控离心机。

5.3 流式细胞仪

5.4 净化工作台

5.5 二氧化碳恒温培养箱

6 测试步骤

6.1 毒性剂量选择实验

毒性剂量的选择可以根据实验室具体条件选择 PI 染色法, CCK8 法或 MTT 法, 此处以 CCK8 法为例

6.1.1 工作液的制备

准备受试物用注射器从原液吸取, 用 RPMI-1640 1:2 梯度稀释 8 个剂量作为工作液。8 个浓度梯度每个浓度至少各 500 μ l; 工作液一般是稳定的混悬液。若是脂溶性的化学品, 要均一混悬。尽可能避光保存。

6.1.2 细胞悬液制备

将培养的细胞悬液在 200g, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟。用完全培养基重悬为终浓度 2×10^6 /ml 密度, 接种 96 孔板每孔 100 μ l, 即细胞数量为 2×10^5 /孔。

6.1.3 细胞接触受试物

加 100 μ l 的工作液到 96 孔板中, 即终体积为 200 μ l。工作液要逐滴加入, 并在放入培养箱之前手动混匀。二氧化碳培养箱中孵育 24 小时。孵育结束后 200g 离心, 用 PBS 缓冲液离心 2 次冲洗掉残留的受试物。

6.1.4 细胞毒性的测定

每孔加 100 μ l PBS 加入 10 μ l 的 CCK8 溶液 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 1 小时, 在 450nm 下采用酶标仪测定吸光度值。

6.1.5 细胞成活率计算

细胞成活率 = 受试物处理组吸光度值 / 阴性对照组吸光度值 * 100

6.1.6 毒性剂量的选择

若受试物无毒性则采用最大剂量作为试验的高剂量, 若有毒性以接近 50%+10%左右的活性作为最高剂量, 向下稀释的 2 个浓度分别作为正式试验的中剂量和低剂量。

6.2 正式试验

6.2.1 前处理

按照毒性剂量选择试验确定的高、中、低剂量作为正式剂量。取状态良好的细胞在 200g, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟。然后用完全培养基重悬至密度为 2×10^6 个/ml 细胞。细胞接种于 24 孔板中, 每孔 500 μ l 即每孔 1×10^6 个/孔的细胞。同时根据高中低剂量配制合适的工作液。

6.2.2 接触受试物

每孔加 500 μ l 的工作液后培养 24 小时。受试物处理 24 小时后的细胞转移至样品管中, 200g, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟, 然后用 1ml 的 FACS 缓冲液冲洗两次。200g, 4 $^{\circ}$ C 离心后, 加封闭液 600 μ l 重悬并于 4 $^{\circ}$ C 封闭 15min。

封闭完成后，每组细胞分成三管，每管 180 μ l。用 FITC 标记的 CD86，CD54,以及对应抗体的同型对照小鼠 IgG 染色。每种抗体的染色浓度如下表：

	抗体的体积	细胞数	总体积
抗 CD-86 抗体	6 μ l	3x10 ⁵	50 μ l
抗 CD-54 抗体	3 μ l	3x10 ⁵	50 μ l
FITC 标记小鼠 IgG1 抗体	3 μ l	3x10 ⁵	50 μ l
FITC 标记小鼠 IgG1 抗体	6 μ l	3x10 ⁵	50 μ l

临用前预混悬抗体溶液，将三组细胞离心后，加入 50 μ l 预混的抗体稀释液至细胞沉淀中，轻轻用手摇散，在 4 $^{\circ}$ C 暗处孵育 30min。

6.2.3 流式上样的准备

抗体染色后，细胞要用 150 μ l 的 FACS 缓冲液洗两次并重悬在 400 μ l 的 FACS 缓冲液的上样管中。在流式上样前，加入 20 μ l 的 PI 染液 (12.5 μ g/ml) 得到终浓度 0.625 μ g/ml。用流式细胞仪选择激发光源 488nm，检测细胞表面抗原标记物。根据阴性对照和阳性对照将 FITC 通道 (FL-1) 优化到能够检测出 FITC 信号；而 PI 通道 (FL-3) 优化到能够检测出 PI 荧光信号。

6.2.4 收集数据准备

准备以下几个流式工作表格：

I 由 FSC(前向角散射)与 SSC(侧向角散射)组成的二维图

II 由 FL-1 和 FL-3 组成的二维图

III 每个通道的柱形图 (分别是 FL-1 和 FL-3 通道)

准备好流式缓冲液处理的阴性对照组和阳性对照组的 THP-1 细胞，分别加入 FITC 标记的 CD86, FITC 标记的小鼠 IgG 以及 PI，上机收集信息。在 FL-3 直方图中，DNCB 处理组中 PI 阴性部分和阳性部分间设定 R1 门，使得阴性部分对应活细胞，并用于接下来的分析。阴性被 R1 射门的细胞至少要超过 90%。

6.2.5 收集信息

死细胞用 PI 染色设门进行排除。总共分析 10000 活细胞，活细胞的荧光强度的几何均值 (MFI) 以及每份样品的成活率数据最终用于分析。

6.2.6 数据分析

MFI=荧光强度的几何均值

相对荧光强度(RFI)作为 CD86 和 CD54 表达的指示数值，每个化合物的每个剂量是根据流式分析得到的 MFI 按照下面公式计算：

$$RFI = \frac{\text{样品处理的细胞组 MFI} - \text{样品处理细胞同型对照 IgG 的 MFI}}{\text{空白对照细胞的 MFI} - \text{空白对照细胞同型对照 IgG 的 MFI}}$$

7 结果判定

7.1 实验成立条件

阴性对照组细胞的成活率要大于 90%，处理组的细胞成活率要大于 50%，且阳性对照组的 CD54 的 RFI 大于 200%，或 CD86 的 RFI 大于 150%，阴性对照组需要满足 CD54 小于 200%和 CD86 的 RFI 小于 150%。

7.2 样品结果评价

每个受试物至少2次独立试验高中低任一剂量的CD86的RFI等于或大于150%，或者至少2次独立试验任一剂量的CD54的RFI等于或者大于200%，则该受试物可判断为有潜在的致敏风险。若受试物在高中低剂量的CD86的RFI均小于150%，且在高中低剂量的CD54的RFI均小于200%，则该受试物在本实验条件下无致敏风险。

评价结果有或无潜在致敏风险，均需用其他试验方法进一步确认。

8 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面内容：

- a) 检验依据；
- b) 细胞来源、培养代数；
- c) 受试物、阴性对照和阳性对照的信息，包括与试验操作相关的理化性状、样品和阳性对照物的预处理；
- d) 试验条件和方法，包括试验具体步骤；
- e) 试验结果；
- f) 试验日期；
- g) 试验结论；
- h) 检验者、校核者和技术负责人签字以及检验单位公章或检验专用章。

团 体 标 准

T/ZHCA

染发类化妆品皮肤变态反应体外评价方法
-- 人源细胞系激活试验法

Method of skin sensitization test in vitro for hair dye cosmetic products

-- Human Cell Line Activation Test

(征求意见稿)

发布

实施

前 言

本标准按GB/T 1.1-2009规则起草。

本标准由浙江省食品药品检验研究院提出。

本标准由浙江省保健品化妆品行业协会（ZHCA）归口。

本标准起草单位：浙江省食品药品检验研究院、珀莱雅化妆品股份有限公司、安利（中国）研发中心有限公司、玫琳凯（中国）有限公司、杭州希科检测技术有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、广东博溪生物科技有限公司。

本标准主要起草人：

染发类化妆品皮肤变态反应体外测试方法

--人源细胞系激活试验法

9 范围

本标准规定了染发类化妆品皮肤变态反应试验的一种体外评价方法。

本标准适用于染发类化妆品的皮肤变态反应评价，评价结果为阳性的，说明该产品存在潜在皮肤变态反应的风险，需结合其他体外方法进一步确认；评价结果为阴性的，需进一步采用其他试验方法加以确认。本方法为致敏反应通路上的一个节点，可用于提示致敏潜在风险，但本试验不能直接判断产品的致敏性，需结合致敏反应通路上的其它体外试验方法等进行综合分析。

10 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

OECD Guideline for the testing of chemicals (No.442E)

《化妆品安全技术规范》（2015版）

11 术语及定义

3.1 染发化妆品

具有改变头发颜色作用的化妆品

3.2 皮肤变态反应（skin sensitization）

可能与皮肤接触引起皮肤变态反应的化妆品：特殊用途化妆品中染发类化妆品。

3.3 人源细胞系激活试验 Human Cell Line Activation Test（H-CLAT）

利用皮肤过敏反应中激活的树突状细胞上特异性的表达的CD86和CD54表面抗原标志物显著增高的原理，通过测定特异性的表面抗原的表达升高来判断受试物是否可以引起体外皮肤变态反应。

12 试剂和材料

4.1 抗体

FITC 标记鼠源单克隆抗人 CD86 抗体，厂家：美国 BD 公司，货号：555657。

FITC 标记小鼠源 IgG1 抗体，厂家：美国 BD 公司，货号：555748。

FITC 标记鼠源单克隆抗人 CD54 抗体，厂家：DAKO 公司，货号：#F7143。

或厂家：美国 BD 公司，货号：555511。

FITC 标记小鼠源 IgG1 抗体，厂家：DAKO 公司，货号：#X0927。

或厂家：美国BD公司，货号：555749。

4.2 四季青新生小牛血清

厂家：浙江天杭生物科技有限公司，货号：22011-8612，使用经过56℃灭活。

4.3 RPMI-1640 培养液

厂家：GIBCO 公司，货号：#22400-089

4.4 无钙镁的磷酸盐缓冲液

厂家：GIBCO 公司，货号：#14190-136

4.5 流式上样缓冲液（FACS）

含有 0.1%（w/v）牛血清的 DPBS 缓冲液

4.6 封闭液

含有 0.01%（w/v）球蛋白的流式上样缓冲液

4.7 Pen Strep

厂家：GIBICO，货号：15140-122

4.8 完全培养基

含有 10%血清的 RPMI-1640 培养基，内含 0.05mM2-巯基乙醇和 1:100 的 Pen Strep

4.9 细胞株

THP-1（TIB-202™）细胞系，来源：美国 ATCC 细胞资源库。

试验前需确认细胞增殖活力正常且 CD86 和 CD54 特异性表面标志物可以稳定表达。

4.10 溶剂

用 RPMI-1640 培养液作为溶剂，通过超声震荡等方式制成均一的混悬液，现用现配

配方不稳定的产品或剂型不均一易发生分层的产品不适用于本方法。

4.11 阳性对照

2,4-二硝基氯苯 (2,4-Dinitrochlorobenzene, DNCB), 厂家: SIGMA 公司。

4.12 阴性对照

完全培养基

5 仪器

5.1 电子天平: 精度 0.01g。

5.2 水平式离心机: 可设置 2-4 °C、离心力 300-400g 的温控离心机。

5.3 流式细胞仪

5.4 净化工作台

5.5 二氧化碳恒温培养箱

6 测试步骤

6.1 毒性剂量选择实验

6.1.1 储备液的制备

准备受试物从原液用注射器吸取原液, 1:2 梯度稀释 8 个剂量, 用 RPMI-1640 溶剂稀释。由于染发剂通常毒性较大, 可从第二个稀释浓度开始做。

6.1.2 工作液的制备

受试品的 8 个浓度梯度各 500 μ l; 工作液多是混悬物, 要均一混悬。尽可能避光保存, 现用现配。

6.1.3 细胞悬液制备

将培养的细胞悬液在 200g, 4°C 离心 5 分钟。用新鲜培养基重悬为终浓度 2×10^6 /ml 密度, 接种 96 孔板每孔 100 μ l, 即细胞数量为 2×10^5 /孔。

6.1.4 细胞接触受试物

加 100 μ l 的工作液到 96 孔板中, 即终体积为 200 μ l。工作液要逐滴加入, 并在放入培养箱之前手动混匀。二氧化碳培养箱中孵育 24 小时。

6.1.5 细胞毒性的测定 (PI 染色法)

孵育结束后 4°C, 200g 离心 5 分钟。离心后去上清加入 1 mL 的 FACS 缓冲液在每管中并且细胞的沉淀进行重悬并简单的混匀。4°C, 200g 离心 5 分钟, 反复洗两次。在流式上样前, 每 400μl 加入 20μl 的 PI 染液(12.5μg/ml)得到终浓度 0.625μg/ml。用流式细胞仪选择激发光源 488nm, 死细胞用 PI 染色设门进行排除, 总共分析 10000 活细胞, 活细胞的成活率数据最终用于毒性分析。

6.1.6 细胞成活率计算:

细胞成活率=活细胞数量/总读取的细胞数*100

6.1.7 毒性剂量的选择

受试物以 50%±10%细胞成活率作为最高毒性剂量, 依次向下稀释 2 个浓度作为正式试验的中低剂量。

6.2 正式试验

6.2.1 前处理

按照毒性剂量试验的高、中和低浓度作为正式剂量。从培养瓶中收集细胞 200g, 4°C 离心 5 分钟。然后用新鲜培养基重悬至密度为 2×10^6 个/mL 细胞。细胞接种于 24 孔板中, 每孔 500μl 即每孔 1×10^6 个/孔的细胞。

6.2.2 接触受试物

每孔加 500μl 的工作液后培养 24 小时。受试物处理 24 小时后的细胞转移至样品管中, 200g, 4°C 离心 5 分钟, 然后用 1ml 的 FACS 缓冲液洗两次。

6.2.3 封闭及抗体孵育

离心后, 加封闭液 600μl 重悬并于 4°C 封闭 15min。封闭完成后, 每组细胞分成三管, 每管 180μl。用 FITC 标记的 CD86, CD54, 以及对应抗体的同型对照小鼠 IgG 染色。每种抗体的染色浓度如下表:

	抗体的体积	细胞数	总体积
抗 CD86 抗体	6μl	3×10^5	50μl
抗 CD54 抗体	3μl	3×10^5	50μl
FITC 标记小鼠 IgG1 抗体	3μl	3×10^5	50μl
FITC 标记小鼠 IgG1 抗体	6μl	3×10^5	50μl

临用前预混悬抗体溶液, 将三组细胞离心后, 加入 50μl 预混的抗体稀释液至细胞沉淀中, 轻轻用手摇散, 在 4°C 暗处孵育 30min。

6.2.4 流式上样的准备

抗体染色后，细胞要用 150 μ l 的 FACS 缓冲液洗两次并重悬在 400 μ l 的 FACS 缓冲液的上样管中。在流式上样前，加入 20 μ l 的 PI 染液（12.5 μ g/ml）得到终浓度 0.625 μ g/ml。

用流式细胞仪选择激发光源 488nm，检测细胞表面抗原标记物。FITC 通道（FL-1）需要优化到能够检测出 FITC 信号；而 PI 通道（FL-3）需要优化到能够检测出 DNFB 染色的 PI 荧光信号。死细胞用 PI 染色设门进行排除。总共分析 10000 活细胞，活细胞的荧光强度的几何均值（MFI）以及每份样品的成活率数据最终用于分析。

6.2.5 收集数据准备

准备以下几个流式工作表格：

I 由 FSC(前向角散射)与 SSC(侧向角散射)组成的二维图

II 由 FL-1 和 FL-3 组成的二维图

III 每个通道的柱形图（分别是 FL-1 和 FL-3 通道）

准备好培养基处理的 THP-1 和 DNFB 处理的 THP-1 细胞，分别加入 FITC 标记的 CD-86，FITC 标记的小鼠 IgG 以及 PI，上机收集信息。在 FL-3 直方图中，DNFB 处理组中 PI 阴性部分和阳性部分间设定 R1 门，使得阴性部分对应活细胞，并用于接下来的分析。阴性被 R1 射门的细胞至少要超过 90%。

6.2.6 收集信息

死细胞用 PI 染色设门进行排除。总共分析 10000 活细胞，活细胞的荧光强度的几何均值（MFI）以及每份样品的成活率数据最终用于分析。

6.2.7 数据分析

MFI=荧光强度的几何均值

相对荧光强度(RFI)作为 CD86 和 CD54 表达的指示数值，每个化合物的每个剂量是根据流式分析得到的 MFI 按照下面公式计算：

$$RFI = \frac{\text{样品处理的细胞组 MFI} - \text{样品处理细胞同型对照 IgG 的 MFI}}{\text{空白对照细胞的 MFI} - \text{空白对照细胞同型对照 IgG 的 MFI}}$$

7 结果判定

7.1 实验成立条件

阴性对照组细胞的成活率要大于 90%，处理组的细胞成活率要大于 50%，且阳性对照组的 CD54 的 RFI 大于 200%，或 CD86 的 RFI 大于 150%，阴性对照组需要满足 CD54 小于 200%和 CD86 的 RFI 小于 150%。

7.2 样品结果评价

每个受试物至少2次独立试验高中低任一个剂量的CD86的RFI等于或大于150%，或者至少2次独立试验任一剂量的CD54的RFI等于或者大于200%，则该受试物可判断为有潜在的致敏风险。若受试物在高中低剂量的CD86的RFI均小于150%，且在高中低剂量的CD54的RFI均小于200%，则该受试物在本实验条件下无致敏风险。

评价结果有或无潜在致敏风险，均需用其他试验方法进一步确认。

8 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面内容：

- i) 检验依据
- j) 细胞来源、培养代数；
- k) 受试物、阴性对照和阳性对照的信息，包括与试验操作相关的理化性状、样品和阳性对照物的预处理；
- l) 试验条件和方法，包括试验具体步骤；
- m) 试验结果；
- n) 试验日期；
- o) 试验结论；
- p) 检验者、校核者和技术负责人签字以及检验单位公章或检验专用章。

附件 2

《美白类化妆品皮肤变态反应体外测试方法--人源细胞
系激活试验法（征求意见稿）》

《意见汇总表》

单位名称：

地 址：

序号	页码	章条编号	原文	修改意见/建议	理由	联系人	电话	邮箱

注：此表可附页

《染发类化妆品皮肤变态反应体外评价方法--人源
细胞系激活试验法（征求意见稿）》

《意见汇总表》

单位名称：

地 址：

序号	页码	章条编号	原文	修改意见/建议	理由	联系人	电话	邮箱

注：此表可附页