



化妆品评价替代方法标准 实施指南

程树军 主编



中国质检出版社
中国标准出版社

化妆品评价替代方法标准实施指南

程树军 主编

中国质检出版社

中国标准出版社

北京

图书在版编目(CIP)数据

化妆品评价替代方法标准实施指南/程树军主编. —北京:
中国标准出版社, 2017. 3

ISBN 978-7-5066-8578-8

I. ①化… II. ①程… III. ①化妆品—安全评价—标准—指南 IV. ①TQ658-65

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 050084 号

中国质检出版社 出版发行
中国标准出版社

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)

北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址:www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 23.5 字数 616 千字

2017 年 3 月第一版 2017 年 3 月第一次印刷

*

定价 80.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68510107

《化妆品评价替代方法标准实施指南》

Guides of Alternative Methods Standards for Cosmetics Assessment

编辑委员会

主 编：程树军

副主编：史光华 秦 瑶 蔡臻子 金卫华 田丽婷
王 慧 潘 芳

编 委：(按姓氏笔画排序)：

王 慧 田丽婷 田 理 史光华 杜 军
李钟瑞 吴 越 张全顺 张宏伟 张 洁
金卫华 秦 瑶 徐宏景 高 原 梅文杰
梅鹤祥 曹 平 程树军 曾 飒 蔡臻子
管 娜 潘 芳 瞿小婷 瞿 欣

编 者：(按姓氏笔画排序)：

王 滢 伽蓝集团股份有限公司
王 慧 上海交通大学
毛勇进 广州市诗泊苓化妆品有限责任公司
田丽婷 汉高(中国)投资有限公司
田 理 Delphic HSE Solutions Ltd.
史光华 中国合格评定国家认可中心
吕 京 中国合格评定国家认可中心
朱 伟 广州市疾病预防控制中心
刘德海 广东丹姿集团有限公司
江月明 亚什兰(中国)投资有限公司
孙 梅 SGS 通标标准技术有限公司
杜 军 安利(中国)研发中心
李民友 广州市进德生物科技有限公司

李怡芳 暨南大学
李钟瑞 Intertek 天祥集团
李适炜 广东芭薇化妆品有限公司
李楠 欧莱雅(中国)研发和创新中心
步犁 广州市疾病预防控制中心
吴越 伽蓝集团股份有限公司
沈骅 壳牌公司
张全顺 美国体外科学研究院
张宏伟 中国疾病预防控制中心
张洁 宝洁公司
张智婷 广州市花安堂生物科技有限公司
陈木永 维达纸业(中国)有限公司
陈田 安利(中国)研发中心
陈志杰 替代方法研究评价中心
陈炜锐 广州德亿化妆品有限公司
陈洁玲 SGS 通标标准技术服务公司
陈彧 广东出入境检验检疫局
金卫华 上海家化联合股份有限公司
郑楚亭 广东出入境检验检疫局
赵锸 上海斯安肤诺生物科技有限公司
柯逸晖 广东药科大学
姜义华 德之馨(上海)有限公司
洪靖 北京赛诺新炜科技有限公司
秦瑶 广州市华代生物科技有限公司
耿梦梦 广州市华代生物科技有限公司
栗原博 暨南大学
徐宏景 雅诗兰黛亚太研发中心
徐嘉婷 广州市华代生物科技有限公司
高原 宝洁公司
唐芳勇 广州市中通生化制品有限公司

谈伟君 广东药科大学
黄健聪 广州市华代生物科技有限公司
梅文杰 广东药科大学
梅鹤祥 德之馨(上海)有限公司
曹 平 上海家化联合股份有限公司
喻 欢 宜宾县卫生和计划生育局
程树军 广东出入境检验检疫局
曾 飒 广州栋方生物科技股份有限公司
蔡臻子 欧莱雅(中国)研发和创新中心
裴运林 广东丸美生物技术股份有限公司
管 娜 科思创聚合物(中国)有限公司
潘 芳 广东出入境检验检疫局
瞿小婷 替代方法研究评价中心
瞿 欣 亚什兰(中国)投资有限公司
Catherine Willett 国际人道对待动物协会
Kerstin Reisinger 汉高股份有限及两合公司
Petra Kern 宝洁公司
Stefan Pfuhler 宝洁公司



生物医学研究和应用中动物实验减少(Reduction)、优化(Refinement)和代替(Replacement)的3R原则提出60多年来已广为人知。关注实验用动物的福利伦理,自觉减少和优化动物实验的2R原则符合社会进步需要,也容易获得显而易见的成效。但是以代替动物实验为主旨的1R原则,受制于技术难度大、实施路线不清晰、投入和研发时间漫长、法规认可谨慎等因素,一直以来仍进展缓慢。进入21世纪后,生物技术的飞速发展推动毒理学测试走向现代化,多项替代方法也走完了漫长的验证和认可程序,化妆品安全评价应用替代方法趋于成熟,监管机构也落下了禁止动物实验的锤子。

放眼全球,我们可以看到:受欧盟禁止化妆品动物实验禁令的影响,跟随欧盟实施全面或有限禁止化妆品动物测试的国家在不断增加;替代方法认可机构加快了新方法推出的速度;非动物替代方法在基础研究领域受到前所未有的重视;毒性测试替代方法的转化应用工作也方兴未艾。

回顾中国化妆品替代技术不到15年的发展历史,离不开先行者的远见和引领推动,也离不开多行业的支持。总结过去,我们由衷地体会到:

替代技术是一个以法规为导向的检测技术。替代方法的出发点是以不低于动物实验水平的评估结果,提供人类健康安全性的预测,因此,动物与非动物都是检测手段,法规认可的标准替代方法经得起科学性和可靠性的质疑,经得起时间的检验。

替代技术是惠及多行业共同发展的朝阳产业。不仅在化妆品行业,医药产品、化学品安全评估也在大量使用替代方法;替代技术还将带动体外实验系统、材料学、大数据信息产业、组织工程、检测设备和实验材料等相关领域的技术进步和产业化。

替代技术是新兴技术服务领域。国家把技术服务业定位为优先发展的高新产业,替代技术属于检测认可的新兴领域,服务于健康相关产业,将带动技术服务业的提升。

展望未来,我们欣喜地感慨,替代技术研发与应用的春天已经到来:

替代方法的多方共识正在形成,中国化妆品监管机构已在逐步接受替代方法,政策和法规更加开放和包容;本土化妆品企业在认同替代技术的同时,正从被动的技术应对走向自觉的技术实践,行业的主动作为必将带动整个行业的升级发展。

替代方法学术交流空前活跃,国内各种化妆品会议已绕不开替代的话题,不少学者已走出国门,参与国际替代方法的项目研究和标准制订。

替代技术的门槛正在降低,随着国家整体生物技术水平和装备制造业的提升,替代方法依托的技术壁垒正在被打破,跟踪、转化、开发水平正在迎头赶上。

为了总结化妆品评价中替代技术的原理与进展,准确把握替代方法的现状与方向,更重要的是向化妆品从业者全面宣贯替代方法和标准的关键实施要点和实践经验,我们编写了化妆品行业替代方法的第一本参考用书。本书将从第七届替代方法学术研讨和培训会议开始,成为会议指定用书。

本书共18章,分为三个部分。第一部分1~5章,介绍了替代方法的概念、要素、实验室建设与良好规范、验证认可、风险评估、AOP理解实施和整合测试策略等内容。第二部分6~13章,分细胞毒性、皮肤刺激、眼刺激、皮肤致敏、光毒性、皮肤吸收、遗传毒性、靶器管毒性,共8章,详细介绍了24个替代方法和3个整合策略,基本覆盖了目前广泛使用的化妆品安全评价的替代方法。第三部分14~

16章,主要介绍体外方法在抗氧化、美白和防晒、抗光老化和环境压力功效评估方面的应用,拓展体外方法的应用领域。最后两章为替代方法术语、定义和标准清单。本书重点突出替代方法和标准的理解与实施应用,除了基本要素之外,特别为实验室能力建设、拓展书后附录包括中英文缩写词表以方便读者检索。应用提供了使用经验,并提供了疑难问题解答。

本书内容来自 OECD 化学品毒性测试指南,来自替代方法国家标准和检验检疫行业标准,还来自作者承担的科技部攻关项目、质检总局和广东省科技项目的技术输出和数据支持。本书的编写过程中,非常荣幸地得到了国家质检总局、广东出入境检验检疫局和技术中心各级领导的关心和指导。本书编者由来自宝洁公司、欧莱雅(中国)研发和创新中心、汉高股份有限及两合公司、暨南大学、广东药科大学、广州市华代生物科技有限公司等 38 家机构的 61 名专家学者组成,使得本书能站在全球和全行业的角度审视替代方法的现状并分享应用经验。在此对全体编委的辛勤付出深表谢意。特别感谢上海家化联合股份有限公司、德之馨(上海)有限公司、维达纸业(中国)有限公司等给予本书编撰过程中提供的支持。感谢广东检验检疫技术中心毒理学部的全体同事,对我的家人以及其他给予支持和关注的朋友,在此一并致以衷心的感谢。

本书可供化妆品及相关行业的法规、监管、检测、原料和生产企业的从业人员使用,也可供医学、药学、实验动物科学、生物学、毒理学、检验检测等相关专业的师生阅读。

由于本书涉及的学科是目前国际上发展最快的领域之一,实用性强,与新技术结合紧密,加之作者水平所限,本书的不足和疏漏之处在所难免,敬请读者批评指正。希望在本书再版的时候能够吸纳更多的应用成果,有更多的有识之士参与进来,共同推动我国化妆品体外测试技术的发展和全行业的进步!

程树军

2017年2月于广州



目 录

第一章 替代方法概论	1
Chapter 1 Introduction of alternative methods	
第一节 3R 与替代方法史	1
Section 1 History of 3Rs and alternative methods	
第二节 替代方法要素	5
Section 2 Elements of alternative methods	
第三节 验证与认可	17
Section 3 Validation & acceptance	
第二章 体外实验室建设与质量管理	24
Chapter 2 Construction of in vitro laboratory and quality management	
第一节 体外科学实验室建设与规范	24
Section 1 Construction and principles of in vitro laboratory	
第二节 体外实验室质量管理	31
Section 2 Quality management of in vitro laboratory	
第三章 风险评估与法规概述	41
Chapter 3 Risk assessment and regulatory introduction	
第一节 化妆品风险评估	41
Section 1 Cosmetic risk assessment	
第二节 全球化妆品法规与安全	50
Section 2 Global cosmetics regulatory and safety	
第四章 AOP 指南及应用分析	58
Chapter 4 Guides and application analysis of adverse outcome pathway	
第一节 AOP 概念和背景	58
Section 1 AOP concept and introduction	
第二节 AOP 应用和展望	63
Section 2 AOP application and prospects	

第五章 整合评估测试策略	74
Chapter 5 Integrated assessment testing approach	
第一节 整合测试策略原理与概述	74
Section 1 Principles and introductions of integrated testing strategy	
第二节 皮肤腐蚀性和刺激性的整合评估测试策略	82
Section 2 IATA of skin corrosion and irritation	
第六章 细胞毒性与系统毒性预测	88
Chapter 6 Cytotoxicity and system toxicology predictive	
第一节 非选择细胞毒性和急性经口毒性预测	88
Section 1 Non-select cytotoxicity and acute oral toxicity predictive	
第二节 肝细胞毒性及全身毒性预测	103
Section 2 Hepatocyte toxicity and system toxicity predictive	
第七章 皮肤刺激/腐蚀性测试的替代方法	109
Chapter 7 Alternatives of skin corrosion and irritation testing	
第一节 基于3D模型的皮肤腐蚀性测试	109
Section 1 Skin corrosion testing on reconstructed human epidermis	
第二节 体外皮肤腐蚀的经皮电阻实验	118
Section 2 Transcutaneous electrical resistance	
第三节 商业化皮肤模型的皮肤刺激测试	124
Section 3 Skin irritation testing on commercial reconstructed human epidermis	
第四节 开源3D皮肤模型(OS-REp)的皮肤刺激实验	132
Section 4 Skin irritation testing on open source reconstructed human epidermis	
第八章 眼刺激/腐蚀性测试替代方法	145
Chapter 8 Alternatives of eye irritation/corrosion testing	
第一节 牛角膜混浊与通透测试法	145
Section 1 Bovine corneal opacity and permeability assay	
第二节 鸡胚绒毛尿囊膜实验	154
Section 2 HET-CAM test	
第三节 荧光素漏出试验	162
Section 3 Fluorescein leakage test method	
第四节 重建人角膜样上皮(RhCE)测试方法	166
Section 4 Reconstructed human cornea-like epithelium(RhCE)	
第五节 细胞短期暴露试验	174
Section 5 Short time exposure in vitro test method	
第六节 眼刺激替代方法整合策略	177
Section 6 Integrated assessment testing approach of eye irritation	

第九章 皮肤致敏测试替代方法	188
Chapter 9 Alternative methods on skin sensitization testing	
第一节 直接多肽反应实验	188
Section 1 Direct peptide reactivity assay	
第二节 h-CLAT 皮肤致敏试验	197
Section 2 Human cell line activation test(h-CLAT)	
第三节 KeratinoSens™致敏实验	209
Section 3 KeratinoSens skin sensitization test	
第四节 U-SENS 皮肤致敏实验	216
Section 4 U-SENS™ skin sensitization test	
第十章 皮肤光毒性替代方法	227
Chapter 10 Alternatives of skin phototoxicity	
第一节 3T3 中性红摄取光毒性试验	227
Section 1 In vitro 3T3 NRU phototoxicity test	
第二节 体外重建表皮模型光毒性试验	233
Section 2 Human reconstituted epidermis phototoxicity	
第十一章 皮肤吸收	240
Chapter 11 percutaneous absorption	
第一节 体外经皮肤吸收	240
Section 1 Introduction of percutaneous absorption in vitro	
第二节 平行人工膜渗透试验	247
Section 2 Parallel artificial membrane permeability assay	
第十二章 遗传毒性的替代方法	251
Chapter 12 Alternative methods for genotoxicity	
第一节 遗传毒理学实验体外方法概述	251
Section 1 Introduction of in vitro test in genetic toxicology	
第二节 基于 EpiDerm™的重组皮肤模型微核实验	256
Section 2 Reconstructed skin micronucleus assay (RSMN) in EpiDerm™	
第三节 3D 皮肤彗星实验	262
Section 3 Reconstructed skin comet assay	
第四节 鸡胚微核诱导实验	268
Section 4 Hen's egg test for micronucleus induction	
第十三章 靶器官毒性	277
Chapter 13 Target organs toxicity	
第一节 胚胎干细胞毒性实验	277

Section 1	Embryonic stem cell test of Embryonictoxicity	
第二节	雌激素受体结合方法测定雌激素激动剂和拮抗剂	286
Section 2	Human estrogen receptor-alpha transcriptional activation assay for detection of estrogenic agonist-activity	
第十四章	化妆品抗氧化功效体外生物学评价	297
Chapter 14	in vitro biology assessment of cosmetics antioxidant efficacy	
第一节	化学检测法	297
Section 1	In chemico antioxidant assay	
第二节	生物检测法	306
Section 2	In vitro biological test	
第十五章	抗光老化和环境压力功效体外检测	314
Chapter 15	Antiaging and environmental press efficacy in vitro test	
第一节	抗光老化化学检测法	314
Section 1	Anti photoaging in chemico assay	
第二节	抗光老化生物检测法	319
Section 2	Anti photoaging in vitro biology test	
第三节	环境压力对皮肤损伤的体外测试方法	322
Section 3	In vitro test of anti stress of environment impression	
第十六章	美白防晒功效体外评价	333
Chapter 16	Whitening and sunscreening efficacy in vitro test	
第一节	防晒产品 UVA 保护的体外测试方法	333
Section 1	Sun sdeen of UVA in vito test	
第二节	美白功效体外检测法	339
Section 2	Whitenning efficacy in vitro test	
第十七章	替代方法术语和定义	348
Chapter 17	Terms and definitions of alternative methods	
第十八章	替代方法清单	352
Chapter 18	Lists of in vitro test methods	
附录	替代方法常见英文缩写词表	355
Appendix	List of abbreviations of alternative methods	

第一章 替代方法概论

Chapter 1 Introduction of alternative methods

第一节 3R 与替代方法史

Section 1 History of 3Rs and alternative methods

3Rs 是 Reduction(减少)、Refinement(优化)和 Replacement(替代)的简称。3R 的基本含义是指采用非动物手段代替实验动物,尽量减少动物使用量,并且设法改良动物实验方法以减轻实验动物的痛苦。目前,3R 原则已成为生命科学研究普遍遵循的原则,不仅写入法规(如多数国家的《实验动物福利法》、欧盟 REACH 法规、化妆品法规),列入指南(如化学品毒性测试和医疗器械生物学评价等),而且成为重要研究方向和新的分支学科。

3R 原则提出 60 多年来,从理念到形成理论,从理论到成为跨行业多学科实现的目标,深刻地影响着科技界和工业界的研发和应用。自上而下的实践包括从国家科技战略、行业规划到联盟计划和企业项目,还有一批基金组织、民间科技机构、出版物、跨行业协会,国际性、区域性和专业性学术会议也层出不穷。如果说过去人们强调 3R 主要是出于对动物福利的考虑,那么近年来在概念上的明显变化,是人们逐渐认识到应用 3R 不仅是适应动物保护主义的一种需要,而且也符合生命科学发展的要求。

一、3R 理论的概念和形成

实验动物作为人类的替身为人类的科学发展起到了不可替代的作用,随着科学技术的发展,特别是生命科学研究领域实验动物使用数量的猛增,实验动物的痛苦及其权利引起了社会公众的极大关注。1957 年,英国动物学家拉舍尔(Russell)发表了《强化人道试验》(The Increase of Humanity in Experimentation),第一次提出了 3Rs 的概念。1959 年拉舍尔和微生物学家伯奇(Burch)在其著作《人道试验技术原理》(Principles of Humane Experimental Technique)一书中第一次系统地提出了 3R 理论。1969 年,英国设立了医学实验用动物中替代法基金会(Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments,FRAME)。1978 年,著名的生理学家 David Smyth 在对 3R 方面的调查研究基础上,发表了他的著作《动物实验替代物》(Alternatives to Animal Experiment),他在书中将 3R 所阐述的内容统一称为替代(Alternative),该定义被人们广泛接受。

3R 理论自形成以来深刻地影响着全球实验动物法规的发展,如美国的动物福利法案(Animal Welfare Act of 1966),健康研究法的补充法案(Health Research Extension Act of 1985),英国的动物科学实验程序法案(Animals(scientific procedures) Act),日本人道对待和管理动物法(Law for the Humane Treatment and Management of Animals, 2005)和我国科技部《关于善待实验动物的指导性意见》(2006 年)。

其他生物医药领域也受到 3R 的影响,甚至影响到行业管理法规,如 OECD 化学测试指南、欧盟化学品的注册评估和授权(Chemicals Registration Evaluation Authorization,REACH)法规、ISO 标准等。涉及动物使用的科技规划和测试指南都遵循了 3R 的原则,延伸到科研计划、实验程序论证和审查、实施

程序和过程监管整个过程。科研人员尽管有按照自己独特的方法开展研究的权利,但他们只能在动物福利法规的框架范围内享有学术自由和最优地使用动物。拟定和申请研究方案许可的整个过程已成为良好科研实践的重要组成部分。

二、减少

3R 中减少 (Reduction) 的含义是指在科学研究中,使用较少的动物获取同样多的实验数据或使用一定数量的动物能获得更多实验数据的方法。如果某一研究方案中必须使用实验动物,同时又没有可靠替代选择方法,则应考虑把使用动物的数量降低到实现科研目的所必需的最小量。减少动物使用量的伦理和经济目标,是在保证科学研究的可靠性和可行性(获得正确的实验结果)的前提下,使遭受疼痛和不安的动物数目减至最少,避免动物、药品和实验用品等资源的无谓浪费。减少动物使用量的方法可大致分为 5 类:

(一) 充分利用已有的数据

在许多情况下,是否要进行某一项动物实验取决于以往的动物实验结果能否满足需要,重复性研究无任何科学价值,因此,充分利用可靠的科学文献资料将会减少无谓的动物的使用。已公开的信息资源可从科学杂志、会议、书籍、专题报告等途径获取,也可从电子出版物获得。但在利用文献前应分析文献的参考价值。

(二) 动物的重复使用 (Re-using)

不同的科研实验项目,按照不同的研究目的,尽可能地合用动物,可以减少科研活动中的动物使用数量。但是动物重复使用会增加对单个动物的伤害和痛苦,国外对动物重复使用的建议也比较谨慎。不同国家的态度有所差异,例如印度在 3R 基础上增加了重复使用,推行所谓“4R 原则”,与其文化中“不杀生”的传统有关。动物重复使用还受动物大小的影响,小动物寿命短而且能提供血液样品和组织样品有限通常难以重复利用,犬和猴等大动物的重复使用更为普遍。对动物重复使用的情况应进行个案分析,除了考虑动物背景是否变化较大(标准化程度降低),对预期数据和实验结果的影响,以及如何与其他动物分组和获得统计学意义的结果之外,还必须考虑对单个动物福利的影响。

(三) 实验数据的共享

实验室数据的共享可减少不必要的动物实验,从而减少动物的使用,欧洲 REACH 法规建议,加强化学物质分类评估的全球协作,实现毒理学数据的全球共享,减少不必要的重复实验。

(四) 使用高等级、高质量的实验动物

即所谓的“以质量代替数量”。事实证明,用遗传背景均一、微生物质量级别高的动物做实验,所用动物数量可以减少;用特殊的转基因动物进行研究,既有针对性,也可大量减少动物使用。但绝不允许用数量代替质量,用大量劣质动物所获得的结果既不能达到科学上的可靠性,也是不准确的。

(五) 控制实验中的生物学变异来源,合理设计实验方案和科学分析结果

科学合理的实验设计以及科学的结果统计分析,可以有效地控制实验中的生物学变异,减少实验动物的使用量,获得相同水平的研究结果。反之将会导致不必要的实验动物消耗和浪费。在进行动物实验之前,应对影响动物实验的生物学变异因素给予充分考虑,如动物的种类、品系、年龄、性别、体重、分组等。选择敏感性高的动物,合理的实验分组、减少对照组的设置,必要的预实验等都是有效减少实验室生物学变异的方法。如果动物实验设计周密,可以利用比较少的人力、时间和比较少的实验动物获得可靠而丰富的实验数据。如急性经口毒性实验中,采用改良后的固定剂量法代替经典的 LD_{50} 急性毒性实验,可有效减少实验动物数量 40%。

三、优化

所谓优化(Refinement)是指通过改善动物设施、饲养管理和实验条件,精细地选择、设计技术路线和实验手段,精炼实验操作技术,尽量减少实验过程对动物机体的损伤、减轻动物遭受的痛苦和应激反应,使动物实验得出科学的结果。优化的内容是比较广泛的,简单概括就是实验设计科学化、动物实验规范化和标准化的过程。

(一) 实验方案设计的科学化

实验动物的选择(种类、品系、年龄、性别等生物学特性)应符合实验的要求,选择非侵入性的实验方法(如示踪、遥感和成像技术)可减少了对动物机体的侵袭,提高实验质量。如使用磁共振成像(MRI)技术,只需1只动物而且不需处死就能获得过去需要处死很多动物分析组织样品才能获取的药代动力学曲线。采用导管介入装置,可在一个动物体内重复取样、反复注射,而不需要更多的动物。

(二) 动物实验条件的规范化

实验条件是影响动物实验及其结果的重要因素,实验条件的波动和实验操作的随意性通常使受试动物很难维持其正常的血压、心率、激素水平、免疫耐受力、消化、食欲和行为表现,动物饲养和操作过程中的许多因素的改变可引起动物精神状态或机体健康受到损害,导致动物神经内分泌、免疫和行为生理学方面的异常,用这类动物做实验可能得不到可靠的结论。因此,符合有关法规和标准的实验动物设施既能满足动物福利的基本要求,也是动物实验科学性的需要。同时,一些新的设备和技术的应用可改善动物实验条件,如实验动物设施中采用光纤、激光、影像等电子设备,通过遥感采集数据,可大大减少对动物的干扰和活动的限制,减少应激和不必要的痛苦。

(三) 实验操作的人道化

使用减轻动物痛苦和不适的技术:实验过程中合理地、及时地使用麻醉剂、镇痛剂或镇静剂,可减少动物在实验过程中遭受的不安、不适和疼痛。应注意选择合适的麻醉剂、麻醉剂量和麻醉方式,否则既达不到减轻动物痛苦的目的,重则还会造成动物死亡,也直接影响到实验的成败和结果。

改进动物实验技术,例如熟练和精细的抓取、固定和操作(如取样、注射/灌胃和手术),既对实验结果起到良性影响,也符合动物福利的要求,而且是花费最小、最安全有效的手段。经过训练的动物会消除由恐惧引起的应激反应,适应甚至能配合实验人员的各种操作处置。实验操作者与实验动物之间建立某种熟悉、友好的关系将对动物精神和心理行为产生良好作用,结合娴熟、精细的实验操作,可减轻或消除动物的恐惧和应激,确保实验的顺利进行。

四、代替

代替(Replacement)是指一项新的或修订的实验方法,该方法能减少动物使用数量,或能优化实验程序以减轻或消除动物痛苦、不适或增加动物福利;或者能用非动物系统或者系统发生学上比较低等的动物种类代替动物进行实验,如用无脊椎动物代替哺乳类动物。根据是否使用动物或动物组织,替代可分为“相对替代”和“绝对替代”,前者指采用人道处死的动物细胞、组织及器官进行的体外研究,或用低等动物替代高等动物的实验研究。而后者则是完全不使用动物,如采用培养的人或动物的细胞、组织和计算机模型等。根据替代的程度,替代可分为“部分替代”和“完全替代”,前者指利用其他实验手段代替动物实验中的一部分或某一步骤,后者指用新的非动物实验方法取代原来的动物实验方法。

实验动物替代选择的方法和途径主要包括以下几个方面:

(一) 体外培养物代替实验动物

体外培养的生物系统,包括细胞和组织培养物、组织切片、细胞悬液、灌注器官、亚细胞结构成分,以及三维组织培养模型(如人类皮肤替代物)等,常用于单克隆抗体生产、病毒疫苗制备、毒理学实验和科学研究等。特别是各种类型的人类细胞的广泛应用,不仅是动物实验的良好替代选择,而且极大地缓解了物种外推的困难。

(二) 低等动物代替高等动物

脊椎动物早期发育胚胎和只具备有限知觉的“较低等”生物的应用,如将鱼早期发育胚胎、线虫、果蝇用于遗传学研究及致畸、致突变和生殖毒性研究,已成为法检方法的 AMES 实验就是利用鼠伤寒沙门氏菌测定化合物的致突变性。

(三) 人群研究资料

包括采用自愿者、患者以及流行病学的调查等。

(四) 数学和计算机模型的应用

如定量结构—活性关系模型、计算机图像分析应用、生物医学过程模拟、交叉参照法等。

(五) 物理和化学技术的应用

如使用物理和机械学系统模拟心肺复活过程;免疫化学中用结合力很高的抗体来搜寻抗原,鉴定毒素的存在,以代替大量小鼠的接种。采用多肽结合法预测皮肤致敏物质,采用酶反应法筛查抗氧化作用等。

五、减少、优化和替代的相互关系

替代、减少和优化三者是彼此独立又密切关联的,实验科学的发展、技术方法的优化和替代方法的应用客观上减少了实验动物的使用数量,提高了实验动物的使用效率。如毒理学、药理学和其他医学领域科学研究中,细胞学、生物化学方法以及计算机技术的应用,在大大减少实验动物使用数量的同时,也促进了替代方法的研究和创新过程。可以认为,以减少、优化和替代为核心的 3R 理论的实践应用是实验动物学科发展的方向,是实验动物学发展的必然结果。

3R 原则中讲的替代是相对的,对于关系到人类健康和生命安全的实验,如人类疾病模型实验、关键的药效实验和毒理学实验等,实验动物模型是最好的人类替身。实验动物替代是漫长和循序渐进的过程。3R 原则鼓励采用科学、合理、有效和人道的方式使用动物,能少用动物的就少用动物,能不用动物的就不用动物,必要的动物实验必须提出正当的理由和合理的设计,实验过程中应尽量减少对动物造成不必要的痛苦和伤害,尊重动物生命并善待动物等等。这些要求都是科学和合理的,也是与实验动物科学的目的一致,是推动实验动物科学发展的动力。图 1-1 减少、替代和优化三者之间的相互关系。

六、毒性测试现代化与替代实验

分子和细胞生物学技术革新给传统毒理学实验带来了现代化变革的压力,进入 21 世纪以来,在各国科技政策的激励下,毒性实验的现代化革新明显加快。如 2004 年,美国 NTP(国家毒理学计划)提出了新的路线图,“21 世纪的国家毒理学计划(National Toxicology Program for the 21st Century)”,重点强调使用替代方法鉴别与疾病相关的关键通路和分子机制。2007 年美国国立研究院(NRC)发布了 21 世纪的毒性实验(Toxicity Testing in the 21st Century, Tox21)的报告,清楚地表明面向未来的毒性实验的革新已成为广泛认同的观念,呼吁开发和利用人类细胞的体外模型,开发基于自动化高通量筛查的毒理学方法,开发基于通路的与毒性和计算机模型相关的细胞检测方法。2008 年,由 NTP 联合

NIH 化学物基因组学中心(NCGC)和 EPA 成立了 Tox21 协作计划。发挥各自在实验毒理学、体外实验和计算毒理学方面的优势,达到快速践行 NRC 观念的目的。

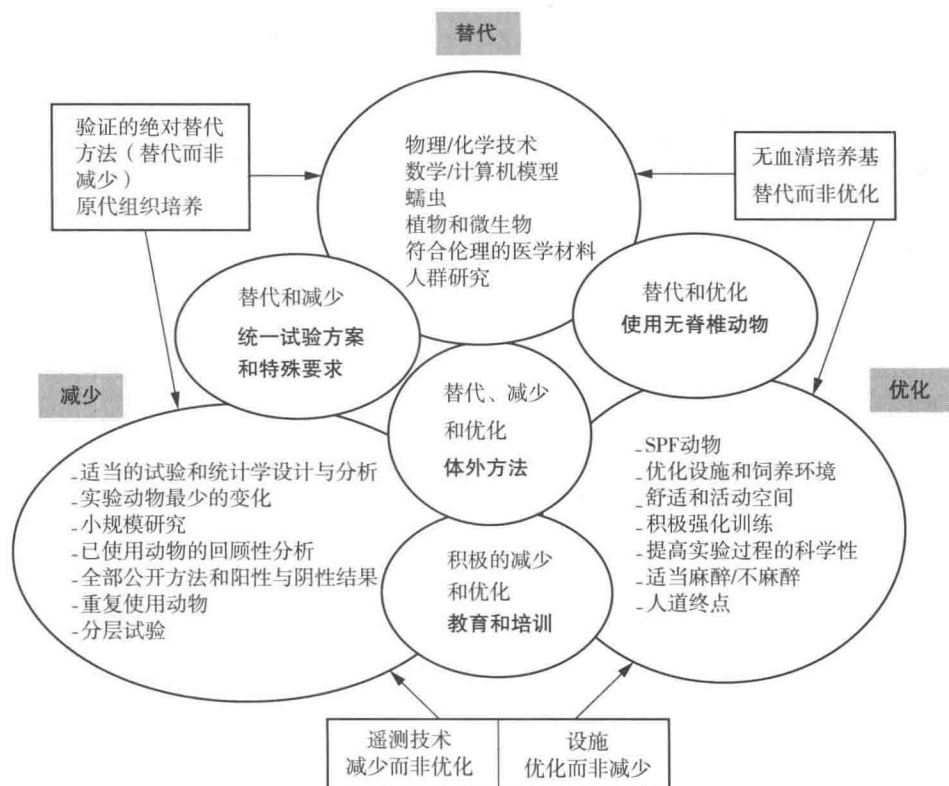


图 1-1 减少、替代和优化三者之间的相互关系 (de Boo, 2005)

第二节 替代方法要素

Section 2 Elements of alternative methods

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)、结论和报告等六个基本要素组成。还包括实验原理、适用范围等界定方法应用领域的因素。对于任何一个体外方法,除了开发实验室建立详细的 SOP 之外,还应当可重复和可转移,如果体外方法的开发或优化目标是为了修订或补充现行的测试指南,那么,该体外方法的结果还应当与人类健康的毒性终点之间建立预测关系,即把体外实验获得的数据与体内的生物学效应建立统计学模型,因此,严格意义上的替代方法 = 体外方法 + 预测模型。如果替代方法的适用性和科学性足够使之成为法规认可的方法,则替代方法还应当经过验证机构的证明,提供其科学性和可转移的充分证据,经同行评议后进入法规认可程序。因此,法规认可的替代方法 = 替代方法 + 验证和认可。

一、实验原理和目的

实验原理是整个替代方法的核心,主要说明预期测试终点与实验方法本身的相互关系,这种关系可能是以生物学机制为基础(如线粒体活性与细胞存活之间的关系),也可能建立在大量数据的统计学概率分析基础之上(如化合物细胞毒性与内暴露剂量毒性之间的关系),也可能基于共同的生物学效应(如原核生物基因突变与人细胞基因突变的相关性)等。建立替代方法的目的是利用体内效应(效应类型、靶器官、作用方式和程度、受试物种类等)与体外效应之间的相关性,建立可靠的测试方