附件3

**体外哺乳动物细胞基因突变试验技术指导原则**

**（征求意见稿）**

中国食品药品检定研究院

2023年2月

目 录

[一、概述 1](#_Toc7546)

[二、基本原则 2](#_Toc19415)

[（一）受试物的配制原则 2](#_Toc1642)

[（二）对照物的设置原则 2](#_Toc8138)

[（三）细胞的选择原则 4](#_Toc25026)

[（四）代谢活化系统的选择原则 4](#_Toc25797)

[（五）受试物剂量设计原则 5](#_Toc5237)

[三、基本内容 6](#_Toc15851)

[（一）试验设计 6](#_Toc12264)

[（二）需通过重复试验进行结果确证的情况 8](#_Toc1794)

[四、结果分析与评价 9](#_Toc20983)

[五、参考文献 10](#_Toc14848)

[六、术语和释义 10](#_Toc14875)

[七、附录 11](#_Toc6226)

一、概述

体外哺乳动物细胞基因突变试验是评价受试物遗传毒性的一项体外试验，能够检测受试物是否会引起哺乳动物细胞DNA中碱基对的排列顺序发生变化，包括碱基置换突变和移码突变。本试验在加入和不加入代谢活化系统（S9）的条件下，使培养的细胞暴露于受试物中一段时间后，再将其传代培养，在含有6-TG或三氟胸苷的选择性培养液中，突变细胞可以继续分裂形成集落。根据突变集落数计算突变频率，从而评价受试物是否具有致突变性。

本指导原则依据《化妆品安全技术规范》《化妆品注册和备案检验工作规范》《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》等相关要求，并参考国内外相关指南制定。

本指导原则适用于化妆品和新原料的体外致突变性遗传毒性研究及安全评估。本试验与经典的细菌回复突变试验（Ames试验）均为检测遗传毒性中的基因突变终点的方法，均可作为评价化妆品及新原料的致突变性试验组合的一部分，若Ames试验出现疑似假阳性结果，可采用本试验方法对可疑结果进行确证。当Ames试验对某类受试物（如纳米（新）原料）的潜在致突变性不敏感时，体外哺乳动物细胞基因突变试验可作为很好的替代和补充。

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，随着法规和标准的更新完善，以及科学技术的发展，将适时进行调整。

二、基本原则

本指导原则仅讨论体外哺乳动物细胞基因突变试验需要重点关注的问题，试验时需具体情况具体分析。

体外哺乳动物细胞基因突变试验的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，试验结果统计分析应科学合理。

**（一）****受试物的配制原则**

受试物为固体时，应溶解或分散悬浮于适合的溶媒中，用前稀释至适合浓度；液体受试物可以直接加入试验系统和/或用前稀释至适合浓度。受试物应无菌现用现配，否则须确认贮存不影响其稳定性。

对于化妆品终产品的测试，应按照产品实际使用方法配制受试物，并明确配制方法和使用浓度。例如染发剂，应按照产品使用方法或产品使用说明书中各剂型的比例进行配制，如有多种配制比例，则需制备多种配制比例的受试物。配制后的受试物如需进一步稀释，则应选用合适的溶媒并设置溶媒对照。

对于化妆品新原料，应根据原料的溶解性选择适宜的溶媒进行配制或稀释，并设溶媒对照。

1. **对照物的设置原则**

各实验室应建立历史背景对照数据库（包括阴性和阳性对照数据库）。

在加或不加S9条件下，均应设置阳性对照组和阴性对照组。

1. 阳性对照物：应使用已知的阳性诱变剂。在加S9条件下，应使用需要代谢活化、并能引起突变的阳性诱变剂。在加或不加S9条件下，可作为阳性对照的物质如下表所示。

表1. 不同试验条件下推荐选择的阳性对照物

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | -S9 | +S9 |
| HPRT试验 | 甲磺酸乙酯（ethyl methanesulfonate， EMS）；  乙基甲硝基脲（ethyl nitrosourea，ENU） | 3-甲基胆蒽（3-methylcholanthrene）；  N-亚硝基胍（N-nitroso-dimethylamine）；  7，12-二甲基苯蒽 |
| TK 试验 | 甲磺酸甲酯（methyl methanesulfonate， MMS）； | 1. 甲基胆蒽（3-methylcholanthrene）；   环磷酰胺（cyclophosphamide） |

阳性对照物需现用现配，否则须对受试物进行稳定性分析，以确认贮存不会对其稳定性和试验结果造成影响。

1. 阴性对照物：溶媒应为非致突变物，并且不与受试物发生化学反应、不影响细胞存活和S9的活性。常用的阴性对照物包括灭菌蒸馏水/去离子水（或无菌生理盐水）、培养液（不含血清）、二甲基亚砜（DMSO）、乙醇、丙酮等。通常二甲基亚砜（DMSO）在培养液中的终浓度不应超过0.5%。
2. 空白对照：如果现有资料不能证实溶媒不具有致突变性或其他有害作用时，或发现溶媒对照的数据与本实验室的历史空白对照背景数据有显著差异，还应增设空白对照。

**（三）细胞的选择原则**

*Hprt*位点突变分析常用中国仓鼠肺细胞株（V-79）和中国仓鼠卵巢细胞株（CHO）。*TK*位点突变分析常用小鼠淋巴瘤细胞株（L5178Y）和人类淋巴母细胞株（TK6）。

细胞需定期检查核型和染色体数目，以及有无支原体污染等，必要时进行自发突变细胞的清除。

当使用本试验方法对纳米原料进行体外基因突变性评价时，必须同时提交证明受试物纳米原料能够被所选择细胞系，最好是其细胞核，所摄取的试验数据或背景资料。

**（四）代谢活化系统的选择原则**

由于细胞的内源性代谢活化能力不足，需使用外源代谢活化系统，以检测受试物经代谢活化后是否具有致突变性。推荐使用S9 混合物（S9 mix）。S9 mix为经酶诱导剂如多氯联苯（Aroclor 1254）或联合使用苯巴比妥钠和β-萘黄酮诱导啮齿动物肝脏，经处理肝脏后而获得。S9 mix在试验系统中的使用终浓度一般为1%～10%（v/v），其活性需保持稳定，在使用浓度下必须能明显活化阳性对照物。（确认是否描述一致）

**（五）受试物剂量设计原则**

1.细胞毒性的确定原则

在加或不加S9两种条件下，可根据受试物在试验系统中的溶解度、细胞毒性检测结果、细胞悬浮增长率、对pH值和渗克分子浓度(Osmolality)的影响等参数判断细胞毒性，进而确定受试物最高剂量。

2. 受试物剂量设计原则

2.1 应当根据受试物对细胞的毒性、受试物在试验系统中的溶解度、pH值或渗克分子浓度的改变等不同因素确定最高受试浓度。应避免将可能产生对结果判定有影响的浓度确定为最高受试浓度，如细胞毒性过大、培养液中明显出现沉淀、或出现明显的pH或渗克分子浓度的改变等。需在正式试验前通过预试验确定受试物的最高受试浓度。

2.2 至少应设置4个可用于结果分析的受试物剂量组。最高浓度主要取决于受试物的细胞毒性和/或溶解度：

2.2.1 对于可溶性的、相对无细胞毒性的受试物，最高浓度应为5 μL/mL，5 mg/mL或0.01 mol/L。

2.2.2 对于可溶性的有细胞毒性的受试物，其浓度范围应包括从最大毒性至几乎无毒性，通常浓度间隔系数在2～之间。所选择的浓度应覆盖产生细胞毒性的范围，并且包括具有中度或少/无细胞毒性的浓度。应根据细胞毒性大小确定最高浓度，最高浓度应能产生80%～90%的细胞毒性，即最高浓度的细胞相对存活率（相对集落形成率）或相对细胞总生长率（Relative total growth，RTG）应为10%～20%（不低于10%）。

2.2.3 对于相对不溶解的受试物，最高浓度应达到或超过在细胞培养状态下的溶解度限制。若无细胞毒性，一般采用最小沉淀浓度作为最高浓度；若细胞毒性出现在最小沉淀浓度以上，一般建议只检测1个沉淀浓度，因为沉淀可能产生干扰。由于细胞、外源代谢活化系统等存在于试验系统内，可能会使受试物在染毒过程中溶解度发生改变，因此最好在试验染毒开始和结束时均对受试物溶解度进行判定。不溶解性可用肉眼鉴别，但沉淀不应影响观察。

三、基本内容

**（一）试验设计**

1. 试验时，应同时设置阳性对照组、阴性对照组和至少 4个可供分析的受试物剂量组，必要时设置空白对照组。

2. 各实验室应建立历史背景对照数据库（包括阴性和阳性对照数据库）。

3. 体外哺乳动物细胞*TK*基因突变试验即小鼠淋巴瘤细胞试验（MLA试验）。*TK*基因位点的突变可采用小鼠淋巴瘤L5178Y细胞和人淋巴母细胞TK6细胞。目前，TK6试验已纳入OECD指导原则，但对于该试验目前积累的试验经验较少，且未进行充分的方法学验证。若使用TK6细胞进行化妆品及新原料的致突变性评价，需要先经过充分的方法学验证。

4. 体外试验一般需要首先证明试验方法成立，以MLA试验为例：

阴性对照组和阳性对照组必须符合以下标准才可判定MLA试验成立。

阴性对照组的突变率、突变选择时的克隆率、悬液增长应满足以下条件：

表2. MLA成立的阴性对照组标准

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 参数 | 软琼脂法 | 微孔法 |
| 突变率（MF） | （35～140）×10-6 | （50～170）×10-6 |
| 克隆率 | 65%～120% | 65%～120% |
| 悬液增长 | 8～32倍（3～4小时处理）；  32～180倍（24小时处理） | 8～32倍（3～4小时处理）；  32～180倍（24小时处理） |

阳性对照组应满足以下条件之一：

（1）总突变率绝对增加，比自发背景突变率增加[即诱导MF（IMF）]至少300×10-6，至少40%的IMF应该在小菌落MF中。

（2）与同期阴性对照组比较，小菌落MF增加至少150×10-6。

MLA中突变率的增加具有生物学意义的评价标准为，在任何一种试验条件下，如果一个或多个浓度组的突变率增加超过总评价因子（Global evaluation factor，GEF）（GEF表示诱导突变率，即高于同期阴性对照的突变率的增加值。软琼脂法的GEF为90×10-6，微孔法的GEF为126×10-6），且呈浓度依赖性，判定为阳性结果。如果在所有试验条件下各浓度组的突变率无浓度依赖性增加或突变率的增加未超过GEF，判定为阴性结果。

**（二）需通过重复试验进行结果确证的情况**

1. 体外试验如果出现明确的阳性或阴性结果，不需要重复试验。如果无法获得明确结论时，应对数据进行进一步研究或更换试验条件（如改变试验浓度间距、改变代谢活化条件和受试物处理时间等），再重新进行试验，对结果进一步确证。

2. 当试验出现非预期结果或采用新方法时（如未采用《化妆品安全技术规范》或本指导原则中收录的试验方法、推荐使用的细胞系或检测指标等），有必要进行重复试验，对试验结果进行确证。

四、结果分析与评价

**（一）结果分析**

1. 结果中应描述各浓度组细胞毒性大小和沉淀情况。

2. 结果表示为各浓度组的突变率（Mutant frequency，MF）；应用χ2检验对阳性对照组、阴性对照组和受试物各剂量组的MF进行统计学分析。

**（二）结果评价**

在下列两种情况下可判定受试物在本试验系统中具有致突变性：

1.受试物引起突变频率的增加具有统计学意义，并与剂量相关。

2.受试物在任何一个剂量条件下，引起的突变频率增加具有统计学意义，并具有可重复性。

在评价试验结果时，还应对观察到统计学上的显著变化以及该变化是否具有生物学意义，对结果进行综合评估。

受试物在加和不加S9条件下，体外哺乳动物细胞基因突变试验结果均为阴性，可视为产品不具有致突变性；若以上任何一种条件下出现阳性结果，则视为产品具有潜在致突变性风险。

受试物的致突变试验组合（至少应包括一项基因突变试验和一项染色体畸变试验）结果应为阴性，如其中一项试验结果为阳性，应补充相应检测终点的其他试验，如哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验。

五、参考文献

1. 国家药品监督管理局.化妆品安全技术规范.(2015.12)

2.SCCS. Guidance on the safety assessment of nanomaterials in cosmetics.(2019.10)

3.SCCS. The SCCS Notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation (11th revision). (2021.3)

4.国家食品药品监督管理总局. 药物遗传毒性研究技术指导原则. (2018.3)

5. OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals: *In vitro* mammalian cell gene mutation tests using the *Hprt* and *xprt* genes (476).(2016.7)

6. OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals: *In vitro* mammalian cell gene mutation tests using the Thymidine Kinase gene (490).(2016.7)

7.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10部分： 体外哺乳动物细胞基因突变试验: GBZ/T 240.10-2011. (2011.8)

六、术语和释义

（一）致突变性（Mutagenicity）：

在毒理学中，通常广义地将至突变定义为基因突变和染色体畸变；其中，染色体结构畸变和染色体数目畸变统称为染色体畸变。

（二）诱变剂（Mutagen）：

即致突变物。一般狭义的是指能引起基因突变或增加突变速度的物质，而将引起染色体结构畸变和染色体数目异常的物质分别称为断裂剂和非整倍体诱变剂。广义的诱变剂则既包括引起基因突变的物质，也包括了引起染色体结构或数目异常的物质。

（三）基因突变（Gene mutation）

基因突变是指基因在结构上发生了碱基对组成和排列顺序的改变。这种改变可发生于生殖细胞或体细胞，发生于生殖细胞的突变可以遗传给下一代，发生于体细胞的突变可以遗传给该细胞有丝分裂而产生的子代。

（四）小鼠淋巴瘤细胞试验（Mouse lymphoma assay，MLA）：

*TK*基因突变试验和*Hprt*基因突变试验均可使用小鼠淋巴瘤细胞L5178Y细胞开展，其中使用L5178Y细胞开展*TK*基因突变试验又称小鼠淋巴瘤细胞试验。

七、附录

可参考《化妆品安全技术规范》中收录的“体外哺乳动物细胞基因突变试验”方法。