附件1

**体外哺乳动物细胞染色体畸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](#_Toc127013428)

[二、基本原则 1](#_Toc127013429)

[三、基本内容 2](#_Toc127013430)

**[（一）受试物的配制原则](#_Toc127013431)** [2](#_Toc127013431)

**[（二）对照物的设置原则](#_Toc127013432)** [2](#_Toc127013432)

**[（三）细胞的选择原则](#_Toc127013433)** [3](#_Toc127013433)

**[（四）代谢活化系统的选择原则](#_Toc127013434)** [3](#_Toc127013434)

**[（五）受试物剂量的设计原则](#_Toc127013435)** [4](#_Toc127013435)

**[（六）试验设计](#_Toc127013436)** [5](#_Toc127013436)

[四、结果分析与评价 6](#_Toc127013437)

**[（一）结果分析](#_Toc127013438)** [6](#_Toc127013438)

**[（二）结果确认](#_Toc127013439)** [7](#_Toc127013439)

**[（三）结果评价](#_Toc127013440)** [7](#_Toc127013440)

[五、参考文献 8](#_Toc127013441)

[六、术语和释义 8](#_Toc127013442)

[六、附录 9](#_Toc127013443)

一、概述

体外哺乳动物细胞染色体畸变试验是评价受试物是否具有遗传毒性的一项体外试验，能够检测受试物是否引起哺乳动物细胞染色体结构畸变。该试验可使用已建立的细胞株或细胞系，也可使用原代培养细胞。在加入和不加入外源代谢活化系统的条件下，使培养的哺乳动物细胞暴露于受试物中，应用中期分裂相阻断剂处理，使细胞停止在中期分裂相，随后收获细胞、制片和染色后，分析细胞染色体畸变，从而检测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

体外哺乳动物细胞染色体畸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。

本指导原则仅阐述体外哺乳动物细胞染色体畸变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）****受试物的配制原则**

固体受试物应溶解或悬浮于适合的溶剂中，使用前稀释至适当浓度；液体受试物可以直接加入试验系统和/或用前稀释至适当浓度。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，应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。如为染发产品，应按照产品使用方法或产品使用说明书中各剂型的配制比例进行配制，如有多种配制比例，则需进行多个比例受试物的配制。配制后的受试物如需进一步稀释，则应选用合适的溶剂并设阴性对照。

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

**（二）对照物的设置原则**

试验时应同时设置阳性对照组、阴性对照组，必要时设置空白对照组。每个实验室需建立自己的阳性对照、阴性对照、空白对照的历史背景数据库，以有效控制试验质量。

1．阳性对照物：应是已知的断裂剂，能引起可检出并可重复的阳性结果。根据受试物的结构特点和理化性质选择合适的阳性对照物。在加外源代谢活化系统条件下，常用的阳性对照物包括环磷酰胺、苯并［a］芘。在不加外源代谢活化系统条件下，常用的阳性对照物包括丝裂霉素C、甲磺酸甲酯（MMS）、甲磺酸乙酯（EMS）、乙基亚硝基脲、4-硝基喹啉-N-氧化物等。阳性对照物需现用现配，否则须确认贮存不影响其稳定性。

2.阴性对照物：溶剂应为非致突变物，不与受试物发生化学反应，且不影响细胞存活和代谢活化系统活性。常用的阴性对照物包括水（或生理盐水）、培养液（不含血清）、二甲基亚砜（DMSO）等。通常二甲基亚砜（DMSO）在培养液中的终浓度不应超过0.5%，水（或生理盐水）不应超过10%。

3.空白对照：如果现有资料不能证实溶剂不具有致突变性，或发现溶剂对照与本实验室的历史空白对照背景资料有明显差异，还应设空白对照。

**（三）细胞的选择原则**

可使用已建立的细胞株或细胞系（如中国地鼠卵巢（CHO）细胞株或中国地鼠肺（CHL）细胞株），也可使用原代培养细胞（如哺乳动物外周血淋巴细胞）。所使用的细胞应在生长性能、染色体数目和核型、自发的染色体畸变率等方面基本保持稳定。细胞需定期检查核型和染色体数目，检测有无支原体污染等。

**（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的使用终浓度为1%～10%，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。

**（五）受试物剂量的设计原则**

1.细胞毒性的确定原则

在外源活化系统存在或不存在的两种条件下，可应用细胞覆盖程度（degree of confluency）、存活细胞计数（viable cell counts）、相对群体倍增数（Relative population doubling，RPD）等指示细胞生长情况的指标确定细胞株毒性；外周血淋巴细胞可通过有丝分裂指数（mitotic index）确定细胞毒性。

2. 受试物剂量的设计原则

受试物剂量的设计应满足以下要求。

2.1 在正式试验前需进行预试验，根据受试物对细胞的毒性、受试物在试验系统中的溶解度以及pH或渗克分子浓度(osmolality)的改变等不同因素来确定其最高受试浓度。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、培养液中出现沉淀、或出现明显的pH或渗克分子浓度的改变等。

2.2 应至少设置 3个可供分析的受试物剂量组。当受试物有细胞毒性时，其浓度范围应包括从最大毒性至几乎无毒性；一般其浓度间隔系数不大于2～。如果为了获得较低或中等细胞毒性的研究数据或验证剂量反应关系时，有必要使用间隔系数较小的三个以上的受试浓度进行试验。

2.3 在收获细胞时，受试物的最高受试浓度应能达到55±5%的细胞毒性，即细胞覆盖程度、存活细胞计数、相对群体倍增数，或原代培养的淋巴细胞有丝分裂指数降低到阴性对照组的45±5%。

2.4 当受试物为相对无细胞毒性的化合物时，其最高受试浓度应为5μL/mL，5mg/mL或0.01mol/L。

2.5 由于细胞、外源代谢活化系统等的存在，受试物在试验系统内在暴露过程中其溶解度可能发生变化，因此最好在试验处理开始和结束时均评价其溶解度。对于相对不溶解的物质，当浓度低于不溶解浓度时仍无毒性，则最高剂量应选择当处理期结束时在最终培养液中溶解度限值以上的一个浓度。在仅当高于最低不溶解浓度时才发生细胞毒性时，应使用一个以上可看见沉淀的浓度，但应注意确保沉淀不会干扰试验（如染色或染色体畸变分析）。

**（六）试验设计**

试验时应同时设置阳性对照组、阴性对照组和至少 3个可供分析的受试物剂量组，必要时设置空白对照组。

应在外源活化系统存在和不存在的条件下分别进行试验，受试物需与细胞作用3～6h，在 24h 内收获细胞。收获前2h-4h，加入细胞中期分裂相阻断剂（如秋水仙素），随后收获细胞、低渗处理、固定、制片和染色后，分析染色体畸变。

四、结果分析与评价

**（一）结果分析**

1. 观察数量

对化妆品终产品，每一处理组应至少选100个分散良好的中期分裂相，且每个观察细胞的染色体数在2n±2范围之内，进行染色体畸变分析。对化妆品原料，则每一处理组至少选200个分散良好的中期分裂相进行染色体畸变分析，但阳性对照组可选100个。

2. 观察指标

应观察染色体结构畸变的类型，包括断裂、裂隙、微小体、单体互换、微小体、双微小体、有着丝点环、无着丝点环、非特定性型变化；可同时观察染色体数目的改变，包括非整倍体、多倍体、核内复制。并应记录畸变细胞在显微镜视野的坐标位置和畸变类型。

3. 统计学分析

应用χ2检验对阳性对照组、阴性对照组、空白对照组（如有）和受试物各剂量组的染色体畸变细胞率进行统计学分析。

**（二）结果确认**

当受试物为化妆品原料时，如果在加入和不加入S9 mix的条件下，与细胞作用3～6h时均获得阴性结果，则需在不加S9 mix的条件下，重新检测受试物与试验系统的作用时间延长至24h的结果。

如果无法获得明确结论时，应更换试验条件如改变代谢活化条件（如改变使用浓度或代谢活化系统来源）、受试物与试验系统接触时间等，或使用间隔系数较小的三个以上的受试浓度，再重新试验，进行结果确认。

**（三）结果评价**

根据统计分析结果，符合下列两种情形可判定受试物在本试验系统中具有致突变性：

1.受试物引起染色体结构畸变数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，引起的染色体结构畸变数增加具有统计学意义，并有可重复性。

大部分的致突变剂引起染色单体型畸变，少量引起染色体型畸变。染色体畸变分析时可能发现多倍体，出现染色体数目畸变的可能，但本方法不适用于检测染色体的数目畸变。

试验阳性结果表明受试物在该试验条件下具有致突变性。阴性结果表明在该试验条件下受试物不具有致突变性。结果评价时还应把统计学意义与生物学意义相结合，进行综合考虑。

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.473: *In vitro* mammalian chromosomal aberration test.2016.

3.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 [S]. 2018.

4. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验: GB 15193.23-2014 [S].

六、术语和释义

（一）染色体结构畸变（structural aberration）

应用显微镜可以检查出发生在细胞有丝分裂中期的染色体结构损伤，主要表现为染色体中间缺失或断片、染色体互换等。染色体结构畸变可分为染色体型畸变（chromosome-type aberration）和染色单体型畸变（chromatid-type aberration）。

1.染色体型畸变

两个染色单体相同位点均出现断裂或断裂重组的改变。

2.染色单体型畸变

染色单体断裂或染色单体断裂重组的损伤。

（二）有丝分裂指数（ mitotic index ）

中期相细胞数与所观察的细胞总数之比值；是一项反映细胞增殖程度的指标。

（三）核内复制

在 DNA复制的S期之后，细胞核未进行有丝分裂就开始了另一个 S期的过程，其结果是染色体有4、8、16…倍的染色单体。

（四）裂隙

染色体或染色单体损伤的长度小于一个染色单体的宽度，为染色单体的最小错误排列。

六、附录

试验方法可参照《化妆品安全技术规范》中收录的“体外哺乳动物细胞染色体畸变试验”。