
附件 4

体外哺乳动物细胞染色体畸变试验方法（征求意见稿）

In Vitro Mammalian Cells Chromosome Aberration Test

1 范围

本方法规定了体外哺乳动物细胞染色体畸变试验的基本原则、要求和方法。

本方法适用于评价化妆品原料及其产品的致突变性。

2 试验目的

本试验用于检测培养的哺乳动物细胞染色体畸变，以评价受试物致突变的可能性。

3 定义

3.1 染色体型畸变 chromosome-type aberration

染色体结构损伤，表现为在两个染色单体相同位点均出现断裂或断裂重组的改变。

3.2 染色单体型畸变 chromatid-type aberration

染色体结构损伤，表现为染色单体断裂或染色单体断裂重组的损伤。

3.3 染色单体裂隙 chromatid gap

单个染色单体上出现的无染色质的区域，其宽度小于染色单体的横截面的宽度。其中存在染色单体的最小错位。

3.4 染色单体断裂 chromatid break

染色单体的不连续，其中有一条明显的不对称染色单体。

3.5 多倍体 polyploidy

整个染色体组的细胞或生物体中的染色体数目畸变，而不是单个染色质或染色体（非整倍体）。

3.6 核内复制 endoreduplication

DNA 复制的 S 期末，细胞核没有进入有丝分裂，而开始另一个 S 期的过程，其结果是染色体具有 4, 8, 16, ..., 个染色单体。

3.7 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。

4 试验基本原则

在加入和不加入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。用中期分裂相阻断剂（如秋水仙素或秋水仙胺）处理，使细胞停止在中期分裂相，随后收获细胞，制片，染色，分析染色体畸变。

大部分的致突变剂导致染色单体型畸变，偶有染色体型畸变发生。虽然多倍体的增加可能预示着有染色体数目畸变的可能，但本方法并不适合用于测定染色体的数目畸变。

5 试验方法

5.1 试剂和受试物制备

5.1.1 阳性对照：可根据受试物的性质和结构选择适宜的阳性对照物，阳性对照物应是已知的断裂剂，能引起可检出的、可重复的阳性结果。当外源性活化系统不存在时，可使用甲磺酸甲酯（Methyl methanesulphonate, MMS）、甲磺酸乙酯（Ethyl methanesulphonate, EMS）、乙基亚硝基脲（Ethyl nitrosourea）、丝裂霉素 C（Mitomycin C）、4-硝基喹啉-N-氧化物（4-Nitroquinoline-N-Oxide）。当外源性活化系统存在时，可使用苯并[a]芘（Benzo [a] pyrene）、环磷酰胺（Cyclophosphamide）。

5.1.2 阴性对照：应设阴性对照，即仅含和受试物组相同的溶剂，不含受试物，其他处理和受试物组完全相同。

5.1.3 空白对照：如未能证实所选溶剂不具有致突变性，溶剂对照与本实验室空白对照背景资料有明显差异，还应设空白对照。

5.1.4 受试物

5.1.4.1 受试物的配制：固体受试物需溶解或悬浮于溶剂中，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。受试物应在使用前新鲜配制，否则就必须证实贮存不影响其稳定性。

5.1.4.2 溶剂的选择：溶剂必须是非致突变物，不与受试物发生化学反应，不影响细胞存活和 S₉ 活性。首选溶剂是培养液（不含血清）或水。二甲基亚砜（DMSO）也是常用溶剂，使用时浓度不应大于 0.5%。

5.1.4.3 受试物浓度设置

（1）最高浓度的选择：

决定最高浓度的因素是细胞毒性、受试物在试验系统中的溶解度以及 pH 或渗透压摩尔浓度（osmolality）的改变。应通过预试验获得正式试验的最高受试物浓度。

（2）细胞毒性的确定：

应使用指示细胞完整性和生长情况的指标，在活化系统存在或不存在的两种条件下确定细胞毒性，例如细胞融合度（degree of confluency）、存活细胞计数（viable cell counts）或有

丝分裂指数 (mitotic index)。应在预试验中确定细胞毒性和溶解度。

(3) 剂量设置:

①至少应设置 3 个可供分析的浓度。当有细胞毒性时,其浓度范围应包括从最大毒性至几乎无毒性;通常浓度间隔系数不大于 $2 \sim \sqrt{10}$ 。

②在收获细胞时,最高浓度原则上应达到 $55 \pm 5\%$ 细胞毒性的剂量(细胞融合度、细胞计数明显降低,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 $45 \pm 5\%$)。

③对于那些相对无细胞毒性的物质,最高浓度应是 $5 \mu\text{L/mL}$, 5 mg/mL 或 0.01 mol/L 。

④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,则最高剂量应是当处理期结束时,在最终培养液中溶解度限值以上的一个浓度。在某些情况下(即仅当高于最低不溶解浓度时才发生细胞毒性),应使用一个以上可看见沉淀的浓度。最好在试验处理开始和结束时均评价溶解度,因为由于细胞、 S_9 等的存在,在试验系统内在暴露过程中溶解度可能变化。不溶解性可用肉眼鉴别,但沉淀不能影响观察。

5.1.5 培养液:采用 MEM (Eagle),并加入非必需氨基酸和抗菌素(青霉素,最终工作浓度为 100 IU/mL ;链霉素,最终工作浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$),胎牛血清或小牛血清按 10% 加入。也可选用其他合适的培养液。

5.1.6 活化系统

通常使用 S_9 混合物 ($\text{S}_9 \text{ mix}$)。 S_9 是从经酶诱导剂 (Aroclor 1254 或苯巴比妥钠和 β -萘黄酮联合使用) 处理的啮齿动物肝脏获得的。 S_9 的使用浓度为 $1\% \sim 10\%$ (终浓度)。 $\text{S}_9 \text{ mix}$ 中所加辅助因子的量由各实验室自行决定,但需对 $\text{S}_9 \text{ mix}$ 的活性进行鉴定,必须能明显活化阳性对照物。也可使用下述方法配制: S_9 0.125 mL , MgCl_2 (0.4 mol/L) 0.02 mL , KCl (1.65 mol/L) 0.02 mL , 葡萄糖-6-磷酸 1.791 mg , 辅酶 II (氧化型, NADP) 3.0615 mg , 用无血清 MEM 培养液补足至 1 mL 。

5.2 试验步骤

5.2.1 细胞:可使用已建立的细胞株或细胞系,也可使用原代培养细胞。所使用的细胞应该在生长性能、染色体数目和核型、自发的染色体畸变率等方面有一定的稳定性。需定期检查细胞株的核型和染色体数目,检测有无支原体污染等。可使用多种细胞系,如中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)、中国仓鼠肺细胞 V79、中国仓鼠肺细胞 (CHL) /IU、TK6 或原代细胞培养物(包括人类或其他哺乳动物的外周血淋巴细胞)。所用细胞系的选择应具有科学依据。当使用原代细胞时,出于动物福利的考虑在可行且符合人体伦理原则与法规的前提下,优先考虑使用人源原代细胞。

5.2.2 试验时,应同时设阳性对照、阴性对照和至少 3 个可供分析的受试物浓度组。必要时,应增设空白对照。

5.2.3 试验前一天,将一定数量的细胞接种于培养皿(瓶)中,以收获细胞时,培养皿(瓶)的细胞未长满为标准,一般以长到 85% 左右为佳。如用 CHL 细胞,可接种 1×10^6 个,放 CO_2

培养箱内培养。

5.2.4 试验需在加入和不加入 S₉ mix 的条件下进行。试验时，吸去培养皿（瓶）中的培养液，加入一定浓度的受试物、S₉ mix（不加 S₉ mix 时，需用不含血清培养液补足）以及一定量不含血清的培养液，放培养箱中处理 3 ~ 6 h。结束后，吸去含受试物的培养液，用 Hanks 液洗细胞 3 次，加入含 10%胎牛血清的培养液，放回培养箱，于 24 h 内收获细胞（从处理开始算起，总时间约为 1.5 个正常细胞周期）。于收获前 2 ~ 4 h，加入细胞分裂中期阻断剂（如用秋水仙素，作用时间为 4 h，终浓度为 1 µg/mL）。

当受试物为原料时，如果在上述加入和不加入 S₉ mix 的条件下均获得阴性结果，则尚需补加另外的试验，即在不加 S₉ mix 的条件下，使受试物与试验系统的接触时间延长至 24 h（接触过程中需加入含 10%胎牛血清的培养液）。

当难以得出明确结论时，应更换试验条件，如改变代谢活化条件、受试物与试验系统接触时间等重复试验。

5.2.5 收获细胞时，用 0.25%胰蛋白酶溶液消化细胞，待细胞脱落后，加入含 10%胎牛或小牛血清的培养液终止胰蛋白酶的作用，混匀，放入离心管以 1000 ~ 1200 r/min 的速度离心 5 ~ 7 min，弃去上清液，加入 0.075 mol/L KCl 溶液，用滴管将细胞轻轻地混匀，放入 37 °C 细胞培养箱中低渗处理。继而以新配制的甲醇和冰醋酸液（容积比为 3:1）进行固定。空气干燥或火焰干燥法常规制片，用姬姆萨染液染色。

5.2.6 所有玻片（包括阳性和阴性对照玻片）在镜检分析染色体畸变前应进行独立编码。由于固定过程常导致一部分中期细胞丢失染色体，因此所计数的细胞中期分裂相染色体数为 $2n \pm 2$ 。

为获得准确的分析结果，每种浓度和对照至少应选择 300 个分散良好的中期分裂相细胞。结果明确时可减少阳性对照细胞数（一般不少于 100 个），但需取得明确的阳性结果。

应计数具有结构染色体畸变（包括裂隙和不包括裂隙）的细胞。染色单体型和染色体型畸变应分别记录并按亚型（断裂、交换）分类。尽管本试验旨在检测结构染色体畸变，但当观察到多倍体和核内复制频率时，也应对其进行记录。

5.3 试验结果

应评估具有结构染色体畸变的细胞百分比。应按亚型（断裂、交换）分类的染色单体型和染色体型畸变，分别列出其在实验组和对照组中的数量及频率。裂隙应单独记录和报告，但不计入总畸变频率。当观察到多倍体和/或核内复制细胞时，应报告其百分比。

应记录主要畸变试验中所有处理组、阴性及阳性对照的同步细胞毒性测定数据。

5.4 统计处理：对染色体畸变细胞率用 χ^2 检验，以评价受试物的致突变性。

5.5 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）受试物引起染色体结构畸变数具有统计学意义，并有剂量相关性。

(2) 受试物在任何一个剂量条件下，引起具有统计学意义的增加，并有可重复性。

在评价时应把生物学和统计学意义结合考虑。

6 结果解释

阳性结果表明受试物引起培养的哺乳动物体细胞染色体结构畸变。

阴性结果表明在本试验条件下，受试物不引起培养的哺乳动物体细胞染色体结构畸变。

体外哺乳动物细胞染色体畸变试验方法（征求意见稿）

起草说明

为加强化妆品的监督管理，进一步提高化妆品使用安全性，国家药监局化妆品标准化技术委员会组织开展了《体外哺乳动物细胞染色体畸变试验方法》的研究制定工作。现就工作有关情况说明如下：

一、起草原则

（一）依法依规原则。遵循依法依规原则，贯彻落实《化妆品监督管理条例》及配套法规文件中关于化妆品和新原料的法规要求，切实为化妆品和新原料的安全评价提供技术指导，也为技术审评以及监管提供依据。

（二）科学导向原则。充分考虑科学研究进展以及化妆品行业的实际情况，以科学为导向，对体外哺乳动物细胞染色体畸变试验进行修订。

（三）科学规范原则。本试验方法采用目前国内外常用试验方法，保证方法科学、规范的同时，确保标准文本表述清晰、严谨，兼顾与国际标准的接轨性、先进性。

二、起草过程

国家药监局化妆品标准化技术委员会于 2025 年 1 月委托开展体外哺乳动物细胞染色体畸变试验的修订工作。前期准备工作包括查阅文献、参考相关的国家和行业标准、调研化妆品注册资料中该试验的相关问题、研究修订方案等。根据专家意见，经整理归纳后，最终形成了体外哺乳动物细胞染色体畸变试验文本，并于 2025 年 9 月通过国家药监局化妆品标准化技术委员会安全评价分技术委员会初审。

三、与我国已有相关标准的关系

染色体畸变包括染色体结构畸变和数目异常。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。《化学品 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验方法》（GB/T 21794-2008）规定的染毒浓度为“最高浓度组应见到明显的细胞融合、细胞计数或有丝分裂指数降低（均应大于 50%）”。《食品安全国家标准 体外哺乳类细胞染色体畸变试验》（GB 15193.23-2014）中对最高剂量的选择规定为“当收获细胞时，最高剂量应能明显减少细胞计数或有丝分裂指数（大于 50%，如毒性过大，应适当增加接种细胞数）；同时应该考虑受试物对溶解度、pH 和摩尔渗透压浓度的影响”。《药物遗传毒性研究技术指导原则》中规定“哺乳动物细胞体外遗传学试验中，最高浓度产生的细胞毒性应约为 50%”。在此基础上，结合化妆品审评实际，对最高浓度选择和剂量设置要求进行了研究和比对。

四、与《规范》中原方法的对比情况

原方法中对最高受试浓度的规定为“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以及pH或渗透分子浓度的改变等不同因素来确定”“最高浓度应能明显降低细胞覆盖程度、细胞计数或有丝分裂指数（均应大于50%）”，未对细胞毒性的具体范围进行明确。为规范依据受试物对细胞的毒性来确定其最高受试浓度，修订后的方法明确在收获细胞时，最高受试浓度应为能达到 $55 \pm 5\%$ 细胞毒性的剂量，即细胞覆盖程度、细胞计数，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 $45 \pm 5\%$ 。

原方法中作染色体分析的细胞数为化妆品终产品选择100个分散良好的中期分裂相细胞，原料选200个细胞，且对分析时需记录的细胞情况要求较为简单。为获得准确的分析结果，修订后的方法调整为应选择300个分散良好的中期分裂相细胞，结果明确时可减少阳性对照细胞数（一般不少于100个），并且不再区分化妆品终产品和原料。此外，为规范实验数据分析和记录，加强操作性，对染色体分析和结果记录进行了更为详细的规定。

在5.1.4中明确了应通过预试验获得正式试验的最高受试物浓度。在5.1.5对链霉素的使用浓度进行了规范。在5.2.1中增加对细胞定期检查的相关要求，补充了可用的细胞系和对选用原代细胞的要求。在5.2.4中明确当受试物为原料时，在不加S₉ mix的条件下，使受试物与试验系统的接触时间延长至24 h时接触过程中需加入含10%胎牛血清的培养液。

在第3部分对修订后的文本中涉及的定义进行了增加。

对原方法的表述进行了规范。对原方法进行了勘误，如原方法中“推荐使用中国地鼠卵巢（CHO）细胞株或中国地鼠肺（CHL）细胞株”，实际应为中国仓鼠。

五、国际相关标准情况

本方法修订时参考了经济合作发展组织（OECD）的方法：No.473 In vitro mammalian chromosomal aberration test。