



中华人民共和国国家标准

GB/T 16175—2008
代替 GB/T 16175—1996

医用有机硅材料生物学评价试验方法

Biological evaluation test methods for medical organic silicon materials

2008-01-22 发布

2008-09-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	I
引言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 评价与试验选择	1
4 样品制备	1
5 细胞毒性试验	2
6 迟发型超敏反应试验	5
7 刺激试验	6
8 急性全身毒性试验	7
9 亚急性(亚慢性)和慢性全身毒性试验	8
10 热原试验	11
11 遗传毒性试验	12
12 植入试验	21
13 溶血试验	23
附录 A (资料性附录) 细胞培养常用溶液和培养基制备	25
附录 B (资料性附录) 遗传毒性试验用试剂制备	27
参考文献	31

前 言

本标准代替 GB/T 16175—1996《医用有机硅材料生物学评价试验方法》。本次修订按 GB/T 16886《医疗器械生物学评价》对标准内容进行了修改和调整。

本标准与 GB/T 16175—1996 的主要差异如下：

- 增加了规范性引用文件；
- 试验选择指南改为评价与试验选择，取消了试验选择表；
- 修改了材料浸提液制备方法，取消了供试品表面积或重量与浸提介质比例表；
- 修改了细胞毒性试验，包括浸提液和直接接触试验；
- 过敏试验修改为迟发型超敏反应试验，增加了封闭贴敷迟发型超敏反应试验；
- 将皮内刺激试验、原发性皮肤刺激试验和眼刺激试验整合为刺激试验，包括皮肤刺激试验、眼刺激试验和皮内反应试验。取消了口腔黏膜刺激试验；
- 增加了亚急性(亚慢性)和慢性全身毒性试验；
- 增加了遗传毒性试验，包括鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)、小鼠淋巴瘤细胞突变试验和体外哺乳动物细胞染色体畸变试验；
- 修改了植入试验，增加了皮下和骨植入试验；
- 增加了附录 B 遗传毒性试验用试剂制备。

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由国家食品药品监督管理局提出。

本标准由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：国家食品药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心、上海生物材料研究测试中心。

本标准主要起草人：由少华、孙皎、朱雪涛、黄哲玮、黄经春、王昕、侯丽、曾冬明。

本标准于 1996 年 3 月首次发布。

引 言

本标准给出的试验方法是根据 GB/T 16886.1《医疗器械生物学评价 第1部分:评价与试验》的基本原则,特别针对医用有机硅材料的生物学评价需求所设立的。本次修订是在 GB/T 16886《医疗器械生物学评价》标准和《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)二部中相应试验方法学原理和试验步骤的基础上,并根据医用有机硅材料的特性制定而成,因此本标准是与 GB/T 16886 标准和《中国药典》方法具有方法学等同性、适用于医用有机硅材料生物学评价的方法标准。

本次修订对热原试验直接引用《中国药典》中的适用章节;对 GB/T 16886 标准中未给出详细试验步骤的试验项目进行了细化,例如细胞毒性、急性全身毒性、亚急性(亚慢性)和慢性全身毒性、遗传毒性和植入试验;对 GB/T 16886 标准中已详细给出试验步骤的刺激、迟发型超敏反应试验,本次修订采用直接引用相应 GB/T 16886 标准的方式。

鉴于亚急性(亚慢性)和慢性全身毒性、遗传毒性试验均为发展中的生物学试验,本标准给出的试验方法并非为唯一的方法,任何经确认符合 GB/T 16886 标准基本试验原理且适用于医用有机硅材料的试验方法均可视为与本标准具有方法学等同性。

医用有机硅材料生物学评价试验方法

1 范围

本标准规定了医用有机硅材料的生物学评价试验方法。

本标准适用于医用有机硅材料的生物学评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分:评价与试验(GB/T 16886.1—2001, idt ISO 10993-1:1997)

GB/T 16886.3 医疗器械生物学评价 第3部分:遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验(GB/T 16886.3—1997, idt ISO 10993-3:1992)

GB/T 16886.5 医疗器械生物学评价 第5部分:体外细胞毒性试验(GB/T 16886.5—2003, idt ISO 10993-5:1999)

GB/T 16886.6 医疗器械生物学评价 第6部分:植入后局部反应试验(GB/T 16886.6—1997, idt ISO 10993-6:1994)

GB/T 16886.10 医疗器械生物学评价 第10部分:刺激与迟发型超敏反应试验(GB/T 16886.10—2005, ISO 10993-10:2002, IDT)

GB/T 16886.11 医疗器械生物学评价 第11部分:全身毒性试验(GB/T 16886.11—1997, idt ISO 10993-11:1993)

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分:样品制备与参照样品(GB/T 16886.12—2005, ISO 10993-12:2002, IDT)

中华人民共和国药典(二部)

3 评价与试验选择

3.1 总则

医用有机硅材料按其预期与人体接触的性质和接触时间按照 GB/T 16886.1 规定的基本原则进行生物学评价。

3.2 试验选择

GB/T 16886.1 中给出了应考虑的评价试验。对于可能影响机体生殖功能的材料,应补充做生殖和发育毒性试验。

4 样品制备

4.1 总则

试验与对照样品制备应按 GB/T 16886.12 的要求进行。如果试验方案要求使用试验材料的浸提液,所用浸提介质和浸提条件应与最终产品的特性和使用以及试验目的相适应。在选择浸提条件时应考虑试验材料的理化特性、可溶出物或残留物。

4.2 浸提条件

如需制备浸提液,材料与浸提介质比例按 GB/T 16886.12 的规定。常规浸提条件见表 1。

表 1 常规浸提条件

浸提温度/℃	浸提时间/h	浸提设备
37±1	24±2	电热恒温培养箱
37±1	72±2	电热恒温培养箱
50±2	72±2	电热恒温培养箱
70±2	24±2	电热恒温干燥箱
121±2	1±0.1	电热蒸汽灭菌器
注:(37±1)℃浸提(24±2)h一般仅用于浸提介质为含血清细胞培养基时。		

5 细胞毒性试验

5.1 方法提要

本试验系将试验样品接触培养细胞,通过对细胞形态、增殖和抑制影响的观察,评价试验材料对体外细胞的毒性作用。

注:也可采用其他等效的符合 GB/T 16886.5 要求的细胞毒性试验。

5.2 试剂

氯化钠、氯化钾、氯化钙、硫酸镁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氢氧化钠、葡萄糖、酚红、台盼蓝、乙二醇四乙酸二钠(EDTA)、胰蛋白酶、Eagle 培养基、RPMI 1640 培养基、胎(小)牛血清、青霉素 G(钠盐)、硫酸链霉素、乙醇、苯酚、二甲基亚砜(DMSO)。

5.3 主要设备和用具

超净工作台、CO₂ 培养箱、恒温水浴箱、电冰箱、倒置显微镜、光学显微镜、压力蒸汽灭菌器、抽滤瓶、磁力搅拌器、培养板(皿)、液氮罐或超低温冰箱、天平。

5.4 细胞株

试验用细胞株可采用 ATCC CCL 1[NCTC clone 929(小鼠成纤维细胞)]或其他适宜细胞。试验采用传代 48 h~72 h 生长旺盛的细胞。

5.5 试验前准备

5.5.1 器具灭菌

与试验和对照样品接触的所有器具应采用可靠方法灭菌,置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min,或置电热干燥箱内 160℃ 2 h。

5.5.2 无菌室要求

无菌室操作台或超净工作台局部应符合洁净度 100 级单向流空气区域要求。

5.5.3 细胞培养基、细胞消化液、平衡盐溶液制备

按附录 A 给出的方法或其他经确认适宜的方法制备。

5.5.4 试验样品制备

5.5.4.1 无菌试验材料直接取样试验。未灭菌试验材料宜采用与成品相同的灭菌过程或其他适宜方法灭菌。

5.5.4.2 需制备浸提液时可采用含血清(或无血清)细胞培养基或质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液为浸提介质,制备方法按 GB/T 16886.5 的规定。

5.5.5 对照品制备

5.5.5.1 阴性对照品:可采用经确认过的不产生细胞毒性反应的材料,例如高密度聚乙烯。

5.5.5.2 阳性对照品:可采用经确认过的可重现细胞毒性反应的材料,例如用有机锡作稳定剂的聚氯乙烯、质量浓度为 5 g/L 的苯酚溶液或体积分数为 5%的二甲基亚砜(DMSO)溶液。

5.5.5.3 需制备浸提液时间同 5.5.4.2。

5.6 试验步骤

5.6.1 总则

根据试验材料特性选择下列试验中的一种或多种适宜方法进行评价。

5.6.2 浸提液试验

5.6.2.1 四唑盐(MTT)比色法

将配制好的 1×10^4 /mL 细胞悬液接种于 96 孔培养板,设置空白对照、阴性对照、阳性对照和试验样品组,每组各设至少 6 孔,每孔接种 100 μ L 细胞悬液。置 CO₂ 培养箱(含体积分数 5%二氧化碳气体,下同)37℃培养 24 h 后,弃去原培养液。空白对照组加入新鲜细胞培养液,阴性对照组加入阴性对照品浸提液,阳性对照组加入阳性对照溶液或阳性对照品浸提液,试验样品组加入试验材料浸提液,每孔 100 μ L,置 CO₂ 培养箱继续培养 72 h。

注:如采用质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液为浸提介质时,需使用浓缩培养基将浸提液稀释至规定浓度。

72 h 后,置显微镜下观察细胞形态。每孔加入 20 μ L 质量浓度为 5 g/L 的 MTT 溶液,继续培养 4 h 后弃去孔内液体,加入 150 μ L DMSO,置振荡器上振荡 10 min,在酶标仪 570 nm 和 630 nm 波长下测定吸光度,按式(1)计算相对增殖率:

$$RGR = \frac{A}{A_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

RGR——相对增殖率,%;

A——试验样品组(阴性、阳性对照组)吸光度;

A₀——空白对照组吸光度。

根据 RGR 按表 2 分级判定。阴性对照组的反应应不大于 1 级,阳性对照组至少为 3 级反应。如阴性对照组和阳性对照组反应不成立时应重新试验。

表 2 细胞毒性反应分级

级别	相对增殖率/%
0	≥100
1	80~99
2	50~79
3	30~49
4	0~29

5.6.2.2 显微镜观察法

将配制好的 1×10^5 /mL 细胞悬液接种于直径 35 mm 培养皿内,每皿 2 mL。置 CO₂ 培养箱 37℃培养至近汇合单层细胞形成。

弃去原培养液。阴性对照组加入阴性对照品浸提液,阳性对照组加入阳性对照液或阳性对照品浸提液,试验样品组加入试验材料浸提液,每皿各加 2 mL。每组平行操作 3 皿,置 CO₂ 培养箱继续培养 72 h。

注:如采用质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液为浸提介质时,需使用浓缩培养基将浸提液稀释到规定浓度。

置显微镜下观察,按表 3 分级判定。阴性对照组应为 0 级反应,阳性对照组至少为 3 级反应。如阴性对照组和阳性对照组反应不成立时应重新试验。

表 3 细胞毒性反应分级

级别	反应程度	反应观察
0	无	细胞形态正常,贴壁生长良好,胞浆内有离散颗粒;无细胞溶解
1	极轻微	至多 20% 的细胞呈圆形,疏松贴壁,无胞浆内颗粒;偶见细胞溶解
2	轻度	至多 50% 的细胞呈圆形,无胞浆内颗粒;明显可见细胞溶解和细胞间空区
3	中度	至多 70% 的细胞呈圆形或溶解
4	重度	细胞层几乎完全破坏

5.6.3 直接接触试验

注:本试验不适宜于极低密度和高密度材料,可能会导致细胞物理性损伤。

试验和对照材料应处置成直径为 10 mm 的圆片或表面积约为 100 mm²,接触细胞面为平面。

将配制好的 1.5×10^5 /mL 细胞悬液接种于直径 35 mm 培养皿内,每皿 2 mL。置 CO₂ 培养箱 37℃ 培养至近汇合单层细胞形成。

弃去原培养液,每皿加入 2 mL 新鲜细胞培养基。将试验和阴性对照、阳性对照样品分别轻轻放入培养皿内,每皿放置一片样品,使其沉于皿底与细胞单层直接接触。每组平行操作 3 皿。置 CO₂ 培养箱继续培养 48 h。

置显微镜下观察,按表 4 分级判定。阴性对照组应为 0 级反应,阳性对照组至少为 3 级反应。如阴性对照组和阳性对照组反应不成立时应重新试验。

表 4 细胞毒性反应分级

级别	反应程度	反应观察
0	无	样品下面和周围区域细胞无异常迹象
1	极轻微	样品下面有些细胞出现形态异常或退化迹象
2	轻度	细胞反应区域局限在样品下方范围或超出样品边缘小于 5 mm
3	中度	细胞反应区域超出样品下方范围 5 mm~10 mm
4	重度	细胞反应区域超出样品下方范围 10 mm 以上

5.7 结果评价

在阴性对照和阳性对照产生预期反应的情况下,分析评价试验样品细胞毒性反应程度。

5.8 试验报告

试验报告中应给出下列信息:

- 试验材料名称;
- 批号;
- 试验和对照样品制备;
- 试验用培养基、细胞株制备;
- 试验步骤;
- 细胞反应和其他情况;
- 观察结果;
- 结果评价。

6 迟发型超敏反应试验

6.1 方法提要

本试验包括最大剂量迟发型超敏反应试验和封闭贴敷迟发型超敏反应试验,用以评价试验材料在试验条件下引发迟发型超敏反应的潜在性。

6.2 总则

最大剂量迟发型超敏反应试验为首选方法。试验样品如不适宜皮内注射或预期用于制造与皮肤接触器械的试验材料可选择封闭贴敷迟发型超敏反应试验。

6.3 试剂

质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜精制植物油、二硝基氯苯(dinitrochlorobenzene, DNCB)、十二烷基硫酸钠、弗氏完全佐剂。

注:本标准各试验中所用新鲜精制植物油推荐采用符合美国药典规定的棉籽油或芝麻油,也可使用其他经验证实无生物学毒性反应的植物油。

6.4 主要设备和器具

压力蒸汽灭菌器、电剃刀、天平、动物天平、注射器、研钵。

6.5 试验前准备

6.5.1 器具灭菌

与试验和对照样品接触的所有器具置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min。

6.5.2 试验动物准备

按 GB/T 16886.10 的规定。

6.5.3 弗氏完全佐剂制备

6.5.3.1 无水羊毛脂与液体石蜡的体积比为 4 : 6(冬季使用比例为 3 : 5)。将无水羊毛脂加热溶解后取 40 mL 置研钵中,稍冷却后边研磨边加液体石蜡,直至 60 mL 液体石蜡加完。置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min,即制备成弗氏不完全佐剂,4℃ 保存备用。

6.5.3.2 在弗氏不完全佐剂中按 4 mg/mL~5 mg/mL 加入死的或减毒的分枝杆菌(如卡介苗或结核杆菌),即得弗氏完全佐剂。

6.6 最大剂量迟发型超敏反应试验

6.6.1 浸提介质

质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜精制植物油。

6.6.2 阳性对照样品

质量浓度为 1 g/L 的二硝基氯苯溶液或其他能产生相应阳性反应的液体。

6.6.3 试验样品制备

按 GB/T 16886.10 规定选择适宜的浸提条件,每种试验材料制备质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液和植物油浸提液。

6.6.4 试验步骤和结果评价

按 GB/T 16886.10—2005 的 7.4 进行操作和评价。

6.7 封闭贴敷迟发型超敏反应试验

6.7.1 浸提介质

质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜精制植物油。

6.7.2 阳性对照样品

质量浓度为 1 g/L 的二硝基氯苯溶液或其他能产生相应阳性反应的液体。

6.7.3 试验样品制备

按 GB/T 16886.10 规定制备试验样品。试验材料如不能直接贴敷,应按 GB/T 16886.10 规定选

择适宜的浸提条件,每种试验材料制备质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液和植物油浸提液。

6.7.4 试验步骤和结果评价

按 GB/T 16886.10—2005 的 7.5 进行操作和评价。

6.8 试验报告

试验报告中应给出下列信息:

- a) 试验材料名称;
- b) 批号;
- c) 试验和对照样品制备;
- d) 试验步骤;
- e) 试验部位观察记录;
- f) 结果评价。

7 刺激试验

7.1 方法提要

本试验包括皮肤刺激试验、眼刺激试验和皮内反应试验。皮肤刺激试验适用于评价预期与皮肤接触的材料。眼刺激试验适用于评价预期与眼接触的材料。皮内反应试验系将材料浸提液注入家兔皮内,适用于评价试验材料在试验条件下对接触组织的潜在刺激性。

7.2 试剂

质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜精制植物油、质量浓度为 50 g/L 的甲醛溶液。

7.3 主要设备和器具

压力蒸汽灭菌器、检眼镜、天平、动物天平、动物固定器、注射器。

7.4 试验前准备

7.4.1 器具灭菌

与试验和对照样品接触的所有器具置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min。

7.4.2 试验动物准备

按 GB/T 16886.10 的规定。

7.5 皮肤刺激试验

7.5.1 试验样品制备

按 GB/T 16886.10 规定制备试验样品。试验材料如不能直接贴敷,应按 GB/T 16886.10 规定选择适宜的浸提条件,每种试验材料制备质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液和植物油两种浸提液。

7.5.2 试验步骤

按 GB/T 16886.10—2005 的 6.3 进行操作,每次与皮肤接触期为 24 h。阴性对照采用同批浸提介质,阳性对照采用质量浓度为 50 g/L 的甲醛溶液或其他能产生相应阳性反应的材料。

7.5.3 结果评价

按 GB/T 16886.10—2005 的 6.3 进行评价。

7.6 眼刺激试验

7.6.1 试验样品制备

按 GB/T 16886.10 规定制备试验样品。试验材料如不适宜直接与眼接触,应按 GB/T 16886.10 的规定选择适宜的浸提条件,每种试验材料制备质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液和植物油两种浸提液。

7.6.2 试验步骤和结果评价

按 GB/T 16886.10—2005 的第 B.3 章进行操作和评价。

7.7 皮内反应试验

7.7.1 试验样品制备

按 GB/T 16886.10 规定选择适宜的浸提条件,每种试验材料制备质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液和植物油两种浸提液。

7.7.2 试验步骤和结果评价

按 GB/T 16886.10—2005 的 B.2 进行操作和评价。

7.8 试验报告

试验报告中应给出下列信息:

- a) 试验材料名称;
- b) 批号;
- c) 试验和对照样品制备;
- d) 试验步骤;
- e) 试验部位观察记分;
- f) 结果评价。

8 急性全身毒性试验

8.1 方法提要

本试验系将试验样品注入小白鼠静脉和腹腔内,在规定时间内观察小白鼠有无毒性反应和死亡情况,以评价试验材料是否具有潜在的急性全身毒性作用。

8.2 试剂

质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜精制植物油。

8.3 主要设备和器具

压力蒸汽灭菌器、动物天平、小白鼠固定器、注射器。

8.4 试验前准备

8.4.1 器具灭菌

与试验和对照样品接触的所有器具置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min。

8.4.2 试验动物准备

8.4.2.1 试验采用健康、初成年小白鼠,同一品系并同一起来源,雌鼠无孕,体重 17 g~23 g。试验前使小白鼠适应实验室环境。做过本试验的小白鼠不得重复使用。

8.4.2.2 每种浸提液用小白鼠 10 只,随机分为试验样品和对照样品两组,每组 5 只。复试时每组取 18 g~19 g 的小白鼠 10 只。

8.5 试验和对照样品制备

按 GB/T 16886.12 规定选择适宜的浸提条件,每种试验材料制备质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液和植物油两种浸提液。同批号浸提介质作为对照样品。

8.6 试验步骤

8.6.1 样品注射

8.6.1.1 自尾静脉分别注入氯化钠注射液浸提液和介质对照液,以不超过 0.1 mL/s 的恒定速度注射,注射剂量为 50 mL/kg。

8.6.1.2 由腹腔分别注入植物油浸提液和介质对照液,注射剂量为 50 mL/kg。

8.6.2 注射后观察

注射完毕后,观察小白鼠即时反应,并于 4 h、24 h、48 h 和 72 h 观察和记录试验组和对照组动物的一般状态、毒性表现和死亡动物数,在 72 h 时称量动物体重。动物反应观察判定按表 5 规定。

表 5 毒性反应观察

反应程度	症 状
正常,无症状	注射后无毒性症状
轻微	注射后有轻微症状但无运动减少、呼吸困难或腹部刺激症
中度	注射后出现明显的腹部刺激症状、抽搐、俯卧、呼吸困难、运动减少、眼睑下垂或腹泻
重度	注射后出现虚脱、发绀、震颤或严重腹部刺激症状、腹泻、眼睑下垂或呼吸困难(体重急剧下降,一般低于 15 g)
死亡	注射后死亡

8.7 结果评价

8.7.1 在 72 h 观察期内,试验组动物的反应不大于对照组动物,则判定试验样品无急性全身毒性反应。

8.7.2 如试验组动物有 2 只或 2 只以上出现中度毒性症状或死亡,3 只或 3 只以上出现体重下降超过 10%,则判定试验样品有急性全身毒性反应。

8.7.3 如试验组动物出现轻微毒性症状,或不超过 1 只动物出现中度毒性症状或死亡,或虽无毒性症状但组内动物体重普遍下降,则另取小白鼠 10 只为 1 组进行复试,复试结果符合 8.7.1 要求,判定试验样品无急性全身毒性反应。

8.8 试验报告

试验报告中应给出下列信息:

- a) 试验材料名称;
- b) 批号;
- c) 试验和对照样品制备;
- d) 注射剂量;
- e) 动物反应情况;
- f) 结果评价。

9 亚急性(亚慢性)和慢性全身毒性试验

9.1 方法提要

本试验通过将试验样品植入动物体内或注入动物静脉、腹腔、皮下、皮内或肌内,在规定试验周期内,测定试验样品一次或多次接触对试验动物的影响,以评价试验材料是否具有潜在的亚急性(亚慢性)或慢性全身毒性作用。

注:也可采用其他符合 GB/T 16886.11 要求的亚急性(亚慢性)和慢性全身毒性试验。本试验可设计成与植入试验结合进行。

9.2 试剂

质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜精制植物油。

9.3 主要设备和器具

压力蒸汽灭菌器、动物天平、注射器。

9.4 试验途径选择

试验接触途径应尽可能与试验材料的临床应用相关,可选择下列适宜途径进行试验:

- a) 植入途径适用于植入材料;
- b) 静脉途径适用于直接或间接液路或与血液接触的材料;
- c) 腹腔途径适用于液路或与腹腔接触材料以及不宜静脉途径接触的试验样品;

- d) 皮下途径适用于皮下接触方式有利于评价材料毒性作用时；
- e) 皮内途径适用于皮内接触方式有利于评价材料毒性作用时；
- f) 肌肉途径适用于肌肉接触方式有利于评价材料毒性作用时。

9.5 试验组设定

9.5.1 每一种试验样品应设立试验样品组和对照组。对照组动物除了不接触试验样品,其他处置方式应与试验组动物完全一致。

9.5.2 除植入途径外,其他接触途径的试验样品组一般宜设高、中、低 3 个剂量水平组,也可采用适宜的单剂量组试验(即限度试验)。选择剂量水平时应考虑临床接触剂量与安全应用因素,如采用加严剂量组时应考虑下列参数:

- 临床接触表面积的倍数；
- 接触周期的倍数；
- 浸提分数或具体化学物的倍数；
- 24 h 接触期的倍数。

注:与经典的化学物全身毒性试验不同,医用材料一般不会产生剂量反应作用,因此高剂量水平不一定必须产生毒性作用。然而,试验所采用的剂量范围宜提供有效的人体安全性极限评估。

9.6 试验前准备

9.6.1 器具灭菌

与试验和对照样品接触的所有器具置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min。

9.6.2 试验动物选择

9.6.2.1 应按 GB/T 16886.11 的要求选择试验动物。植入途径首选家兔,静脉、腹腔、皮下、皮内、或肌肉途径接触首选小白鼠或大白鼠。试验应采用健康、初成年动物,同一品系并同一来源,雌性动物未产并无孕。家兔体重在 2.0 kg~3.0 kg 范围内;啮齿动物最好在离乳后 6 周龄内,不大于 8 周龄;犬最好 4 月~6 月龄,不大于 9 月龄;试验开始时,所用动物体重差异应不超过平均体重的±20%。每一试验剂量组需要的动物数量根据试验目的来确定,推荐的动物种属和每剂量组最少动物数量见表 6。

表 6 动物种属和数量

试验类型	啮齿动物(如小白鼠、大白鼠)	非啮齿类动物(如家兔、犬)
亚急性毒性	10 只(雌、雄各 5 只) ^a	6 只(雌、雄各 3 只) ^a
亚慢性毒性	20 只(雌、雄各 10 只) ^a	8 只(雌、雄各 4 只) ^a
慢性毒性	40 只(雌、雄各 20 只) ^{b,c}	—
^a 亦可采用单一性别动物,如预期试验材料仅用于女性时,试验应采用雌性动物。 ^b 采用加严剂量组时动物数量可减少至雌、雄各 10 只。 ^c 慢性毒性试验动物的数量应能保证可以对试验结果进行适当的统计学评价。		

9.6.2.2 应在试验前使试验动物适应实验室环境。

9.7 试验和对照样品制备

9.7.1 采用植入方式时按 GB/T 16886.6 的规定制备适宜的试验和对照样品。

9.7.2 采用静脉注射途径时选择适宜的浸提条件,可用质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液制备试验样品。同条件制备浸提介质对照液。

9.7.3 采用腹腔、皮下、皮内注射途径时选择适宜的浸提条件,根据试验评价目的可用质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液和(或)植物油制备试验样品。同条件制备浸提介质对照液。

9.7.4 采用肌肉注射途径时选择适宜的浸提条件,可用质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液制备试验样品。同条件制备浸提介质对照液。

9.8 试验步骤

9.8.1 试验接触

9.8.1.1 体内植入时按 GB/T 16886.6 和本标准第 12 章的规定进行。对照组可植入阴性对照样品，或不植入对照样品仅进行与试验样品相同的手术步骤。

9.8.1.2 静脉、腹腔、皮下、皮内或肌内注射途径接触时，试验样品组和介质对照组分别自动物的静脉、腹腔、皮下、皮内或肌内注入试验样品和介质对照液。单次静脉快速注射时一般在 1 min 内注射完毕，亦可根据试验样品具体情况采用慢速注射，大白鼠静脉注射速度通常不超过 2 mL/min。各动物种属最大注射剂量体积见表 7。

表 7 最大注射剂量体积

动物种属	静脉注射体积/(mL/kg)	腹腔注射体积/(mL/kg)	皮下注射体积/(mL/kg)	肌内注射体积/(mL/kg)
小白鼠	50	50	50	2
大白鼠	40	20	20	1
兔	10	20	10	1
犬	10	20	2	1

注：啮齿动物肌内注射时推荐小白鼠每一注射点不超过 0.1 mL，大白鼠每一注射点不超过 0.2 mL。

9.8.2 接触周期

9.8.2.1 除植入途径外，其他接触途径一般每周 7 d 进行试验操作，较长期接触试验也可根据试验样品具体情况每周操作 5 d。

9.8.2.2 亚急性全身毒性试验接触周期为 14 d~28 d，静脉接触时大于 24 h，但小于 14 d。亚慢性全身毒性试验接触周期啮齿动物通常为 90 d，其他种属动物不超过其寿命期的 10%，静脉接触时为 14 d~28 d。慢性全身毒性试验接触周期一般为 6 个月~12 个月。

9.8.3 接触后观察

9.8.3.1 体重和饲料、水消耗

试验接触前及试验终结时应测量体重，试验期间至少每周测量一次动物体重。

必要时长期接触试验应考虑测定饲料和水的消耗量。

9.8.3.2 临床观察

每日观察和记录试验样品组和对照组动物的一般状态，如皮肤、被毛、眼和黏膜改变，以及呼吸、循环、自主和中枢神经系统、躯体运动神经活动性和行为表现等状况。必要时，在接触试验样品之前和试验期间对高剂量组和对照组动物进行眼科检查，如发现有眼部改变迹象时应检查全部试验动物。

记录死亡的动物数并及时进行尸检，垂死动物及时隔离并处死。

9.8.3.3 临床病理学检查

应根据试验样品预期毒性作用，在试验接触周期内和(或)接触终结时，选择进行下列适宜的检查项目：

- 血液学方面，包括：凝血(PT、APTT)、血红蛋白浓度、血细胞比容、血小板计数、红细胞计数、白细胞计数和白细胞分类计数等；
- 临床血液生化方面，包括电解质平衡、碳水化合物代谢和肝、肾功能。某些试验样品由于其特定的作用模式，可能还需测定白蛋白、ALP、ALT、AST、钙、氯化物、胆固醇、肌酸酐、GGT、葡萄糖、无机磷、钾、钠、总胆红素、总蛋白、甘油三酯、尿氮、各种酶类等。需评价免疫毒性时可考虑测定总免疫球蛋白水平。

注：可根据试验接触周期确定适宜的检查次数，如试验周期为 26 周时在试验进行到 13 周时安排检查一次。

尿液检验不作为常规检验，仅在预期或观察到有这方面的毒性反应的情况下才考虑进行。检验时在试验接触的最后一周在一定时间间隔内(如 16 h~24 h)采集尿液，推荐检验的项目包括外观、胆红

素、尿糖、酮体、隐血、蛋白、沉渣、比重或渗量、尿量等。

9.8.3.4 大体病理学检查

试验结束时,将全部试验动物无痛处死后进行大体尸检,包括体表及体表开孔、头部、胸(腹)腔及内脏等。

将试验动物的肾上腺、脑、附睾、心脏、肾、肝、卵巢、脾、睾丸、胸腺和子宫在取出后尽快称量其湿重。根据试验材料预期作用途径选择需进一步进行组织病理学检查的器官或组织,取下后置于适宜的固定液中。

9.8.3.5 组织病理学检查

应对高剂量组和对照组动物的器官和组织进行完整的组织病理学检查。

应对全部显示有大体损害迹象或尺寸改变的器官和组织进行检查。

如设有中、低剂量组,应对动物肺脏进行组织病理学检查是否有感染迹象,还应考虑对中、低剂量组进行肝、肾组织病理学检查,高剂量组如显示损害迹象应进行器官组织病理学检查。

9.9 结果评价

9.9.1 列表给出各种试验数据,并采用适宜的统计学方法对数据进行分析评价。

9.9.2 分析评价试验接触剂量与毒性反应产生的相关性、异常反应的发生率和严重程度,包括行为和临床性异常、大体损害、显微镜下改变、靶器官的鉴别、死亡率、以及任何其他有意义的一般性和特异性反应。

9.10 试验报告

试验报告中应给出下列信息:

- a) 试验材料名称;
- b) 批号;
- c) 试验动物;
- d) 试验和对照样品制备;
- e) 试验步骤;
- f) 观察记录;
- g) 结果评价。

10 热原试验

10.1 方法提要

本试验系将试验样品注入家兔静脉,在规定的时间内观察家兔体温升高的情况,以评价试验材料是否具有潜在的致热作用。

10.2 试剂

质量浓度为9 g/L的无菌无热原氯化钠注射液。

10.3 主要设备

超净工作台、电热干燥箱、电热恒温水浴箱、压力蒸汽灭菌器、热原测试仪、动物天平、注射器、家兔固定器。

10.4 试验前准备

10.4.1 器具除热原

与供试液接触的所有玻璃器皿置电热干燥箱内180℃干烤至少2 h,或250℃干烤至少30 min。也可采用其他适宜的方法除热原。

10.4.2 测温器具

家兔体温测试应使用精密度为±0.1℃的热原测温仪或肛门体温计。

10.4.3 实验室环境

10.4.3.1 在试验前 1 d~2 d,供试用家兔应处于同一温度环境中,实验室和饲养室的温度相差不得大于 5℃,实验室温度应为 17℃~28℃。

10.4.3.2 在试验全过程中,室温变化应不大于 3℃,避免噪音干扰。

10.4.4 试验用家兔

按中华人民共和国药典二部附录 XI D 的规定挑选试验用兔。

10.5 试验样品制备

按第 4 章中的规定选择适宜的浸提条件,采用质量浓度为 9 g/L 的无菌无热原氯化钠注射液制备试验样品。

10.6 试验步骤

按中华人民共和国药典(二部)附录 XI D 的规定进行,家兔注射剂量为 10 mL/kg。

10.7 结果评价

试验样品经初试或复试后符合中华人民共和国药典(二部)附录 XI D 的规定时,判定试验材料无致热作用。

10.8 试验报告

试验报告中应给出下列信息:

- a) 试验材料名称;
- b) 批号;
- c) 试验样品制备;
- d) 注射剂量;
- e) 家兔体温记录;
- f) 结果评价。

11 遗传毒性试验

注:也可采用其他经确认符合 GB/T 16886.3 要求的遗传毒性试验。

11.1 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)

11.1.1 方法提要

本试验是在有或无代谢活化系统的情况下,通过试验样品诱导组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌的突变情况,以评价试验材料潜在的致突变性。本标准推荐的是平板掺入法。

注:其他信息参见 OECD 导则 471。

11.1.2 主要设备

超净工作台、电热干燥箱、恒温培养箱、恒温水浴箱、恒温振荡水浴箱、压力蒸汽灭菌器、低温高速离心机、低温冰箱(−80℃)或液氮罐、匀浆器。

11.1.3 活化系统、培养基和试剂

试验用活化系统(S9 和 S9 混合液)、培养基和试剂按附录 B 的规定制备或购买市售产品。

11.1.4 菌株及其鉴定和保存

11.1.4.1 菌株

本试验用于测试试验样品诱变性时应至少采用四个菌株,本试验推荐五株鼠伤寒沙门氏菌突变菌株:TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538。适当时也可采用其他菌株,如 TA97、TA102 等。

11.1.4.2 菌株特性

菌株特性应与表 8 相符。突变型菌的某些特性易丢失或变异,在下列情况下应鉴定菌株的基因型:

- a) 在收到培养菌株后;
- b) 当制备一套新的冷冻保存或冰冻干燥菌株时;

- c) 当每皿自发回变数不在正常范围时;
- d) 当对诱变剂丧失敏感性时;
- e) 使用主平板传代时;
- f) 投入使用前。

表 8 菌株鉴定结果

菌株	基 因 型				自发回变菌落数 ^e
	组氨酸 缺 陷 ^a	脂多糖 屏障缺失 ^b	R 因子 (抗氨基青霉素) ^c	uvrB 修复缺陷 ^d	
TA98	+	+	+	+	30~50
TA100	+	+	+	+	120~200
TA1535	+	+	—	+	10~35
TA1537	+	+	—	+	3~28
TA1538	+	+	—	+	7~25
^a “+”表示需要组氨酸。 ^b “+”表示有抑制带。 ^c “+”表示具有 R 因子。 ^d “+”表示无修复能力。 ^e 该数值为参考值,可在验证的基础上确定本实验室的规定数值范围。					

11.1.4.3 菌株鉴定方法

11.1.4.3.1 增菌培养

在 5 mL 营养肉汤培养基中接种贮存菌培养物,于(37±2)℃、(115 r/min~125 r/min)振荡培养 10 h~12 h。

11.1.4.3.2 组氨酸缺陷型的鉴定

加热融化底层培养基两瓶(一瓶不加组氨酸,一瓶加组氨酸),不加组氨酸者每 100 mL 底层培养基中加 0.5 mmol D-生物素 0.6 mL;加组氨酸者每 100 mL 底层培养基中加 L-组氨酸(每 100 mL 中含 0.404 3 g)1 mL 和 0.5 mmol D-生物素 0.6 mL,冷却至 50℃左右,各倒两个平皿。

接种:取有组氨酸和无组氨酸培养基平皿各一个,按菌株号顺序各取一白金耳菌液划线(直线)接种在培养基表面,37℃培养 48 h。

结果判定:五株菌在有组氨酸培养基平皿表面各长出一条菌膜,无组氨酸培养基平皿上除自发回变菌落外无菌膜,说明受试菌株确为组氨酸缺陷型。

11.1.4.3.3 脂多糖屏障缺陷的鉴定

加热融化营养肉汤培养基。

接种:取菌液 0.1 mL 移入平皿,迅速将营养肉汤琼脂培养基(冷却至 50℃左右)适量倒入平皿,混匀,平放凝固。将一片无菌滤纸片放入已凝固的培养基平皿中央,用移液器在滤纸片上滴加 0.1%结晶紫溶液 10 μL,37℃培养 24 h,每个菌株做一个平皿。

结果判定:阳性者在纸片周围出现一个透明的抑制带,说明存在 rfa(深粗型)突变。TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538 均有抑制带,野生型鼠伤寒沙门氏菌没有抑制带。

11.1.4.3.4 R 因子的鉴定

加热融化营养肉汤琼脂培养基,冷却至 50℃左右,适量倒入平皿中,平放凝固,用移液器吸 0.8% 氨苄青霉素 10 μL,在凝固的培养基表面依中线涂成一条带,待氨苄青霉素溶液干后,用接种环与氨苄青霉素带相交叉划线接种要鉴定的菌株,并且接种一个不具有 R 因子的菌株作氨苄青霉素抗性的对照(一个平皿可同时鉴定几个菌株),37℃培养 24 h。

结果判定:菌株经过 24 h 培养,在氨苄青霉素带的周围依然生长不受抑制,即有抗氨苄青霉素效应,证明带有 R 因子。

11.1.4.3.5 *uvrB* 修复缺陷型的鉴定

在营养肉汤琼脂培养基平皿表面用接种环划线接种需要的菌株。接种后的平皿一半用黑纸覆盖,在距 15 W 紫外线灭菌灯 33 cm 处照射 8 s,37℃培养 24 h。

结果判定:对紫外线敏感的菌株仅在没有照射过的一半生长。

11.1.4.3.6 自发回变率的测定

准备底层培养基平皿 8 个。融化顶层培养基 8 管,每管 2 mL,在 45℃水浴中保温。

在每管顶层培养基中,分别加入待鉴定的试验菌株菌液 0.1 mL,一式两份,轻轻摇匀,迅速将此试管的内容物倾入已固化的底层培养基平皿中,转动平皿,使顶层培养基均匀分布,平放固化,37℃培养 48 h 计数菌落数。

结果判定:每一菌株的自发回变率应落在表 8 所列正常范围内。

11.1.4.4 菌株保存

鉴定合格的菌种应保存在深低温(如-80℃)或加入 9% 光谱级 DMSO 作为冷冻保护剂,保存在液氮条件下(-196℃),或者冰冻干燥制成干粉,4℃保存。除液氮条件外,保存期一般不超过 2 年。主平板贮存在 4℃,超过两月后丢弃。

11.1.5 试验前准备

11.1.5.1 器具灭菌

与试验和对照样品接触的所有器具应采用可靠方法灭菌,置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min,或置电热干燥箱内 160℃ 2 h。

11.1.5.2 无菌室要求

无菌室操作台或超净工作台局部应符合洁净度 100 级单向流空气区域要求。

11.1.6 试验样品制备

11.1.6.1 采用质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液为浸提介质制备试验样品时选择适宜的浸提条件,宜制备高、中、低三个剂量组或适宜的单剂量组。

注:9.5.2 给出了剂量水平选择信息。

11.1.6.2 采用 DMSO 制备试验样品时,浸提比例应加倍,在(37±1)℃条件下浸提(24±2)h。

注:由于 DMSO 对细菌有毒性作用,试验时加液体积减半。

11.1.7 对照样品制备

11.1.7.1 阴性对照

同批号试验材料浸提介质,不加试验材料同条件制备。

11.1.7.2 阳性对照

每一试验菌株推荐的诱变剂和浓度见表 9 所列,适当时也可采用其他已知诱变剂。

表 9 诱变剂

试验菌株	阳性对照	诱变剂浓度
TA98	Dexon(p-dimethylaminobenzenediazosulfonic Acid Sodium Salt)	1.0 mg/mL,用无菌注射用水配制
TA100	Dexon(p-dimethylaminobenzenediazosulfonic Acid Sodium Salt)	1.0 mg/mL,用无菌注射用水配制
	2-氨基苄	0.1 mg/mL,用 DMSO 配制
TA1535	叠氮化钠	1.0 mg/mL,用无菌注射用水配制
TA1537	Dexon(p-dimethylaminobenzenediazosulfonic Acid Sodium Salt)	1.0mg/mL,用无菌注射用水配制
TA1538	2-氨基苄	0.1 mg/mL,用 DMSO 配制
	2-硝基苄	1.0 mg/mL,用 DMSO 配制

注：诱变剂可配制为 10 倍贮备液，分装在具塞玻璃试管内 2℃～8℃贮存，临时时稀释至上述浓度。

11.1.8 试验菌液制备

取营养肉汤培养基 5 mL，加入无菌小三角瓶或无菌试管中，将主平板或冷冻保存的菌株培养物接种于营养肉汤培养基内，在 37℃±2℃、(115 r/min～125 r/min)振荡培养 10 h～12 h 至对数增长期，活菌数不少于 1×10^9 /mL。培养瓶用黑纸包裹，以防光线照射细菌。

11.1.9 预试验试验步骤

11.1.9.1 对未知或怀疑可能对试验菌株有抑制作用的试验样品，应进行预试验。

11.1.9.2 预试验步骤如下：

- 融化顶层培养基分装于无菌小试管，每管 2 mL，在 45℃水浴中保温。在每管顶层培养基中，分别加入按 11.1.8 制备的试验菌株新鲜菌液 0.1 mL，一式两份，轻轻摇匀，迅速将此试管的内容物倾入已固化的底层培养基平皿中，转动平皿，使顶层培养基均匀分布，平放固化。取无菌滤纸圆片(直径为 6 mm)放在已固化的顶层培养基的中央位置上；
- 用移液器分别取 0.1 mL 试验材料氯化钠浸提液和(或)0.05 mL DMSO 试验材料浸提液点在纸片上；
- 同 a) 法操作，阴性对照组加入 0.1 mL 氯化钠注射液和(或)0.05 mL DMSO；阳性对照加入 10.0 mg/mL Dexon 0.1 mL；
- 37℃培养 48 h～72 h 观察结果。

11.1.9.3 除阳性对照外，试验样品和浸提介质平皿应无抑制区域。如对试验菌株有抑制作用，可通过稀释调整至无毒性浓度。

11.1.10 主试验(平板掺入法)试验步骤

11.1.10.1 融化顶层培养基分装于无菌小试管，每管 2 mL，在 45℃水浴中保温。

11.1.10.2 在保温的顶层培养基中依次加入每种试验菌株新鲜菌液 0.1 mL，混匀；试验样品组分别加 0.1 mL 氯化钠浸提液和(或)0.05 mL DMSO 浸提液，每组三管，活化组再加 10% S9 混合液 0.5 mL，无活化组加 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 0.5 mL。再混匀，迅速倾入底层培养基上，转动平皿使顶层培养基均匀分布在底层上，平放固化。

11.1.10.3 阴性对照组分别加入 0.1 mL 氯化钠注射液和 0.05 mL DMSO，活化组再加 10% S9 混合液 0.5 mL，无活化组加 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 0.5 mL。阳性对照组分别加表 9 列出的诱变剂 0.1 mL，活化组再加 10% S9 混合液 0.5 mL，无活化组加 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 0.5 mL。阴性及阳性对照组分别设三个平行皿，其他步骤同 11.1.10.2。

11.1.10.4 全部平皿置 37℃培养 48 h～72 h 观察结果。

11.1.11 结果评价

11.1.11.1 计数并记录每一平皿的回变菌落数,计算出三个平行皿的平均值。

11.1.11.2 阴性对照组回变菌落数应在预期的范围内(见表8),阳性对照组回变菌落数应至少为预期范围(见表8)的3倍,否则对不在范围内的菌株应重新试验。

11.1.11.3 在背景生长良好条件下,试验样品组变异频率比阴性对照至少增加两倍(即回变菌落数 $\geq 2 \times$ 阴性对照数)即为阳性反应。如回变菌落数的增加与剂量相关并具有统计学意义,或者至少在一个剂量水平出现可重复的并有统计学意义的阳性反应时,即可认为试验材料为 Ames 试验阳性物质。

11.1.12 试验报告

试验报告中应给出下列信息:

- a) 试验材料名称;
- b) 批号;
- c) 试验和对照样品制备;
- d) 试验用菌株;
- e) 试验步骤;
- f) 每皿计数和每组回变平均菌落数;
- g) 结果评价。

11.2 小鼠淋巴瘤细胞突变试验

11.2.1 方法提要

本试验是在有或无代谢活化系统的情况下,通过试验样品诱导小鼠淋巴瘤细胞(L5178Y tk⁺/3.7.2C)基因正向突变情况,以评价试验材料潜在的致突变性。本标准推荐的是微孔板法。

注:其他信息参见 OECD 导则 476。

11.2.2 主要设备

超净工作台、CO₂ 培养箱、恒温水浴箱、恒温振荡水浴箱、电冰箱、倒置显微镜、光学显微镜、压力蒸汽灭菌器、抽滤瓶、磁力搅拌器。

11.2.3 活化系统、培养基和试剂

11.2.3.1 试验用活化系统(S9 混合液)参照附录 B 的规定制备或购买市售产品。

11.2.3.2 RPMI 1640 培养基按附录 B 的规定制备。

11.2.3.3 THMG、THG 溶液按附录 B 的规定制备。

11.2.4 细胞株

11.2.4.1 细胞株

推荐使用小鼠淋巴瘤细胞株(L5178Y tk⁺/3.7.2C)。经过传代培养后,细胞呈对数生长状态,但细胞持续培养最多不超过3个月。鉴于细胞性状稳定性要求,试验细胞株最好新取自冻存细胞。细胞在35℃~38℃振荡培养,增殖周期为10h左右。

11.2.4.2 细胞自发突变清除

应适时检查冻存细胞的自发突变率。当细胞突变率偏高时,按下列步骤对自发突变细胞进行清除:

- a) 将对数生长的细胞配制成 2×10^5 个/mL,加入100倍的THMG液,加入量为总体积的1%。置CO₂培养箱(含体积分数5%二氧化碳气体,下同)培养24h;
- b) 培养24h后以200g离心5min,除去上清液,加入新鲜RPMI 1640培养基,细胞密度调整为 2×10^5 个/mL。加入100倍的THG液,加入量为总体积的1%。培养45h~48h,注意避免过度培养;
- c) 将培养后的细胞以200g离心5min,除去上清液后加入冻存液,细胞密度调整为 2×10^5 个/mL~ 5×10^6 个/mL。分装于冻存管中冻存。

11.2.4.3 支原体污染检测

在制备冻存细胞液之前以及准备丢弃过期的细胞之前进行支原体的检测,以保证在细胞培养周期中无支原体的污染。支原体污染的检测可以采用直接培养法或间接 Hoechst 染色法。

11.2.4.4 核型稳定性检测

通过检测平均染色体数目来判断核型稳定性,通常在细胞生长周期过程中和准备丢弃过期的细胞之前进行,以保证在细胞培养周期中没有发生核型的变化。核型分析,包括染色体分带在制备冻存细胞液前进行。

11.2.5 试验前准备

11.2.5.1 器具灭菌

与试验和对照样品接触的所有器具应采用可靠方法灭菌,置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min,或置电热干燥箱内 160℃ 2 h。

11.2.5.2 无菌室要求

无菌室操作台或超净工作台局部应符合洁净度 100 级单向流空气区域要求。

11.2.6 试验样品制备

可采用无血清 RPMI 1640 培养基或质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液等其他适宜溶剂作为浸提介质,选择适宜的浸提条件,宜制备高、中、低三个剂量组。也可根据细胞毒性预试验的相对存活率进行剂量设计,一般在相对存活率为阴性对照组的 20%~80% 范围内设三个剂量组。

注: 9.5.2 给出了剂量水平选择信息。

11.2.7 对照样品制备

11.2.7.1 阴性对照

同批号浸提介质。

11.2.7.2 阳性对照

无活化系统采用甲磺酸甲酯(methyl methanesulphonate, MMS),新鲜配制,浓度为 10 μg/mL;有活化系统采用 7,12-二甲基苯蒽[7,12-dimethylbenz(a)anthracene, DMBA],浓度为 2.5 μg/mL。也可采用其他适宜的阳性对照品。

11.2.8 试验步骤

11.2.8.1 接触处理

取生长良好的细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /mL。无活化系统组取 10 mL 细胞悬液与 9 mL 试验或对照样品以及 150 mmol/L 氯化钾溶液 1 mL 混合;有活化系统组取 10 mL 细胞悬液,加入 9 mL 试验或对照样品以及 S9 混合液 1 mL。将上述各种混合液置于 50 mL 带盖离心管中 37℃ 振荡培养 4 h,振荡频率为 70 r/min~80 r/min。

11.2.8.2 表达

将上述各种混合液以 200 g 离心 5 min,去除上清液,用无血清 RPMI 1640 培养基洗涤细胞两次。重新悬浮于 RPMI 1640 培养基中,调整细胞密度为 3×10^5 个/mL,37℃ 培养 2 d。于 24 h 时检查细胞密度并调整为 3×10^5 个/mL。

11.2.8.3 平板制备

按下列方法制备各组微孔平板:

- PE₀(0 天的平板接种效率)平板:取 11.2.8.1 接触处理后的细胞悬液,梯度稀释至细胞数量为 8 个/mL,接种 96 孔板,每孔加 0.2 mL(即每孔平均细胞接种数为 1.6 个)。每种剂量接种两块平板。
- PE₂(第 2 d 的平板接种效率)平板:第 2 d 表达培养结束后,取适量细胞悬液,按 a)所述方法接种 96 孔板,每种剂量接种两块平板。
- TFT 拮抗平板:第 2 d 表达培养结束后,取适量细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^4 个/mL,加

入 TFT(三氟胸苷,终浓度为 $3 \mu\text{g/mL}$),混匀,接种 96 孔板,每孔加 0.2 mL (即每孔平均细胞接种数为 2 000 个)。每种剂量接种两块平板。

将全部平板放置于 CO_2 培养箱 37°C 培养 12 d。

11.2.8.4 集落计数

目视观察计数各平板无集落生长的孔数。突变集落按大集落(LC:直径 $\geq 1/4$ 孔径,密度低)和小集落(SC:直径 $< 1/4$ 孔径,密度高)分别计数,极小集落可再继续培养 3 d 后计数。

11.2.9 数据处理

11.2.9.1 平板效率(PE_0 和 PE_2)

$$PE = \frac{-\ln(EW/TW)}{1.6} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

PE ——平板效率, PE_0 或 PE_2 ;

EW ——无集落生长的孔数;

TW ——平板总孔数;

1.6——每孔接种细胞数。

11.2.9.2 相对存活率

$$RS = \frac{PE_{0a}}{PE_{0b}} \times 100\% \dots\dots\dots(3)$$

式中:

RS ——相对存活率,%;

PE_{0a} ——试验样品组 PE_0 平板效率;

PE_{0b} ——对照组 PE_0 平板效率。

11.2.9.3 TFT 抗性突变频率(MF)

按式(4)分别计算大集落突变频率(L-MF)、小集落突变频率(S-MF)和总突变频率(T-MF)。

$$MF \times 10^{-6} = \frac{-\ln(EW/TW)/n}{PE_2} \dots\dots\dots(4)$$

式中:

MF ——TFT 抗性突变频率;

EW ——无集落生长的孔数;

TW ——平板总孔数;

n ——每孔接种细胞数,2 000;

PE_2 —— PE_2 平板效率。

11.2.9.4 小集落突变百分率(SCM)

$$SCM(\%) = (S - MF)/(T - MF) \dots\dots\dots(5)$$

11.2.10 结果评价

试验成立条件:阴性对照的 PE_0 在 $60\% \sim 140\%$ 范围内, PE_2 在 $70\% \sim 130\%$ 之间,T-MF 小于本实验室历史记录的 2 倍(或 $< 240 \times 10^{-6}$)小集落突变百分率在 $30\% \sim 60\%$ 范围内,阳性对照 T-MF 与阴性对照有显著差异,或比阴性对照高 100×10^{-6} 以上。否则应重新进行试验。

在试验成立的前提下,试验样品各剂量组 T-MF 出现有统计学意义的剂量反应性增长,或至少有一个剂量组 T-MF 与阴性对照有显著差异,或比阴性对照高 100×10^{-6} 以上并具重现性,为阳性结果。

11.2.11 试验报告

试验报告中应给出下列信息:

a) 试验材料名称;

b) 批号;

- c) 试验和对照样品制备;
- d) 细胞株名称;
- e) 试验步骤;
- f) 数据处理;
- g) 结果评价。

11.3 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

11.3.1 方法提要

本试验是在有或无代谢活化系统的情况下,将培养细胞与试验样品接触后再用中期分裂相阻断剂(如秋水仙素和秋水仙胺)处理,以抑制处于有丝分裂中期阶段的细胞。然后采集细胞并分析中期细胞染色体畸变情况,以评价试验材料潜在的致突变性。

注:其他信息参见 OECD 导则 473。

11.3.2 主要设备

超净工作台、CO₂ 培养箱、恒温水浴箱、电冰箱、倒置显微镜、光学显微镜、压力蒸汽灭菌器、抽滤瓶。

11.3.3 活化系统、培养基和试剂

11.3.3.1 试验用活化系统(S9 混合液)按照附录 B 的规定制备或购买市售产品。

11.3.3.2 RPMI 1640 培养基按附录 A 的规定制备。

11.3.3.3 Hanks 液、胰蛋白酶液按附录 A 的规定制备。

11.3.4 细胞株

可选用中国仓鼠肺细胞(CHL)或中国仓鼠卵巢细胞(CHO),推荐首选 CHL。需按照 11.2.4.3 和 11.2.4.4 的方法定期检查试验所用细胞核型和有无支原体污染。细胞应置于-80℃或液氮冻存。

11.3.5 试验前准备

11.3.5.1 器具灭菌

与供试液接触的所有器具应采用可靠方法灭菌,置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min,或置电热干燥箱内 160℃ 2 h。

11.3.5.2 无菌室要求

无菌室操作台或超净工作台局部应符合洁净度 100 级单向流空气区域要求。

11.3.6 试验样品制备

浸提介质可选用无血清 RPMI 1640 培养基或质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液等其他适宜的溶剂,选择适宜的浸提条件,宜制备高、中、低三个剂量组。或高剂量采用 50%细胞生长抑制剂量,中、低剂量采用倍数稀释剂量。

注 1: 9.5.2 给出了剂量水平选择信息。

注 2: 如采用 DMSO 为浸提介质,使用时浓度应不大于 0.5%。

11.3.7 对照样品制备

11.3.7.1 阴性对照

同批号浸提介质。

11.3.7.2 阳性对照

无活化系统可采用甲磺酸甲酯(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);有活化系统可采用苯并(a)芘[benzo(a)pyrene]、环磷酰胺(cyclophosphamide)。也可采用其他适宜的阳性对照品。采用 50%细胞生长抑制剂量为试验剂量。

11.3.7.3 空白对照

如不能证实所用浸提介质不具有致突变性,还应设空白对照。

11.3.8 试验步骤

11.3.8.1 预试验

对未知细胞毒性反应的试验样品和阳性对照材料应进行预试验,以确定 50% 细胞生长抑制剂量。试验步骤参照第 5 章中试验方法进行。

11.3.8.2 接触处理

试验在加入或不加入 S9 的条件下进行。按下列步骤操作:

- 试验前一天,将一定数量的细胞接种于培养皿(瓶)内,置于 CO₂ 培养箱内培养;
- 吸去培养皿(瓶)中的培养液,加入试验或对照样品、S9 混合液(不加 S9 混合液时,需用培养液补足)、以及不含血清的 RPMI 1640 培养液,置于培养箱中。有活化系统接触 8 h,无活化系统接触 24 h;
- 吸去培养皿(瓶)中的液体,用 Hanks 液洗细胞 3 次,加入含血清 RPMI 1640 培养液,置于培养箱中,于 24 h 收获细胞。于收获前 2 h~4 h 加入细胞分裂中期阻断剂(如秋水仙素,作用时间为 4 h,终浓度为 1 μ g/mL)。

11.3.8.3 收获细胞与制片

按下列步骤进行:

- 消化:用胰蛋白酶液消化细胞,待细胞脱落后加入含血清 RPMI 1640 培养液终止胰蛋白酶作用,混匀,放入离心管内以 1 000 r/min~1 200 r/min 离心 5 min~7 min,弃去上清液;
- 低渗:加入 0.075 mol/L 氯化钾溶液 7 mL,用滴管将细胞轻轻地吹打混匀,放入 37℃ 水浴中低渗处理 7 min,加入 2 mL 固定液(甲醇:冰醋酸,3:1)混匀。以 1 500 r/min 离心 5 min~7 min,弃去上清液;
- 固定:加入 7 mL 固定液,混匀后固定 7 min,以 1 500 r/min 离心 7 min,弃去上清液。同法再固定 1~2 次,弃去上清液;
- 滴片:加入数滴新鲜固定液,混匀。用混悬液滴片,自然干燥;
- 染色:用姬姆萨染液染色;
- 镜检:在光学显微镜下每一试验组至少选择 100 个分散良好的中期分裂相(染色体数为 $2n \pm 2$)进行染色体畸变分析。分析时应记录每一观察细胞的染色体数目,对于畸变细胞还应记录显微镜视野的坐标位置及畸变类型。

11.3.9 数据处理

将结果数据按每试验组列表显示。计算指标包括细胞畸变数、染色体结构异常百分率、各剂量组及对照组不同类型染色体异常数与频率等。分裂细胞数应分别统计,一般不包括在总异常频率中。对染色体畸变细胞率用 χ^2 检验进行统计学处理,以评价试验样品的致突变性。

11.3.10 结果评价

试验成立条件:阴性对照组染色体畸变率在正常范围内(小于 4.9%),阳性对照组染色体畸变率应大于 10.0%。否则应重新试验。

在试验成立的前提下,以下两种情况下可判定试验材料在本试验系统中在具有致突变性:

- 试验样品引起染色体结构畸变数的增加具有统计学意义,并有与剂量相关的增加。
- 试验样品在任何一个剂量条件下引起具有统计学意义并有可重复性的阳性反应。

11.3.11 试验报告

试验报告中应给出下列信息:

- a) 试验材料名称;
- b) 批号;
- c) 试验和对照样品制备;
- d) 细胞株名称;
- e) 试验步骤;
- f) 数据处理;
- g) 结果评价。

12 植入试验

12.1 方法提要

本试验系将试验样品植入动物皮下、肌肉或骨组织内,通过观察植入后试验样品周围组织反应程度,以评价试验材料的组织相容性。

注:本试验还可设计为同时对试验材料的亚急性(亚慢性)毒性作用进行评价。

12.2 试剂

戊巴比妥钠、硫喷妥钠、2%碘酊、75%乙醇溶液、质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液。

12.3 主要设备和用具

压力蒸汽灭菌器、电热干燥箱、切片机、显微镜、常规外科手术器械、穿刺针、骨钻。

12.4 试验前准备

12.4.1 器具灭菌

与试验和对照样品接触的所有器具置压力蒸汽灭菌器内 121℃ 30 min 或电热干燥箱内 160℃ 2 h。

12.4.2 试验动物准备

按 GB/T 16886.6 的规定选择适宜的试验动物。

12.5 试验途径选择

试验接触途径选择应按 GB/T 16886.6 的规定,可根据试验材料的临床应用和材料特性选择适宜的组织部位。

12.6 试验和对照样品制备

按 GB/T 16886.6 的规定制备相应尺寸的皮下、肌肉或骨植入样品。将植入样品清洗干净后沥干,采用适宜方法灭菌,植入前用质量浓度为 9 g/L 的无菌氯化钠注射液浸洗。

12.7 试验步骤

12.7.1 动物麻醉和消毒

动物麻醉可采用质量浓度 30 g/L 戊巴比妥钠或质量浓度 20 g/L 硫喷妥钠,亦可采用其他适宜麻醉剂。按外科常规手术要求以 2%碘酊和 75%乙醇溶液消毒试验区域。

注:推荐的动物麻醉方法:家兔用质量浓度 30 g/L 戊巴比妥钠静脉注射 1.0 mL/kg,或质量浓度 20 g/L 硫喷妥钠静脉注射 1.3 mL/kg~2.5 mL/kg;大白鼠、小鼠和家兔用质量浓度 20 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射 2.3 mL/kg;大白鼠用质量浓度 10 g/L 硫喷妥钠静脉或腹腔注射 5.0 mL/kg~10.0 mL/kg。

12.7.2 皮下组织植入试验

根据试验所用动物选择下列之一方法:

- a) 背部植入:按 GB/T 16886.6 中规定方法进行。可用手术刀片切开植入点皮肤,用止血钳分离皮下组织,在一个皮肤切口制备一个或数个皮下囊,囊的底部距离皮肤切口应约为 10 mm 以上,每个囊内放置一个植入物,植入物之间应不能互相接触。用医用缝合线缝合皮肤切口。亦可用穿刺针与皮肤成 30°角刺入皮下,取一探条插入针头内将试样推入皮下组织内。

注:套针植入法对试验部位组织的创伤轻微,可降低由于手术创伤造成的对试验结果的干扰。

- b) 颈部植入：采用小白鼠时，在骶骨上方用手术刀片切一 10 mm 长的切口，用止血钳向颈部开一隧道，通过隧道向颈部推入植入物并使之固定。采用大白鼠时，在颈部两侧分别植入一个对照植入物和试验样品植入物，植入物之间应不能互相接触。离开植入物一段距离用适宜的缝合线封闭植入隧道，以防止植入物移动。

12.7.3 肌肉植入试验

按 GB/T 16886.6 中规定方法进行。优先采用套针植入法，可用手术刀片切一很小的切口，亦可直接用穿刺针刺入皮肤内，用探条将样品推入深度约 1 cm 的肌肉内。采用手术植入法时，切开植入点皮肤后分离皮下组织和筋膜，用止血钳分离肌肉，将样品推入肌肉内。用医用缝合线缝合肌筋膜和皮肤切口。植入时如有过量出血，应选择另一位置植入。

12.7.4 骨植入试验

按 GB/T 16886.6 中规定方法进行。采用常规手术操作切开植入部位皮肤，用止血钳分离组织暴露出股骨或胫骨的皮质，采用低转速间歇地在骨上钻孔，操作时用质量浓度为 9 g/L 的无菌氯化钠注射液和吸引器充分灌洗，以免过热使局部组织坏死。植入前将孔扩至所需直径或用丝锥攻出螺纹。柱状样品用手按压植入，螺纹状样品用器械按预定转距旋紧到位并记录该转距。用医用缝合线缝合肌筋膜和皮肤切口。

12.8 结果观察

12.8.1 临床观察

植入后 1 d、3 d 和 5 d 观察植入点皮肤反应，有无出血、红肿和样品排出等异常现象。在植入周期内每天观察动物的一般状态。记录死亡的动物数并及时进行尸检，垂死动物及时隔离并处死。

12.8.2 解剖观察

12.8.2.1 按 GB/T 16886.6 中规定，根据试验材料评价需求确定适宜的植入周期。植入后一般可于 2 周、4 周、12 周、26 周或更长周期时分别无痛处死试验动物，切取包裹样品周围约 0.5 cm~1.0 cm 的组织，将切下的组织块置质量分数为 10% 的甲醛溶液中固定。

注：甲醛溶液用质量浓度为 9 g/L 的氯化钠溶液进行 10 倍稀释。

12.8.2.2 肉眼观察植入部位组织有无异常病变。

12.8.3 组织病理学检查

12.8.3.1 将固定后的组织石蜡包埋后切片，进行 HE 和 VG 染色，在光学显微镜下观察。每只动物每一植入期至少各观察三片试验样品和对照组组织切片。比较试验样品与对照品周围组织反应，宜评价的生物学反应指标包括：

- 纤维化、纤维囊腔和炎症程度；
- 由组织形态学改变而确定的变性；
- 材料、组织界面炎性细胞类型，即嗜中性白细胞、淋巴细胞、浆细胞、嗜酸性白细胞、巨噬细胞和多核细胞的数量及分布；
- 根据核碎片和(或)毛细血管壁的破裂情况确定是否存在坏死；
- 其他组织改变，如血管分布、脂肪浸润、肉芽肿和骨形成；
- 材料变化，如破裂、纤维存在、降解材料残留物的形态和物质；
- 对于多孔和降解植入物，定性、定量测定长入材料内的组织。

对于降解(吸收性)试验材料，在试验中期或接近完全降解水平阶段取出的组织样品内宜还存在一些降解植入物的残留材料。

对骨内植入物，要特别关注组织与试验样品之间界面反应情况。应评价骨接触部位和植入物周围骨的数量以及其间的非钙化组织，注意骨吸收和骨形成情况。

12.8.3.2 推荐的炎症反应分级见表 10。

表 10 炎症反应分级

级 别	炎 性 反 应
0	试验样品周围未见炎性细胞
I	试验样品周围仅见极少量淋巴细胞
II	试验样品周围可见少量嗜中性粒细胞和淋巴细胞,偶见多核异物巨细胞
III	试验样品周围可见以嗜中性粒细胞浸润为主的炎症反应,并可见组织细胞、吞噬细胞、毛细血管和小血管

12.8.3.3 推荐的纤维囊腔形成分级见表 11。

表 11 纤维囊腔形成分级

级 别	纤 维 囊 腔 形 成
0	囊壁较薄,由少量胶原纤维和 1~2 层纤维细胞组成
I	囊壁有变薄而致密趋势,由少量胶原纤维细胞组成,偶见纤维母细胞
II	试验样品周围形成囊腔结构,主要由纤维母细胞、胶原纤维和少量纤维细胞组成
III	试验样品周围形成疏松的囊壁,可见毛细血管和纤维母细胞

注:如试验设计为同时对试验样品的亚急性(亚慢性)和慢性全身毒性作用进行评价,应按照 GB/T 16886.11 中相关方法和本标准第 9 章的规定增加相应项目的检查。

12.9 结果评价

分析比较各植入期试验样品与阴性对照品之间组织反应的差异,综合评价试验样品与活体组织间的生物相容性。

12.10 试验报告

试验报告中应给出下列信息:

- a) 试验材料名称;
- b) 批号;
- c) 试验步骤;
- d) 临床观察情况;
- e) 解剖观察情况;
- f) 组织病理学观察结果;
- g) 结果分析和评价。

13 溶血试验

注:其他血液相容性试验方法见 GB/T 16886.4。

13.1 方法提要

本试验系将试验样品与血液直接接触,通过测定红细胞释放的血红蛋白量以评价试验材料的体外溶血程度。

13.2 试剂

草酸钾、质量浓度为 9 g/L 的氯化钠注射液、新鲜抗凝兔血。

注:采集时间不超过 24 h 的新鲜枸橼酸钠抗凝人体全血如经验证确认适用时可替代兔血用于本试验。

13.3 主要设备

电热恒温水浴、分光光度计、离心机、天平。

13.4 试验样品制备

13.4.1 称取试验样品 15 g。管类材料切成约 0.5 cm 长小段；其他类型材料切成约 0.5 cm×2 cm 条状或相应大小块状。

13.4.2 如为低密度材料或其他不适宜采用试验样品 15 g 的情况下，可按 GB/T 16886.12 规定的浸提比例制备试验样品，管类材料切成约 0.5 cm 长小段；其他类型材料切成约 0.5 cm×2 cm 条状或相应大小块状。

13.5 新鲜稀释抗凝兔血制备

根据试验用量由健康家兔心脏采血。如采血 10 mL，加质量浓度 20 g/L 草酸钾溶液 0.5 mL，制备成新鲜抗凝兔血。取新鲜抗凝兔血 8 mL，加质量浓度 9 g/L 的氯化钠注射液 10 mL 稀释。

13.6 试验步骤

13.6.1 试验样品组每管加入试验样品 5 g，或是在 13.4.2 的情况下按 GB/T 16886.12 规定的浸提比例加入试验样品，再加入氯化钠注射液 10 mL；阴性对照组每管加入氯化钠注射液 10 mL；阳性对照组每管加入蒸馏水 10 mL。每组平行操作 3 管。

13.6.2 全部试管放入恒温水浴中 37℃±1℃保温 30 min 后，每支试管加入 0.2 mL 稀释兔血，轻轻混匀，置 37℃±1℃水浴中继续保温 60 min。

13.6.3 倒出管内液体以 800 g 离心 5 min。

13.6.4 吸取上清液移入比色皿内，用分光光度计在 545 nm 波长处测定吸光度。

13.7 结果计算

试验样品组和对照组吸光度均取 3 管的平均值。阴性对照管的吸光度应不大于 0.03，阳性对照管的吸光度应为 0.8±0.3，否则应重新试验。

试验样品溶血率按式(6)计算：

$$HR = \frac{A - B}{C - B} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(6)$$

式中：

HR——试验样品溶血率，%；

A——试验样品组吸光度；

B——阴性对照组吸光度；

C——阳性对照组吸光度。

13.8 结果评价

试验样品溶血率小于 5%符合本试验要求。

13.9 试验报告

试验报告中应给出下列信息：

- a) 试验材料名称；
- b) 批号；
- c) 试验步骤；
- d) 各组吸光度；
- e) 试验样品溶血率；
- f) 结果评价。

附 录 A
(资料性附录)
细胞培养常用溶液和培养基制备

A.1 平衡盐溶液(BSS)制备

A.1.1 按表 A.1 配方准确称量各种试剂。

表 A.1 常用 BSS 配方

单位为克每升

试 剂	PBS	Earle	Hanks	D-Hanks
NaCl	8.00	6.80	8.00	8.00
KCl	0.20	0.40	0.40	0.40
CaCl ₂	—	0.20	0.14	—
MgSO ₄ · 7H ₂ O	—	0.20	0.20	—
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	1.56	—	0.06	0.06
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	—	0.14	—	—
KH ₂ PO ₄	0.20	—	0.06	0.06
NaHCO ₃	—	2.20	0.35	0.35
葡萄糖	—	1.00	1.00	—
酚红	—	0.02	0.02	0.02

A.1.2 配制方法

配制 BSS 时应注意避免钙、镁离子的沉淀,下面以 Hanks 液为例说明 BSS 配制步骤:

- 按表 A.1 配方精确称量试剂,如含水分子与配方不同,应换算后称量;
- 先将氯化钙溶解在 100 mL 水中,其他试剂依次溶解在 750 mL 水中;
- 用数滴质量浓度为 56 g/L 的碳酸氢钠溶液溶解酚红;
- 将氯化钙溶液缓缓倒入上述 750 mL 试剂溶液中,并不时搅动,防止出现沉淀。随即加入酚红溶液后,移入 1 000 mL 容量瓶内,加水至刻度;
- 分装后置压力蒸汽灭菌器内 115℃ 灭菌 30 min,4℃ 保存。

注:细胞培养用溶液所用的水均指使用玻璃蒸馏器新鲜制备的三次蒸馏水。

A.2 消化液制备**A.2.1 胰蛋白酶溶液(质量浓度为 2.5 g/L)**

胰蛋白酶粉	2.5 g
D-Hanks 液	1 000 mL

充分搅拌溶解后过滤除菌,分装入瓶,置冷冻箱内保存。使用前置 37℃ 水浴箱内溶解,用质量浓度为 56 g/L 的碳酸氢钠溶液调节 pH 至 7.2 左右。

A.2.2 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)溶液

氯化钠	8.0 g
氯化钾	0.2 g
磷酸氢二钠	1.15 g
磷酸二氢钾	0.2 g

EDTA	0.2 g
水	1 000 mL

将前四种试剂溶解后加入 EDTA, 搅拌溶解, 过滤除菌或置压力蒸汽灭菌器内 115℃ 灭菌 30 min, 分装入瓶, 4℃ 保存。

A.3 四唑盐(MTT)染色液制备

MTT	0.5 g
PBS 液	100 mL

搅拌溶解, 置压力蒸汽灭菌器内 115℃ 灭菌 30 min, 4℃ 保存。

A.4 细胞培养基制备

A.4.1 RPMI 1640 培养基

RPMI 1640 干粉培养基	规定剂量
碳酸氢钠	规定剂量
L-谷氨酰胺(根据包装袋上说明添加)	规定剂量
水	1 000 mL

将培养基干粉溶于总量 1/3 的水中, 搅拌溶解后补加水至 1 000 mL。根据包装袋上说明添加碳酸氢钠和 L-谷氨酰胺, 搅拌溶解。加入抗生素, 最终浓度为青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μg/mL。过滤除菌, 分装后 4℃ 保存。

使用前加入胎牛血清(或小牛血清)100 mL/L, pH 调至 7.2~7.4。

附 录 B
(资料性附录)
遗传毒性试验用试剂制备

B.1 活化系统(S9 和 S9 混合液)**B.1.1 大鼠肝 S9 液**

B.1.1.1 选健康雄性成年 SD 或 Wistar 大白鼠,体重 150 g 左右,约 5~6 周龄。将多氯联苯(Aroclor 1254或国产 PCB-五氯)溶于玉米油中,浓度为 200 mg/mL,按 500 mg/kg(体重)无菌操作一次腹腔注射。

B.1.1.2 第 6 天用颈动脉放血法处死动物,打开腹腔,用 20 mL 新鲜冷至 4℃的 0.15 mol/L 氯化钾溶液进行肝门静脉灌注后,小心分离并将肝脏完整取出。取出肝脏称重后,用 0.15 mol/L 氯化钾溶液连续冲洗数次,以便除去能抑制微粒体酶活性的血红蛋白。每克肝(湿重)加 0.1 mol/L 氯化钾溶液 3 mL,连同烧杯移入冰浴中,用灭菌剪刀剪碎肝脏,在玻璃匀浆器(低于 4 000 r/min,往复 1 min~2 min),或组织匀浆器(20 000 r/min,1 min)中制成肝匀浆。以上操作需注意无菌和局部冷环境(4℃)。

B.1.1.3 将制成的肝匀浆在低温(0~4℃)高速离心机上,以 9 000 g 离心 10 min,吸出上清液为肝 S9 液。

B.1.1.4 S9 制成后,经无菌检查,测定蛋白含量(Lowry 法),每毫升蛋白含量宜不超过 40 mg,并经间接致癌物(诱变剂)鉴定其生物活性合格后,分装于无菌冷冻管或安瓿中,每安瓿 2 mL 左右,用液氮或干冰速冻后置-80℃低温保存,保存期不超过一年。

B.1.2 S9 混合液辅助因子

B.1.2.1 0.4 mol/L 氯化镁(MgCl)溶液:称取 3.8 g,加蒸馏水稀释至 100 mL。灭菌或滤菌。4℃保存。

B.1.2.2 1.65 mol/L 氯化钾(KCl)溶液:称取 12.3 g,加蒸馏水稀释至 100 mL。灭菌或滤菌。4℃保存。

B.1.2.3 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4),每 500 mL 由以下成分组成:

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)(14.2 g / 500 mL) 440 mL

磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)(13.8 g/500 mL) 60 mL

调 pH 值为 7.4,0.103 MPa 20 min 灭菌或滤菌。4℃保存。

B.1.2.4 辅酶-II(氧化型)溶液:准确称取辅酶-II,用无菌蒸馏水溶解配制成 0.025 mol/L 溶液,低温保存(-20℃以下)。

B.1.2.5 葡萄糖-6-磷酸钠盐溶液:称取葡萄糖-6-磷酸钠盐,用无菌蒸馏水溶解配制成 0.05 mol/L,低温保存(-20℃以下)。

B.1.3 10%S9 混合液

每 10 mL 由以下成分组成:

磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH7.4) 6.0 mL

氯化钾溶液(1.65 mol/L) 0.2 mL

氯化镁溶液(0.4 mol/L) 0.2 mL

葡萄糖-6-磷酸盐溶液(0.05 mol/L) 1.0 mL

辅酶-II 溶液(0.025 mol/L) 1.6 mL

肝 S9 液 1.0 mL

临用时新鲜无菌配制,或滤过除菌。混匀,置冰浴中待用。

B.2 培养基与试剂**B.2.1 营养肉汤培养基**

牛肉膏	2.5 g
胰胨(或混合蛋白胨)	5.0 g
氯化钠	2.5 g
磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	1.3 g
蒸馏水	500 mL

加热溶解,调节 pH 值为 7.4,分装后 0.103 MPa 20 min 灭菌。4℃ 保存。

B.2.2 营养肉汤琼脂培养基

琼脂粉	1.5 g
营养肉汤培养基	100 mL

加热融化后调节 pH 值为 7.4,0.103 MPa 20 min 灭菌。

B.2.3 底层培养基**B.2.3.1 磷酸盐贮备液**

磷酸氢钠铵($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$)	17.5 g
柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	10.0 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	50.0 g
硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1.0 g

加蒸馏水至 100 mL,0.103 MPa 20 min 灭菌。4℃ 保存。

注:待其他试剂完全溶解后再将硫酸镁缓慢放入其中继续溶解,否则易析出沉淀。

B.2.3.2 40%葡萄糖溶液

葡萄糖	40.0 g
-----	--------

加蒸馏水至 100 mL,0.055 MPa 20 min 灭菌。4℃ 保存。

B.2.3.3 1.5%琼脂培养基

琼脂粉	6.0 g
加蒸馏水至	400 mL

融化后 0.103 MPa 20 min 灭菌。

B.2.3.4 底层培养基制备

趁热(80℃),无菌操作在灭菌琼脂培养基中(400 mL)依次加入:

磷酸盐贮备液	8 mL
40%葡萄糖溶液	20 mL

充分混匀,待冷却至 80℃ 左右时注入培养皿,每皿($\phi 90$ mm)约 25 mL,待培养基凝固后放入 37℃ 恒温箱内,培养过夜以除去水分并检查有无污染。

B.2.4 顶层培养基**B.2.4.1 顶层琼脂**

琼脂粉	3.0 g
氯化钠	2.5 g
加蒸馏水至	500 mL

B.2.4.2 0.5 mmol/L 组氨酸-生物素溶液

D-生物素(分子量 244)	30.5 mg
L-组氨酸(分子量 155)	19.5 mg

加蒸馏水至 250 mL,4℃ 保存。

B.2.4.3 顶层培养基制备

加热融化顶层琼脂,每 100 mL 顶层琼脂中加 0.5 mmol/L 组氨酸-生物素溶液 10 mL。混匀,分装在 100 mL 三角瓶中,0.103 MPa 20 min 灭菌。用时融化分装小试管,每管 2 mL,在 45℃水浴中保温。

B.2.5 特殊试剂和培养基**B.2.5.1 0.8%氨苄青霉素溶液**

称取氨苄青霉素 40 mg,用 0.02 mol/L 氢氧化钠溶液稀释至 5 mL。无菌配制,4℃保存。

B.2.5.2 0.1%结晶紫溶液

称取 100 mg 结晶紫,溶于 100 mL 无菌水。4℃保存。

B.2.5.3 L-组氨酸溶液和 0.5 mmol/L D-生物素溶液

称取 L-组氨酸 0.404 3 g 和 D-生物素 12.2 mg,分别溶于 100 mL 蒸馏水。0.103 MPa 20 min 灭菌,4℃保存。

B.2.5.4 氨苄青霉素平板

每 1 000 mL 中由以下成分组成:

底层培养基	910 mL
磷酸盐贮备液	20 mL
40%葡萄糖溶液	50 mL
组氨酸水溶液(0.404 3 g / 100 mL)	10 mL
0.5 mmol/L D-生物素溶液	6 mL
0.8%氨苄青霉素溶液	3.15 mL

以上成分均分别灭菌或无菌制备。

B.2.5.5 组氨酸-生物素平板

每 1 000 mL 中由以下成分组成:

底层培养基	914 mL
磷酸盐贮备液	20 mL
40%葡萄糖溶液	50 mL
组氨酸水溶液(0.404 3 g /100 mL)	10 mL
0.5 mmol/L D-生物素溶液	6 mL

以上成分均分别灭菌或无菌制备。

B.2.5.6 二甲基亚砜

光谱纯,0.103 MPa 20 min 灭菌。

B.2.5.7 THG 溶液(100 倍)

胸腺嘧啶核苷	30 mg
次黄嘌呤	50 mg
甘氨酸	75 mg

以上成分用 100 mL 无血清 RPMI 1640 培养基溶解后过滤除菌,-20℃保存。

B.2.5.8 THMG 溶液(100 倍)

按下列步骤配制:

- 配制氨甲喋呤溶液(1 000 倍):向避光的容器中加入 3.0 mg 氨甲喋呤、19.45 mL 质量浓度 9 g/L 的氯化钠溶液、1 mol/L 氢氧化钠溶液 0.35 mL,溶解后加入 1 mol/L 盐酸溶液 0.2 mL;
- 配制 THMG 溶液(100 倍):取上述氨甲喋呤溶液 0.55 mL,加入按 B.2.5.7 制备的 THG 溶液 4.95 mL。过滤除菌。

B.2.5.9 RPMI 1640 培养基

RPMI 1640 干粉培养基	规定剂量
碳酸氢钠	规定剂量
L-谷氨酰胺(根据包装袋上说明添加)	规定剂量
水	1 000 mL

将培养基干粉溶于总量 1/3 的水中,搅拌溶解后补加水至 1 000 mL。根据包装袋上说明添加碳酸氢钠和 L-谷氨酰胺,以及丙酮酸钠 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,搅拌溶解。加入抗生素,最终浓度为青霉素100 U/mL,链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。过滤除菌,分装后 4℃保存。

使用前加入马血清 100 mL/L,pH 调至 7.2~7.4。

参 考 文 献

- [1] GB/T 14233.2—2005 医用输液、输血、注射器具检验方法 第2部分:生物学试验方法
 - [2] GB/T 16886.4—2003 医疗器械生物学评价 第4部分:与血液相互作用试验选择 (ISO 10993-4:2002, IDT)
 - [3] OECD 导则 471 遗传毒理学:鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验
 - [4] OECD 导则 473 遗传毒理学:体外哺乳动物细胞遗传学试验
 - [5] OECD 导则 476 遗传毒理学:体外哺乳动物细胞基因突变试验
-

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
医用有机硅材料生物学评价试验方法
GB/T 16175—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

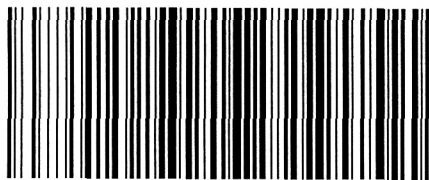
*

开本 880×1230 1/16 印张 2.25 字数 61 千字
2008年4月第一版 2008年4月第一次印刷

*

书号: 155066·1-31078 定价 26.00 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)68533533



GB/T 16175—2008