



中华人民共和国医药行业标准

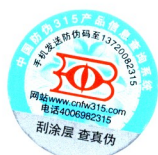
YY/T 0606.15—2014

组织工程医疗产品 第 15 部分：评价基质及支架免疫反应的 试验方法：淋巴细胞增殖试验

Tissue engineered medical products—
Part 15: Standard practice for evaluation of immune responses of
substrate and scaffolds products: Lymphocyte proliferation tests

2014-06-17 发布

2015-07-01 实施



国家食品药品监督管理总局 发布

中华人民共和国医药
行业标准
组织工程医疗产品
第 15 部分:评价基质及支架免疫反应的
试验方法:淋巴细胞增殖试验
YY/T 0606.15—2014

*

中国标准出版社出版发行
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)64275323 发行中心:(010)51780235
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 0.5 字数 7 千字
2014 年 9 月第一版 2014 年 9 月第一次印刷

*

书号: 155066·2-27334 定价 16.00 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

前 言

YY/T 0606《组织工程医疗产品》已经或计划发布以下部分：

- 第 2 部分：术语；
- 第 3 部分：通用分类；
- 第 4 部分：皮肤替代品(物)的术语和分类；
- 第 5 部分：基质及支架的性能和测试；
- 第 6 部分：I 型胶原蛋白；
- 第 7 部分：壳聚糖；
- 第 8 部分：海藻酸钠；
- 第 9 部分：透明质酸钠；
- 第 10 部分：修复或再生关节软骨的植入物的体内评价；
- 第 12 部分：细胞、组织、器官的加工处理指南；
- 第 13 部分：细胞自动计数法；
- 第 14 部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：ELISA 法；
- 第 15 部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：淋巴细胞增殖试验；
- 第 16 部分：保存指南；
- 第 17 部分：外源性因子评价指南；
- 第 18 部分：海藻酸盐凝胶固定或微囊化指南；
- 第 19 部分：修复和替代骨组织植入物骨形成活性的体内评价指南；
- 第 20 部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：细胞迁移试验；
- 第 24 部分：可吸收生物材料植入试验评价规范；
- 第 25 部分：动物源性生物材料 DNA 残留量测定法：荧光染色法；
- 第 26 部分：聚合物支架微结构评价指南。

本部分为 YY/T 0606 的第 15 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家食品药品监督管理总局提出。

本部分由中国食品药品检定研究院归口。

本部分起草单位：中国食品药品检定研究院。

本部分主要起草人：方玉、杜晓丹、郭婷婷、杨晓芳、王春仁、奚廷斐。



组织工程医疗产品

第 15 部分:评价基质及支架免疫反应的 试验方法:淋巴细胞增殖试验

1 范围

YY/T 0606 的本部分规定了评价组织工程医疗产品基质或支架所致哺乳动物细胞免疫反应的试验方法:淋巴细胞增殖试验。

本部分适用于组织工程医疗产品基质或支架的生物学评价。

注:本部分所述试验虽然也可以用于人体标本的检测或用于研究目的,并可为临床追踪提供数据,但并非对人体状况的诊断性检测。

除本部分所选方法外,可采纳其他等效方法。

并非所有的材料和应用均需要按照本部分进行检测,因此应仔细考虑本部分中方法的适用性。在实施本部分推荐的试验前,应考虑 GB/T 16886.1 或管理部门所推荐的试验结果所提示的信息。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第 1 部分:风险管理过程中的评价与试验

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 16886.10 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 16886.12 医疗器械生物学评价 第 12 部分:样品制备与参照样品

YY/T 0606.3 组织工程医疗产品 第 3 部分:通用分类

YY/T 0606.5 组织工程医疗产品 第 5 部分:基质的性能和测试

ISO/TS 10993.20 医疗器械生物学评价 第 20 部分:医疗器械免疫毒理学试验原则和方法(Biological evaluation of medical devices—Part 20:Principles and methods for immunotoxicology testing of medical devices)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

基质 substrate

组织工程医疗产品中作为细胞或生物分子生长、支持或输送载体的原材料。

3.2

支架 scaffold

促进替代、修复或再生组织的细胞或生物活性因子迁移、结合或输送的支持物、释放载体或基体。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ConA:刀豆球蛋白 A

PHA:植物凝集素

RPMI 1640:一种专用生长培养基

5 淋巴细胞增殖试验

5.1 原理

抗原刺激淋巴细胞产生各种细胞因子或白介素,这些细胞因子/白介素将激活并刺激淋巴细胞等分化,从而使增殖反应放大。

5.2 材料和检测标本

基质/支架(以下统称为材料)或其中的已知成分,以及依据 GB/T 16886.12 制备的材料浸提液均可作为免疫学实验材料。

注:当采用材料浸提液作为免疫学实验材料时应对其浸提条件的有效性进行论证。

检测标本可以来自于依据 GB/T 16886.6 和 GB/T 16886.10 进行的刺激及致敏试验或植入试验的动物血液、器官和组织或活检标本,也可采用相应的临床追踪的患者血液和活检标本;还可以用各种抗原免疫动物(兔或小鼠)获得标本。实验需使用活细胞,可取自外周血、腹腔渗出液、肺泡灌洗液、撕碎或研碎的淋巴器官。

5.3 实验设计分组

5.3.1 体外抗原刺激方式

当采用体外抗原刺激方式时可考虑分为以下四组,建议每组至少 3 支平行管:

- a) 细胞对照组;
- b) 细胞加有丝分裂原(PHA/ConA);
- c) 细胞加浓度 1 抗原(材料或浸提液);
- d) 细胞加浓度 2 抗原(材料或浸提液)。

注:推荐多克隆 T 细胞刺激原(有丝分裂原)(例如 PHA 或 ConA)作为体外抗原刺激的阳性对照。

5.3.2 体内抗原刺激方式

当采用体内抗原刺激方式时,可将实验动物分为:

- a) 阴性对照组(溶剂空白或手术空白);
- b) 阳性对照组(已知特异性阳性抗原);
- c) 试验材料组(推荐设三个剂量组)。

注:推荐采用已知特异性阳性抗原作为体内抗原(刺激)的阳性对照。

5.4 推荐操作步骤

5.4.1 采用适当的方法分离淋巴细胞(如使用淋巴细胞分离液、红细胞裂解液),并将其悬浮在生长培养基中(RPMI1640,含 10%胎牛血清和 1%浓度为 30 mg/mL 的谷氨酰胺溶液),调整细胞浓度至

10^6 个细胞/mL。

注：试验应在无菌环境下操作。除青霉素/链霉素或庆大霉素外，不建议在培养液中使用其他的抗生素，因为它们的作用模式可能会影响到细胞的反应。

5.4.2 将淋巴细胞悬液分配到试管中，每个标本至少 2 支平行管，每管 1 mL。

5.4.3 将上述试管置于 37 °C 培养 7 d，有丝分裂原的反应峰值出现在第 4 天，抗原的反应峰值出现在第 7 天。

5.4.4 培养 7 d 后，向培养基中加入³H-胸腺嘧啶核苷或¹²⁵I-胸腺嘧啶核苷继续培养 4 h~6 h。

5.4.5 收集细胞（通常采用过滤清洗的方法），检测同位素的掺入量。MTT 作为一种简便的细胞增殖染色标记，其应用越来越多，也可以用 Alamar Blue 等。

上述试验也可采用微孔培养板进行。每个标本至少 2 个平行孔。建议进行预试验确定培养时间。

抗原与有丝分裂原联合使用可用于检测免疫抑制。

6 数据分析

6.1 体外抗原刺激

将抗原存在下的同位素掺入量（采用 MTT 法时为光密度值，采用 Alamar Blue 时为还原率）与细胞对照组比较。有丝分裂原用于确认检测系统运行是否正常。允许将抗原与有丝分裂原引起的反应进行比较。

6.2 体内抗原刺激

将实验组的同位素掺入量（采用 MTT 法时为光密度值，采用 Alamar Blue 时为还原率）与阴性对照组比较。已知特异性阳性抗原用于确认检测系统运行是否正常。

参 考 文 献

[1] ASTM F1905-98(2003) Standard Practice for Selecting Tests for Determining the Propensity of Materials to Cause Immunotoxicity.

[2] ASTM F1906-98(2003) Standard Practice for Evaluation of Immune Responses In Biocompatibility Testing Using ELISA Tests, Lymphocyte, Proliferation, and Cell Migration.



YY/T 0606.15-2014

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·2-27334

定价: 16.00 元