

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0870.3—2013

医疗器械遗传毒性试验 第3部分：用小鼠淋巴瘤细胞 进行的体外哺乳动物细胞基因突变试验

Test for genotoxicity of medical devices—

Part 3: In vitro mammalian cell gene mutation test using mouse lymphoma cells

2013-10-21 发布

2014-10-01 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
医疗器械遗传毒性试验
第3部分:用小鼠淋巴瘤细胞
进行的体外哺乳动物细胞基因突变试验
YY/T 0870.3—2013

*

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(100013)
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 0.75 字数 18 千字
2014年2月第一版 2014年2月第一次印刷

*

书号: 155066·2-26369 定价 18.00 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 0870 的总标题是《医疗器械遗传毒性试验》，包括以下部分：

- 第 1 部分：细菌回复突变试验；
- 第 2 部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验；
- 第 3 部分：用小鼠淋巴瘤细胞进行的体外哺乳动物细胞基因突变试验；
- 第 4 部分：哺乳动物骨髓红细胞微核试验；
- 第 5 部分：哺乳动物骨髓染色体畸变试验。

有关其他方面的遗传毒性试验将有其他部分的标准。

本部分为 YY/T 0870 的第 3 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

YY/T 0870 的本部分是参考 OECD No.476(1997)《体外哺乳动物细胞基因突变试验》并结合医疗器械/材料自身特点制定的。

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局提出。

本部分由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会(SAC/TC 248)归口。

本部分主要起草单位：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。

本部分参加起草单位：国家食品药品监督管理局北京医疗器械质量监督检验中心、国家食品药品监督管理局天津医疗器械质量监督检验中心。

本部分主要起草人：曾冬明、刘成虎、王昕、王蕊、袁博。

引 言

GB/T 16886.3 中给出的检测潜在遗传毒性物质的试验方法均为经济合作与发展组织(OECD)《化学品测试指南》中规定的方法,但这些方法是针对化学品的特性制定而成,同时未给出详细的试验步骤,因此不适宜直接用于医疗器械/材料的检测。YY/T 0870 参照 OECD 试验方法基本原则,并根据医疗器械/材料的特性对试验方法进行了适当的修改,规定了详细的试验步骤,可作为 GB/T 16886.3 中遗传毒性试验的补充方法标准。

YY/T 0870 的本部分参照 OECD No. 476(1997)方法,是在有或无代谢活化系统的情况下,通过医疗器械/材料诱导小鼠淋巴瘤细胞(L5178Y TK+/-3.7.2C)基因正向突变情况,来评价试验样品潜在的致突变性。

YY/T 0870 的本部分中根据在培养基中的生长能力和自发突变率是否稳定选择细胞。体外进行的试验通常都需要用外源性代谢活化系统。但外源性代谢活化系统并不能完全模拟哺乳动物体内的代谢条件。pH 和渗透压的改变或受试样品的细胞毒性较高等可导致假阳性结果,从而使试验结果无法反应体内基因突变的真实情况。

医疗器械遗传毒性试验

第3部分:用小鼠淋巴瘤细胞 进行的体外哺乳动物细胞基因突变试验

1 范围

YY/T 0870 的本部分规定了使用小鼠淋巴瘤细胞株(L5178Y TK+/-3.7.2C)进行医疗器械/材料体外哺乳动物细胞基因突变试验的方法。

本部分推荐的试验方法为微孔板法。

注:口腔材料的体外哺乳动物细胞基因突变试验不包括在本部分范围内。

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 16886.3 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 16886.5 医疗器械生物学评价 第5部分:体外细胞毒性试验

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

3 术语和定义

GB/T 16886.1、GB/T 16886.3 和 GB/T 16886.12 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

正向突变 forward mutation

为从原型(野生型)转变至突变型的基因突变,可引起酶活性和编码蛋白的改变和丢失。

3.2

突变频率 mutant frequency

为所观察到的突变细胞数与存活细胞数之比值。

3.3

相对存活率 relative survival; RS

处理结束后,接种的处理细胞形成集落的效力,通常以与对照组细胞数的存活率比值表示。

4 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、倒置显微镜、光学显微镜、压力蒸汽灭菌器等。

5 活化系统、培养基和试剂

试验用活化系统(S9 和 S9 混合液)参见附录 A,培养基和试剂参见附录 B 的规定制备或购买市售

商品。

6 细胞株

6.1 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。

6.2 细胞自发突变清除

6.2.1 应适时检查冻存细胞的自发突变频率。一般地,试验细胞株的平均自发突变频率在 $35 \times 10^{-6} \sim 140 \times 10^{-6}$ 范围内。当细胞突变频率偏高时,按6.2.2~6.2.4对自发突变细胞进行清除。

6.2.2 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% CO₂,下同)培养24h。

6.2.3 培养24h后以200g离心5min,除去上清液,加入新鲜RPMI 1640培养液,细胞浓度调整为 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。

6.2.4 将培养后的细胞以200g离心5min,除去上清液后加入冻存液,细胞浓度调整为 2×10^5 个/mL~ 5×10^5 个/mL。分装于冻存管中冻存。

6.3 支原体污染检测

宜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。

6.4 核型稳定性检测

宜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。

7 试验前准备

7.1 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℃30min,或置电热干燥箱内160℃2h。

7.2 试验环境要求

试验应在无菌操作台或超净工作台中进行。

8 样品制备

宜根据GB/T 16886.12的原则制备试验液。可采用生理盐水和/或其他适宜溶剂作为浸提介质。浸提介质不应与试验样品发生化学反应,且应对细胞的存活和S9的活性无影响。如怀疑试验样品可能对本试验细胞株产生毒性作用时,应根据细胞毒性预试验的相对存活率来确定适宜的试验液浓度。

注 1: ISO 10993.3 正在修订,当新的样品制备方法在未来标准中得到确认后即可采用。

注 2: 若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 10%~20% 范围内确定最大细胞毒性浓度,对试验样品或浸提液进行梯度稀释至最小或无细胞毒性,在相对存活率为阴性对照组的 20%~80% 范围内设至少四个剂量组。

注 3: 与经典的化学物全身毒性试验不同,医用材料一般得不到 LD₅₀ 的剂量值。若采用浸提液进行试验,可考虑单剂量组试验(即试验样品原液或 100% 的浸提原液),但宜对试验所采用的剂量范围提供相应的支持性数据。

注 4: 高浓度的 DMSO 具有细胞毒性作用。因此,如采用 DMSO 为浸提介质,使用时浓度应不大于 1.0% (体积分数)。

9 对照样品制备

9.1 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。

9.2 阳性对照

推荐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。

10 试验步骤

10.1 预试验(如怀疑试验样品可能对本试验细胞株产生毒性作用时)

10.1.1 接触处理

取生长良好的细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 个/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 °C 振荡培养 4 h,振荡频率为 70 r/min~80 r/min。

10.1.2 0 天的平板接种效率 (PE₀) 平板

将 10.1.1 混合液以 200g 离心 5 min,去除上清液,用无血清 RPMI 1640 培养基洗涤细胞两次,用 RPMI 1640 培养基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。将平板放置于 CO₂ 培养箱 37 °C 培养 11 d~14 d。

10.1.3 集落计数

目视或在显微镜及其他适宜用具下观察计数各平板无集落生长的孔数。

10.1.4 数据处理

按式(1)、式(2)计算 PE₀ 及 RS。

10.2 主试验

10.2.1 接触处理

同 10.1.1。

注：若未加 S9 组在接触 4 h 后结果为阴性，宜延长至 24 h。

10.2.2 表达

将上述各种混合液以 200g 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，调整细胞浓度为 3×10^5 个/mL，37 °C 培养 2 d。于 24 h 时检查细胞浓度并调整为 3×10^5 个/mL。

10.2.3 平板制备

10.2.3.1 PE₀ 平板：取 10.2.1 接触处理后离心重悬的细胞悬液，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。

10.2.3.2 第 2 天的平板接种效率（PE₂）平板：第 2 天表达培养结束后，取适量细胞悬液，按 10.2.3.1 所述方法接种 96 孔板，每种剂量接种两块平板。

10.2.3.3 TFT 拮抗平板：第 2 天表达培养结束后，取适量细胞悬液，调整细胞浓度为 1×10^4 个/mL，加入 TFT（三氟胸苷，终浓度为 3 μg/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 CO₂ 培养箱 37 °C 培养 11 d~14 d。

10.2.4 集落计数

目视或在显微镜及其他适宜用具下观察计数各平板无集落生长的孔数。若试验组结果为阳性，至少记录最高浓度阳性组以及阴性对照和阳性对照的集落大小。若试验组结果为阴性，宜记录阴性对照和阳性对照的集落大小。突变集落按大集落（LC：直径 ≥ 1/4 孔径，呈薄层分布，密度低）和小集落（SC：直径 < 1/4 孔径，呈块状，密度高）分别计数，极小集落可再继续培养 3 d 后计数。

11 数据处理

11.1 平板效率（PE₀ 和 PE₂）

按式(1)分别计算 PE₀ 和 PE₂。

$$PE = \frac{-\ln(EW/TW)}{1.6} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

PE —— 平板效率，PE₀ 或 PE₂；

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 相对存活率

按式(2)计算相对存活率。

$$RS = \frac{PE_{0a}}{PE_{0b}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

RS —— 相对存活率；

PE_{0a} —— 试验样品组 PE₀ 平板效率；

PE_{0b} —— 阴性对照组 PE₀ 平板效率。

11.3 TFT 抗性突变频率(MF)

按式(3)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)。

$$MF = \frac{[-\ln(EW/TW)]/N}{PE_2} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

MF ——TFT 抗性突变频率, $\times 10^{-6}$;

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;

PE₂ ——第 2 天的平板接种效率。

注:当计算 L-MF 和 S-MF 时,EW 分别指无大集落生长和无小集落生长的孔数。

11.4 小集落突变率(SCM)

按式(4)计算小集落突变率(SCM)。

$$SCM = \frac{S-MF}{T-MF} \times 100\% \dots\dots\dots(4)$$

式中:

S-MF ——小集落突变频率;

T-MF ——总突变频率。

12 结果评价

当阴性对照的 PE₀ 在 60%~140%范围内,PE₂ 在 70%~130%之间,或在各实验室历史数据范围内,而且阴性对照的 T-MF 小于本实验室历史记录的 2 倍(或 $< 240 \times 10^{-6}$),小集落突变率在 30%~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,则试验有效。否则应重新试验。

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} 以上并具有重现性,为阳性结果。

13 试验报告

试验报告中应包含下列信息:

- a) 试验样品名称、规格型号和批号;
- b) 试验和对照样品制备方法及其说明;
- c) 试验用细胞株来源及质量控制信息;
- d) 试验条件和试验步骤;
- e) 试验结果;
- f) 结果评价;
- g) 结论。

附录 A

(资料性附录)

S9 和 S9 混合液制备

A.1 大鼠肝 S9 液

A.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)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。

注: 也可采用苯巴比妥和 β -萘黄酮联合诱导。

A.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 °C 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 °C)。

A.1.3 将制成的肝匀浆在低温(0 °C~4 °C)高速离心机上, 以 9 000g 离心 10 min, 吸出上清液为肝 S9 液。

A.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 °C 低温保存, 保存期不超过 1 年。

A.2 S9 混合液辅助因子

A.2.1 0.4 mol/L 氯化镁($MgCl_2$)溶液: 称取 3.8 g, 加蒸馏水稀释至 100 mL。灭菌或滤菌。4 °C 保存。

A.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 °C 保存。

A.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($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)(13.8 g/500 mL) 60 mL

调 pH 为 7.4, 0.103 MPa 20 min 灭菌或滤菌。4 °C 保存。

A.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 °C 以下)。

A.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 °C 以下)。

A.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,混匀,置冰浴中待用。

附录 B
(资料性附录)
试剂和培养液制备

B.1 磷酸盐缓冲液

NaCl	8.5 g
KCl	0.2 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.85 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.27 g

溶于 1 000 mL 蒸馏水中,调 pH 为 7.4,0.103 MPa 20 min 灭菌或滤菌。4 ℃ 保存。

B.2 二甲基亚砜(DMSO)

光谱纯,0.103 MPa 20 min 灭菌。

B.3 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.4 THMG 溶液(100 倍)

按下列步骤配制:

- a) 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;
- b) 配制 THMG 溶液(100 倍):取上述氨甲喋呤溶液 0.55 mL,加入按 B.3 制备的 THG 溶液 4.95 mL。过滤除菌。



YY/T 0870.3-2013

版权专有 侵权必究

书号:155066·2-26369

定价: 18.00 元