



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1808—2021

医疗器械体外皮肤刺激试验

In vitro skin irritation test for medical devices

2021-09-06 发布

2022-09-01 实施



国家药品监督管理局 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件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。

本文件起草单位：山东省医疗器械产品质量检验中心、中国食品药品检定研究院、北京市医疗器械检验所、济南磐升生物技术有限公司。

本文件主要起草人：范春光、刘佳、陈亮、王蕊、邢志青、陈丽媛、戴政宁、张平。

引 言

将从健康志愿者获取的正常角蛋白细胞在薄膜或滤纸上的气液交界面培养数日后可形成包括基层、棘层、颗粒层和有功能的角质层在内的三维皮肤模型,即重建人表皮模型。此模型起初是为检测纯化学物体外皮肤刺激性而研发的。近年来,此类模型也被用于检测医疗器械中的刺激性物质。

医疗器械体外皮肤刺激试验

1 范围

本文件规定了采用重建人表皮(RhE)模型进行医疗器械体外皮肤刺激试验的方法。

本文件适用于采用 RhE 模型进行体外皮肤刺激试验评价医疗器械潜在的皮肤刺激性。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 16886.10 医疗器械生物学评价 第 10 部分:刺激与皮肤致敏试验

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

3 术语和定义

GB/T 16886.10 和 GB/T 16886.12 界定的术语和定义适用于本文件。

4 试验原理

医疗器械/材料的极性和非极性浸提液或器械/材料本身可直接接触 RhE 模型的上表面,孵育一定时间后冲洗除去表皮上的试验样品,再用四甲基偶氮唑盐(MTT)试验检测 RhE 模型细胞活性,与阴性对照相比得到组织活度,根据组织活度预测试验样品的刺激性。

5 材料

5.1 RhE 模型

使用商品化 RhE 模型进行试验。RhE 模型的说明见附录 A。

表皮细胞应取自人类免疫缺陷病毒(HIV)1、2 抗体、丙型肝炎抗体、乙肝等抗原均阴性的健康志愿者。本文件的使用者宜建立相应的安全与健康规程以确保生物安全。

5.2 仪器设备

仪器设备如下:

- a) 超净工作台。
- b) 生物安全柜。
- c) 细胞培养箱。
- d) 天平。
- e) 酶标仪。
- f) 水平摇床。

- g) 涡旋振荡器。
- h) 移液器(200 μL 、1 mL)、活塞排代式移液器(100 μL)、连续分液器。
- i) 计时器。

5.3 试剂耗材

试剂耗材如下：

- a) 皮肤模型培养基(由皮肤模型制造商提供,与皮肤模型配套使用)。
- b) 杜氏磷酸缓冲盐溶液(DPBS,1 $\times$)。
- c) 氯化钠注射液(质量浓度:0.9%)。
- d) 芝麻油(高纯度或药用级)。
- e) MTT。
- f) 十二烷基硫酸钠(SDS,质量浓度:20%)。
- g) 异丙醇(分析纯)。
- h) 6孔培养板、24孔培养板、96孔培养板(平底)。
- i) 无菌离心管。
- j) 冲洗液收集瓶。
- k) 弯头钝头镊子。
- l) 大漏斗。
- m) 封口膜。
- n) 锡箔纸。
- o) 无菌棉棒。

6 试验步骤

6.1 浸提液及对照液的制备

6.1.1 浸提液的制备

应按照 GB/T 16886.12 制备医疗器械和/或材料浸提液,注意无菌操作。

宜使用 0.9%氯化钠注射液作为极性浸提介质制备极性浸提液,宜使用芝麻油作为非极性浸提介质制备非极性浸提液。若使用其他浸提介质,应证明浸提介质不影响试验系统。

宜基于 GB/T 16886.12 论证浸提时间和温度。

不适合浸提的医疗器械和/或材料进行试验时,宜论证其适用性。

6.1.2 对照液的制备

6.1.2.1 阴性对照

无菌 DPBS(1 $\times$)。

6.1.2.2 介质对照

应将介质对照置于浸提容器中并进行与医疗器械和/或材料相同的浸提程序。

6.1.2.3 阳性对照

1%的 SDS 溶液。取 0.5 mL 20% SDS 水溶液与 9.5 mL 相应浸提介质,用漩涡振荡器充分混匀。

注 1: 使用试验当天新鲜制备的阳性对照,推荐使用商品化 20% SDS 溶液制备阳性对照。对不适合浸提的试验样品进行试验时,可用无菌 DPBS 制备 SDS 阳性对照。

注 2: 若试验样品与 MTT 试剂反应,或将组织或细胞染色且在冲洗后仍有一定量的残留,试验结果可能会被干扰。在这种情况下,可设置适宜的对照以消除干扰。

6.2 RhE 模型的准备及预孵育

接收皮肤组织后,根据模型制造商的说明将模型放入大小合适的培养板(如 6 孔培养板)中,用配套的培养基预孵育。根据制造商的说明将适量培养基加入培养板中。无菌条件下,打开盛有 RhE 模型的培养板盖子。用镊子小心拿出盛有皮肤组织的小室,在无菌纱布或滤纸上轻轻除去粘附在小室外侧缘的残留琼脂。检查确认无残留后将模型转移至新鲜培养基,倾斜小室避免底部产生气泡。根据制造商说明书预孵育皮肤模型。

注: 保存运送组织的琼脂培养板室温下密封数日能观察有无污染迹象。

6.3 加样和冲洗

6.3.1 总则

虽然采用不同模型进行的体外皮肤刺激试验都遵循相同原则,但不同模型的具体操作可能存在差异。接触时间等条件宜遵从制造商说明书的规定。

6.3.2 准备

室温预热培养基。加样前约 5 min 从培养箱中拿出预孵育的培养板。加样前准备大小合适的培养板(根据制造商的要求选择)用于 RhE 模型与样品及对照的孵育。用代码标记培养板盖子,每个试验样品(如样品 1 的两种浸提液可记为 T1-1 和 T1-2)、阳性对照(可记为 PC1 和 PC2)、介质对照(可记为 VC1 和 VC2)和阴性对照(可记为 NC)分别使用 3 块组织。更换小室下的培养基或将小室移入含新鲜培养基的培养板中。检查培养板底部以确认转移过程中无气泡产生。

6.3.3 加样

分别吸取 100 μ L 未稀释的试验样品、VC、NC 或 PC 置于每个表皮表面(平行 3 孔,注意使用活塞排代式移液器吸取黏稠液体)。用枪头轻轻将液体铺在皮肤上表面。加样完成后,转移培养板至培养箱($37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\%\text{ CO}_2\pm 1\%\text{ CO}_2$,相对湿度 95%)孵育至制造商规定时间。

注 1: 记住加样顺序,因冲洗顺序要与加样顺序一致。

注 2: 因模型表面是疏水的,所以要确保 100 μ L 溶液均匀涂布在表皮的整个表面。在表面张力作用下,有时极性溶剂微滴只能分布到表皮的外缘。这种情况下,可使用枪头铺开样品或使用镊子敲击小室使样品覆盖整个表皮。另外,对于油性浸提液或 1% SDS 芝麻油乳浊液,可使用头端球状的玻璃器具或移液器吸头铺开液体以保证其与整个表皮完全接触。

6.3.4 冲洗

孵育后,使用连续分液器吸取灭菌 DPBS 彻底冲洗组织,推荐冲洗 15~25 次以去除残留试验材料,根据组织制造商提供的具体说明进行。冲洗不能太轻柔,否则试验样品不能完全清除,可使用大漏斗和塑料瓶收集冲洗液,注意防止飞溅和污染。冲洗后,在无菌吸水纸上反扣小室排干水分。使用棉签轻轻拭干表皮表面,并用吸水纸或棉签拭干小室底部。转移小室至预先加有新鲜培养基(0.3 mL/孔)的 24 孔板中临时存储,准备进行 MTT 孵育。若发现皮肤表面仍有残存试验样品,使用无菌棉棒去除并记录。

6.4 RbE 模型 MTT 孵育及吸光度测定

6.4.1 MTT 孵育

6.4.1.1 MTT 母液配制

将 MTT 粉末溶解于 DPBS 中,质量浓度为 5 mg/mL。MTT 充分溶解后,使用 0.22 μm 滤膜过滤,用锡箔纸包裹避光-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,可保存 1 年。

6.4.1.2 MTT 工作液配制

用室温预热的培养基将 MTT 母液稀释至 1 mg/mL。

注: MTT 工作液要现配现用。

6.4.1.3 转移及孵育

从临时存储板中移出小室,使用无菌吸水纸或无菌棉签拭干小室底部,然后将其转移至预先加入 0.3 mL MTT 工作液的 24 孔板中,使用锡箔纸包裹避光。将培养板放入培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 $\pm$ 1% CO_2 , 相对湿度 95%)孵育 180 min $\pm$ 5 min。

6.4.1.4 萃取

MTT 孵育完成后,拭干小室内外所有残留 MTT 溶液,根据组织制造商说明转移组织至合适的盛有适量异丙醇的组织培养板中。使用封口膜密封容器或培养板防止液体挥发。记录开始时间,用培养板振荡器(120 r/min)室温振荡至少 120 min $\pm$ 5 min。使用枪头或注射针刺破组织得到相应孔中的萃取液。用加样器至少混匀 3 次至溶液均匀后转移至 96 孔板。

注:上述密封平板在不振荡条件下可在室温或冰箱内避光过夜萃取(18 h~24 h)。收集萃取液前使用振荡器振荡平板至少 15 min。

6.4.2 吸光度测定

根据模型制造商说明从每个试验孔中转移 200 μL 液体至平底 96 孔培养板中(适当标记),平行 3 孔。使用酶标仪根据制造商说明在合适的波长下测定吸光度(OD)值,通常使用 570 nm 波长。异丙醇溶液作为空白对照,平行 6 孔。

注:及时测量,避免 96 孔板中异丙醇蒸发。

7 数据计算步骤

以下计算步骤适用于不与 MTT 试剂反应、无色、不会将组织染色、非特异性 OD 值小于或等于阴性对照的 5% 的试验样品。

- 空白对照:计算 6 个空白对照孔的平均 OD 值作为空白对照组 OD 值。
- NC:NC 组每块组织 3 个复孔的 OD 值均减去空白对照 OD 值后再相加求和,其和除以 3 得 NC 组每块组织的 OD 值,然后计算 NC 组 3 块组织 OD 值的平均值作为 NC 组 OD 值。
- PC:同法计算 PC 组每块组织的 OD 值。用下式计算 PC 组每块组织的组织活度:

$$\text{VD} = \frac{\text{OD}_x}{\text{ODNC}} \times 100$$

式中:

VD ——组织活度, %;

OD_x ——PC、VC 或试验样品组每块组织的 OD 值;

ODNC——NC 组 OD 值。

然后计算 PC 组 3 块组织的组织活度的平均值作为 PC 组的组织活度。

- d) 同法计算试验样品和 VC 组每块组织的组织活度,然后计算各组 3 块组织平均组织活度作为各组的组织活度。
- e) 根据各组每块组织的组织活度计算各组 3 块组织的组织活度的标准差(SD)。

注: 若为排除试验样品干扰设置了相应对照,则在计算结果时扣除非特异性 OD 值。

8 试验接受准则

8.1 NC 和 VC 接受准则

- a) NC 或 VC 的 3 块组织 OD₅₇₀ 平均值大于或等于 0.7 且小于 3.0,则 NC 或 VC 的组织活度通常符合接受准则。

注: 0.7 和 3.0 是经济合作与发展组织化学品试验导则 439(OECD TG439)中几种 RhE 模型 NC 和 VC 的最小和最大 OD 值,每种模型组织的范围可能有所差异。

- b) 除了符合 a)外,每种模型 NC 和 VC 的 OD 值范围应符合制造商各自的接受准则。
- c) 孵育后 NC 或 VC 3 块组织的组织活度的 SD 小于或等于 20%。
- d) VC 组的组织活度应为 NC 的 80%~120%。

8.2 PC 接受准则

孵育后 PC 组的组织活度为 NC 的 40%以下且 3 块组织的组织活度的 SD 小于或等于 20%,则 PC 数据符合接受准则。

8.3 试验样品数据接受准则

试验样品孵育后 3 块组织的组织活度的 SD 小于或等于 20%,则认为数据有效。若不符合要求则应重复试验。

9 结果判定

根据试验样品组的组织活度预测试验样品潜在刺激性。组织活度小于或等于阴性对照的 50%即表示出现刺激反应。试验组至少一个浸提液组的组织活度小于或等于 50%,则认为此医疗器械/材料有皮肤刺激性,见表 1。

表 1 皮肤刺激结果的判定

试验结果	判定
至少一个浸提液组的组织活度小于或等于阴性对照的 50%	刺激性(I)
两个浸提液组的组织活度均大于阴性对照的 50%	非刺激性(NI)

10 试验报告

试验报告应至少包括以下信息:

- 试验材料或器械的描述;
- RhE 模型的描述及其质控证书复印件;
- 试验方法,包括样品制备过程的详细描述;
- 试验结果;
- 试验结论。

附录 A

(资料性)

RhE 模型的说明

OECD TG 439 中收录了已经经过验证的 6 种 RhE 模型: EpiSkin™ (SM)、EpiDerm™ SIT (EPI-200)、SkinEthic™ RHE、LabCyte EPI-MODEL24 SIT、epiCS 和 Skin+。另外,文件中还提供了模型验证方案与接受准则。其他模型若能通过对 6 种 RhE 模型比对试验相同的刺激及非刺激材料进行的实验室间(至少 3 个实验室)3 轮(3 个生产批号的 RhE 模型)盲法验证试验,证明其预测能力、实验室内及实验室间变异性与已收录某种模型有等同的表现,则可证明其与已收录模型的等效性。

ISO/TC 194 相关工作组采用以上 6 种模型中的 EpiDerm™ (EPI-200)和 SkinEthic™ RHE 两种模型对医疗器械体外皮肤刺激试验进行了国际实验室间比对,验证了这两种模型的有效性。

其他模型如果通过了以上两种形式的比对试验即追随验证试验(catch-up validation),则认为可用于医疗器械体外皮肤刺激试验。

参 考 文 献

- [1] De Jong W.H., Hoffmann S., Lee M., Kandárová H., Pellevoisin C., Haishima Y. Toxicol. Round robin study to evaluate the reconstructed human epidermis (RhE) model as an in vitro skin irritation test for detection of irritant activity in medical device extracts. In Vitro. 2018, 50 pp. 439-449.
- [2] Kandarova H., Willoughby J.A., De Jong W.H., Letasiova S., Milasova T., Bachelor M.A. Pre-validation of an in vitro skin irritation test for medical devices using the reconstructed human tissue model EpiDerm™. Toxicol. In Vitro. 2018, 50 pp. 407-417.
- [3] Olsen D.S., Lee M., Turley A.P. Toxicol. Assessment of test method variables for in vitro skin irritation testing of medical device extracts. In Vitro. 2018, 50 pp. 426-432.
- [4] Pellevoisin C., Videau C., Briotet D., Grégoire C., Tornier C., Alonso A. SkinEthic™ RHE for in vitro evaluation of skin irritation of medical device extracts. Toxicol. In Vitro. 2018, 50 pp. 419-425.
- [5] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Guidelines for testing of chemicals. No. 439. In Vitro Skin Irritation; Reconstructed Human Epidermis Test Method. OECD Publications, 2017.
- [6] Alépée N., Tornier C., Robert C., Amsellem C., Roux M.-H., Doucet O. A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic™ RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test. Toxicol. In Vitro. 2010, 24 pp. 257-266.
- [7] Kandárová H., Hayden P., Klausner M., Kubilus J., Kearney P., Sheasgreen J. 2009). In Vitro Skin Irritation Test: Improving the Sensitivity of the EpiDerm Skin Irritation Test Protocol. AT-LA 37, 671-669, 2009.
- [8] Coleman K.P., Grailer T.P., McNamara L.R., Rollins B.L., Christiano N.J., Kandárová H. Toxicol. Preparation of irritant polymer samples for an in vitro round robin study. In Vitro. 2018, 50 pp. 401-406.
- [9] Pellevoisin C., Tornier C., Bremond C., Rollins B., Briotet D., Turley A. Skin irritation of medical devices; In vitro assay with EPISKIN reconstructed human epidermis (RHE). Toxicol. Lett. 2016, 258 (S63) p.viii.
- [10] Kandárová H., Bendova H., Letasiova S., Coleman K.P., De Jong W.H., Jirova D. Toxicol. Evaluation of the medical devices benchmark materials in the controlled human patch testing and in the RhE in vitro skin irritation protocol. In Vitro. 2018, 50 pp. 433-438.
- [11] Faller C., Bracher M., Dami N., Roguet R. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. Toxicol. In Vitro. 2002, 16 pp. 557-572.
- [12] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 1983, 65 pp. 55-62.
- [13] SOP of in vitro skin irritation of medical devices extracts with SkinEthic™ kinEthic vitro skin irritation of medical devices extracts wepiskin.com/~media/Files/SOP-SkinEthic-RHE-Irritation-Medical-devices, 2018.
- [14] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment, No. 34, OECD Publishing, Paris, 2005.

YY/T 1808-2021

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
医 疗 器 械 体 外 皮 肤 刺 激 试 验
YY/T 1808—2021

*

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)68533533 发行中心:(010)51780238

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

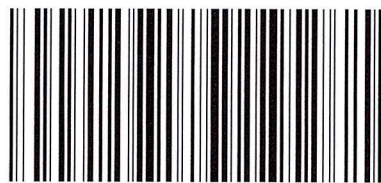
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 20 千字
2021 年 10 月第一版 2021 年 10 月第一次印刷

*

书号: 155066 • 2-35993 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



YY/T 1808-2021



码上扫一扫 正版服务到