ICS 11.040.01
C 30

1523

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0870.2—2019
代替 YY/T 0870.2—2013

医疗器械遗传毒性试验　第2部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

Test for genotoxicity of medical devices—Part 2: In vitro mammalian chromosome aberration test

2019-05-31 发布　　2020-06-01 实施

国家药品监督管理局　发布

刮涂层 查真伪

前　言

YY/T 0870《医疗器械遗传毒性试验》，由下列部分组成：

——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TK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。

本部分为YY/T 0870的第2部分。

本部分按GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本部分代替YY/T 0870.2—2013《医疗器械遗传毒性试验　第2部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验》，与YY/T 0870.2—2013相比，除编辑性修改外主要技术变化如下：

——增加了术语：非整倍体(见3.1)；染色单体断裂(见3.2)；染色单体裂隙(见3.3)；染色体断裂剂(见3.6)；突变(见3.8)；$p53$状态(见3.11)；相对细胞增长数(见3.12)；相对群体倍增数(见3.13)；S9肝匀浆(见3.14)；S9混合物(见3.15)；未处理对照(见3.17)；

——增加了对S9的注释(见第5章)；

——增加了细胞系的选择(见第6章)；

——增加了对样品制备方法进行说明的注释(见第8章)；

——增加了阳性对照的选择原则(见9.2)；

——增加了预实验中细胞毒性的评价方法(见10.1)；

——增加了“实验室能力”(见10.6)；

——增加了“历史对照数据”(见10.7)；

——增加了“可接受标准”(见12.1)；

——增加了“阳性判断标准”(见12.2.1)；

——增加了“阴性判断标准”(见12.2.2)；

——增加了“结果解释”(见12.2.3)。

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。

本部分起草单位：山东省医疗器械产品质量检验中心、四川大学(四川医疗器械生物材料和制品检验中心)。

本部分主要起草人：王鸾鸾、盖潇潇、袁暾、梁洁、詹杨。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

——YY/T 0870.2—2013。

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)发布的《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的，且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 473(2016)方法，在有或无代谢活化系统的情况下，将培养细胞与医疗器械/材料接触后再用中期分裂相阻断剂(如秋水仙素或秋水仙胺)进行处理，通过对处于有丝分裂中期的哺乳动物细胞的染色体畸变情况进行分析，评价试验样品潜在的致畸变性。

本部分的目的是为了筛选医疗器械/材料中具有导致哺乳动物细胞中染色体结构畸变潜能的物质。染色体结构畸变可能有两种类型，即染色体型和染色单体型。对于医疗器械/材料内含有的有毒化学物来说，多为诱导染色单体型畸变，但有时也可导致染色体型畸变。体外染色体畸变试验中可出现多倍体(包括核内复制)数目的增加，多倍体本身并不表明较强的诱导非整倍体的潜力，仅可显示细胞周期干扰或细胞毒性。然而，本部分不适用于检测非整倍体诱变剂以及染色体数目的畸变。本部分需要使用外源性代谢活化系统。但是，这种外源性系统不能完全模拟哺乳动物的体内情况。宜注意避免由 pH、渗透压的改变或高水平细胞毒性可能导致的假阳性结果。

本部分选用已建立的细胞系、人类或啮齿动物来源的原代细胞。根据培养能力、核型稳定性(包括染色体数目)和染色体畸变自发频率选择试验用的细胞。目前，虽然现有的数据无法提出确切的建议，但在评估化学危险时，考虑到 $p53$ 状态、遗传(核型)稳定性、DNA 修复能力和来源(啮齿动物与人类)的选择是很重要的。因此，本部分的使用者宜考虑这些和其他细胞特性对检测染色体畸变的细胞系性能的影响。

医疗器械遗传毒性试验　第2部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

1　范围

YY/T 0870的本部分规定了医疗器械/材料体外哺乳动物细胞染色体畸变试验方法。

本部分适用于通过对处于有丝分裂中期的动物细胞的染色体畸变情况进行分析，来评价试验样品潜在的致畸变性的试验方法。

注1：口腔材料的体外哺乳动物细胞染色体畸变试验见YY/T 0127.16。

注2：纳米材料的体外哺乳动物细胞染色体畸变试验可能需要对本部分中的方法进行特定的修订，但本部分未给予描述。

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 16886.12　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 16886.1、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

非整倍体　aneuploidy

正常二倍体(或单倍体)染色体数目中缺少或增加一条或多条，但不是整套染色体(多倍体)的增减。

3.2

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。

3.3

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

染色单体型畸变　chromatid-type aberration

表现为染色单体断裂或染色单体间断裂和重接的染色体结构损伤。

3.5

染色体型畸变　chromosome-type aberration

表现为两条染色单体在相同位点的断裂或断裂重接的染色体结构损伤。

3.6

染色体断裂剂　clastogen

任何能引起细胞或真核生物染色体结构畸变的物质。

3.7

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。

3.8

突变　mutagenic

在基因或染色体结构（染色体畸变）中产生 DNA 碱基序列的遗传变化。

3.9

数目畸变　numerical aberration

染色体数目改变，不同于所用细胞染色体的正常数目。

3.10

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）。

3.11

***p*53 状态　*p*53 status**

*p*53 蛋白质参与细胞周期调控、细胞凋亡和 DNA 修复。在缺乏功能性 *p*53 蛋白质的细胞中，当 DNA 损伤时，不能通过抑制细胞周期或不能通过凋亡或其他机制（例如诱导 DNA 修复）消除损伤的细胞，理论上应该更容易发生基因突变或染色体畸变。

3.12

相对细胞增长数　relative increase in cell counts（RICC）

与试验样品接触培养的细胞数目的增加与未处理培养物细胞数目增加的比值。

注：数值以“%”表示。

3.13

相对群体倍增数　relative population doubling（RPD）

与试验样品接触培养的细胞倍增数与未处理培养物的细胞倍增数的比值。

注：数值以“%”表示。

3.14

S9 肝匀浆　S9 liver fraction

9 000*g* 离心后的肝匀浆上层液体，即新鲜肝脏提取物。

3.15

S9 混合物　S9 mix

S9 肝匀浆和代谢酶活性所必需的辅助因子的混合物。

3.16

结构畸变　structural aberration

显微镜下观察到细胞分裂中期的染色体结构的改变，如缺失、断片、内交换或互换。

3.17

未处理对照　untreated controls

未经处理（既无试验样品也无浸提介质）但与接触试验样品的培养物进行相同过程的培养物。

4 主要设备

超净工作台、CO_2 培养箱、恒温水浴箱、倒置显微镜、光学显微镜、压力蒸汽灭菌器等。

5 活化系统、培养液和试剂

常用的试验用活化系统为 S9 混合液，S9 和 S9 混合液的制备参见附录 A 的规定或购买市售商品。培养液和试剂参见附录 B 的规定制备或购买市售商品。

注：在细胞的处理过程中，宜避免使用会降低分裂指数的试剂，尤其是一些钙络合剂。

6 细胞系

可选用的细胞系为中国仓鼠肺细胞(CHL)、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)等，推荐首选 CHL。宜使用合适的培养液和培养条件(培养容器、湿化的 5%CO_2，培养温度 37 ℃)来维持所培养细胞的生长。宜定期检查细胞系模态染色体数目的稳定性和支原体污染情况，否则不宜使用。细胞应置于液氮中冷冻保存。实验室宜测定细胞系或原代细胞的正常细胞周期时间，并与公开发表的细胞特征一致。

注 1：若使用其他细胞系进行试验，如 V79、TK6 或原代培养细胞，如人及其他哺乳动物外周血淋巴细胞，使用者宜对其适宜性进行论证。

注 2：当使用原代细胞时，在可行的情况下宜考虑使用来自人类的原代细胞，并根据人类伦理原则和规定进行抽样。人外周血淋巴细胞宜来自年轻(约 18 岁～35 岁)、无吸烟史、无已知疾病且最近未接触遗传毒性物质(如化学试剂、电离辐射)的献血者以确保染色体畸变的背景发生率低且一致。若细胞来自不同的献血者并汇集使用，献血者的数目宜详细说明。

注 3：由于不同细胞周期对试验样品的敏感程度未知，将细胞培养物保持在对数细胞生长期(细胞系)或刺激分化(淋巴细胞的原代培养物)，以使其在细胞周期的不同阶段暴露于试验样品。需要用有丝分裂剂刺激分裂的原代细胞在接触试验样品中通常不再同步(例如有丝分裂刺激 48 h 的人淋巴细胞)。不推荐使用同步细胞进行试验，但只要证据合理也可以接受。

7 试验前准备

7.1 器具灭菌

与试验样品和对照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。

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。宜采用两种溶剂浸提，推荐 0.9%氯化钠注射液(或无血清细胞培养液)和其他适宜溶剂作为浸提介质。浸提介质不应影响试验的进行，例如改变细胞生长，影响试验样品的完整性，与培养容器反应，破坏代谢活化系统等。如怀疑试验样品可能对本试验细胞系产生毒性作用时，应进行预试验来确定适宜的试验液浓度。

注 1：ISO 10993-3:2014 附录 A 中针对不同的医疗器械提供了 A、B、C 3 种样品制备方法，可参考使用。

注 2：若采用浸提液进行试验，当最高浓度的浸提液试验结果为阴性时，可考虑单剂量组试验，但宜对试验所采用的剂量选择提供相应的支持性数据。

注 3：如选用 0.9%氯化钠注射液作为浸提介质，最终接触时浓度宜不大于 10%(体积分数)；高浓度的有机溶剂具有细胞毒性作用，因此，如采用有机溶剂为浸提介质，最终接触时浓度一般宜不大于 1.0%(体积分数)。如选用含血清细胞培养液作为浸提介质，最终接触时浓度宜为 100%(体积分数)。若使用没有充分确认的溶剂，则宜提供相应的数据支持资料来表明它们与试验样品和测试系统之间的相容性并排除溶剂自身的遗传毒性。在缺乏支持数据的情况下，推荐使用未处理对照，以证明所选择溶剂的适宜性。

注 4：可降解/吸收产品的样品制备宜考虑产品的溶解度、pH 和渗透压对试验体系的影响。

9 对照品制备

9.1 阴性对照

阴性对照选用同批号试验样品浸提介质，不加试验样品并在同条件下制备。

9.2 阳性对照

阳性对照用以证明实验室在所用测试方案的条件下鉴定染色体断裂剂的能力以及测试外源性代谢活化系统的有效性(如适用)。阳性对照物举例见表 1，如有充分理由时也可采用其他适宜的阳性对照物。如果同时进行与使用相同接触时间的非活化测试，则该单一阳性对照反应将同时证明代谢活化系统的活性和测试系统的反应性。长期接触(无代谢活化系统)时宜单独设置阳性对照。每个阳性对照宜设置一个或多个浓度，以期提高其可重复性和可检测性，从而证明测试系统的灵敏度，并且阳性对照的反应不宜受到超过本部分规定限值的细胞毒性的影响。

表 1 阳性对照物举例

代谢活化条件	阳性对照物	化学物质登记号
无外源性代谢活化系统	甲磺酸甲酯(methyl methanesulphonate，MMS)	66-27-3
	丝裂霉素 C(mitomycin C)	50-07-7
	4-硝基喹啉-*N*-氧化物(4-nitroquinoline-*N*-oxide)	56-57-5
	阿糖胞苷(cytosine arabinoside)	147-94-4
有外源性代谢活化系统	苯并(a)芘(benzo (a)pyrene)	50-32-8
	环磷酰胺 (cyclophosphamide)	50-18-0

9.3 未处理对照

如不能证实所用浸提介质不具有致突变性，还需设未处理对照。

10 试验步骤

10.1 预试验

对怀疑有细胞毒性反应的试验样品应进行预试验。宜避免最高浓度的试验样品或浸提液产生的假阳性反应，如产生过度的细胞毒性、在细胞培养液中出现沉淀或 pH 和渗透压发生显著变化。如果试验

样品使培养液的 pH 随时间发生明显的变化，则可以调节最终处理培养液的 pH，以避免产生假阳性结果并保持适宜的培养条件。宜在有或无代谢活化的情况下，使用适当的细胞死亡和生长的指标来确定细胞毒性，以保证有足够数目的细胞处于有丝分裂状态。

本部分推荐使用相对群体倍增数[RPD，见式(1)]或相对细胞增长数[RICC，见式(2)]来评估试验样品的细胞毒性。在长期接触的情况下，如果开始接触样品后的采样时间超过 1.5 个正常细胞周期，则 RPD 可能会低估细胞毒性大小，而在这种情况下选择用 RICC 或重新用 RPD 在 1.5 个正常细胞周期内进行评估。其他指标(如细胞完整性、凋亡、坏死、细胞周期)可提供有用的附加信息。

$$RPD = \frac{PD_m}{PD_M} \times 100\% \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

RPD ——相对群体倍增数；

PD_m ——试验组的群体倍增数，其值等于[lg(处理后细胞数量÷初始细胞数量)]÷lg2；

PD_M ——对照组的群体倍增数，其值等于[lg(处理后细胞数量÷初始细胞数量)]÷lg2。

$$RICC = \frac{d_1 - d_0}{D_1 - D_0} \times 100\% \quad \cdots\cdots(2)$$

式中：

RICC ——相对细胞增长数；

d_1 ——试验样品培养物中细胞的最终数量；

d_0 ——试验样品培养物中细胞的起始数量；

D_1 ——对照品培养物中细胞的最终数量；

D_0 ——对照品培养物中细胞的起始数量。

当试验样品具有细胞毒性时，应以试验样品或浸提原液作为最高浓度组进行梯度稀释，即在收获细胞时，试验用最高浓度为与阴性对照相比 RPD 或 RICC 达到(55±5)%的浓度，以及包括从中到小或无细胞毒性的浓度范围。在一些情况下，如试验样品具有陡峭的浓度反应曲线，则可适当缩小间距或将检测的浓度增加。宜在试验用最大浓度达到(55±5)%细胞毒性的前提下进行阳性结果的解释。

10.2 接触处理

10.2.1 试验分为短期接触组(有和无代谢活化系统)和长期接触组(无代谢活化系统)，按 10.2.2～10.2.4 操作。

10.2.2 将一定浓度的细胞接种于培养皿(瓶)内，置于 CO_2 培养箱内培养，保证细胞在收获期处于对数生长状态。

10.2.3 吸去培养皿(瓶)中的培养液，在处于对数生长状态的细胞中加入试验或对照品、S9 混合液(不加 S9 混合液时，需用培养液补足)和细胞培养液，置于培养箱中。短期接触组接触 3 h～6 h，吸去培养皿(瓶)中的液体，用生理等渗液洗细胞 3 次，加入新鲜细胞培养液继续培养，并在接触开始后约 1.5 倍的正常细胞周期时收获细胞。长期接触组接触时间(约 1.5 倍的正常细胞周期时)应持续直到收获细胞。

注 1：当细胞处于有丝分裂期时很容易脱落，因此在换液过程中可能导致部分细胞丢失，宜将原培养液和冲洗液中的细胞离心后再加入新鲜培养液中培养。

注 2：一般设置 2 个平行皿(瓶)，若能获得足够细胞数，可采用单皿(瓶)，尤其当试验样品超过 3 个试验浓度梯度时。

注 3：有些特定的物质(如核酸类似物)，可能需要使用超过 1.5 倍正常细胞周期的接触时间进行检测。

10.2.4 于收获前 1 h～3 h 加入细胞分裂中期阻断剂(如秋水仙素，终浓度为 0.1 μg/mL～1 μg/mL)。

10.3 收获细胞与制片

若采用 35 mm 培养皿的试验体系，推荐的收获细胞与制片的步骤如下：

a) 消化：用胰蛋白酶液消化细胞，待细胞脱落后加入含血清的细胞培养液终止胰蛋白酶作用，混匀，放入离心管内以 200 g 离心 5 min～7 min，弃去上清液；

b) 低渗：加入 0.075 mol/L 氯化钾溶液 5 mL～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 10 min～20 min，加入 1 mL～2 mL 固定液（甲醇＋冰醋酸为 3＋1）混匀。以 200 g 离心 5 min～7 min，弃去上清液；

c) 固定：加入 5 mL～7 mL 固定液，混匀后固定 10 min～20 min，以 200 g 离心 5 min～7 min，弃去上清液。同法再固定 1 次～2 次，弃去上清液；

d) 滴片：加入数滴新鲜固定液，混匀。将混悬液滴于冰水预冷的载玻片上，自然干燥；

e) 染色：将滴片用姬姆萨染液染色，晾干备用。

10.4 结果观察

宜在用显微镜分析染色体畸变之前对所有载玻片（包括阳性和阴性对照）进行独立编号。由于固定步骤经常会导致中期细胞失去一部分染色体，因此，记录的细胞数可等于细胞模式数的 2 $n\pm2$（n 为细胞染色体单倍数）。

在光学显微镜下每一试验组至少选择 300 个分散良好的中期分裂相细胞进行染色体畸变观察。当观察到具有大量染色体畸变的细胞时，中期分裂相的细胞数目可以减少，并且试验样品被认为是明显的阳性。宜记录染色体结构畸变类型（含或不含裂隙）。染色单体与染色体型畸变应分开记录，同时区分亚型（断裂、交换）。

注：当采用 2 个平行皿（瓶）时，300 个分散良好的中期分裂相细胞宜均一分配。

染色体阅片过程必须由经过良好培训的阅片人员来进行，且必要时进行同行评议。尽管本部分的目的是检测结构染色体畸变，但记录发现的多倍体和核内复制的频率是重要的。

10.5 推荐的观察项目

10.5.1 染色体数目的改变

常见类型如下列所述：

——多倍体：染色体成倍增加；

——核内复制：包膜内的特殊形式的多倍化现象。

10.5.2 染色体或染色单体结构的改变

常见类型如下列所述：

——断裂：损伤的长度大于染色单体的宽度；

——裂隙：无着色区的宽度小于染色单体的宽度；

——微小体：较断片小而呈圆形；

——有着丝点环：带有着丝点部分，两端形成环状结构并伴有一对无着丝点断片；

——无着丝点环：由断片形成的无着丝点的环状结构；

——单体互换：形成三辐体、四辐体或多种形状的图像；

——双微小体：成对的染色质小体；

——非特定性型变化：如粉碎化等。

10.6 实验室能力

为了进行常规测试之前建立足够的经验，实验室宜通过不同机制和不同阴性对照（使用各种溶剂/载体）及阳性物质进行试验。这些阳性对照和阴性对照反应宜与文献一致。有经验的实验室，即具有历史数据基础的实验室，可以不再进行以上测试。

在无代谢活化系统的情况下选择阳性对照物质进行短期和长期接触，在有代谢活化系统的情况下选择阳性对照物质进行短期接触，以证明实验室具有检测染色体断裂剂的能力并确定代谢活化系统的有效性。每个阳性对照宜设置一个或多个浓度，以期提高其可重复性和可检测性，从而证明测试系统的灵敏度。

10.7 历史对照数据

实验室宜建立历史阳性对照结果的范围和分布、历史阴性对照（未处理和溶剂对照）结果的范围和分布。

当首次获取历史阴性对照分布的数据时，阴性对照宜与已公开发布的对照数据（若有）一致。随着更多的实验数据被添加到对照分布中，阴性对照应理想地在该分布的95%控制限值范围内。实验室历史阴性对照数据库宜在同一试验条件下至少有10次试验（最好有20次试验）的数据。实验室应采用质量控制方法，如控制图表（如C-图或X-bar图），以确定其阳性和阴性的对照数据在实验室内“处于控制范围内”。

对试验方案的任何修改都应考虑到其与实验室现有的历史对照数据的一致性。任何重大的不一致宜建立新的历史对照数据库。

阴性对照数据宜包括单皿（瓶）试验中细胞染色体畸变的发生率，或平行皿（瓶）的细胞染色体畸变率的总和。阴性对照应理想地在该分布的95%控制限值范围内。同时，在95%控制限值范围之外的阴性对照数据，只要这些数据不是极端的异常值，并且有证据表明检测系统“处于控制范围内”，并且没有技术或人为差错，那么就可以将其纳入历史对照库中。

11 数据处理

宜评价试验组和对照组的结构染色体畸变的细胞的百分比。染色单体与染色体型畸变应分开计算，同时应区分亚型（断裂、交换）。报告裂隙但一般不包括在总畸变频率的计算中。报告发现的多倍体和核内复制的频率。

宜记录主试验中试验组和对照组的细胞毒性。

宜提供各个培养物的资料，所有资料以表格形式列出。

采用合适的统计方法，如χ^2检验或fisher精确概率法对结果进行统计学处理，以评价试验样品的致畸变性。

12 结果判定

12.1 可接受标准

可接受标准基于以下：

——对于实验室历史阴性对照数据库，阴性对照被认为是可以接受的；

——阳性对照不但与历史阳性对照数据库相配，并且与阴性对照相比统计学显著性增加；

——在溶剂对照中的细胞毒性标准应符合要求；

——可以分析足够数量的细胞和浓度；

——选择最高浓度的标准与预试验描述的一致(适用时)。

12.2 结果评估

12.2.1 阳性判断标准

如果满足了所有的可接受标准,当满足以下试验条件时,短期接触组(有和无代谢活化系统)和长期接触组(无代谢活化系统)中任一组试验样品结果被认为明确的阳性:

——与阴性对照相比,染色体结构畸变率在统计上显著地增加;如存在多剂量组试验时,当用适当的浓度梯度测试进行评估存在与剂量相关的增加;

——任一组结果超出了历史的阴性对照数据的分布范围(例如,95%的控制限值)。

12.2.2 阴性判断标准

如果满足了所有的可接受标准,当满足以下试验条件时,短期接触组(有和无代谢活化系统)和长期接触组(无代谢活化系统)中的试验样品结果被认为明确的阴性:

——与阴性对照相比,染色体结构畸变率在统计上无显著的增加;如存在多剂量组试验时,当用适当的浓度梯度测试进行评估时不存在与浓度相关的增加;

——所有结果都在历史阴性对照数据的分布内(例如,95%控制限值)。

12.2.3 结果解释

结果解释基于以下:

——没有必要对明确的阳性或阴性结果进行核实;

——如果反应不是上述描述中明确的阴性或阳性,为了帮助建立一个生物学相关性的结果,宜通过专家的判断和/或进一步的调查来评估这些数据。可增加镜检细胞数(适用时)或使用修正过的试验条件[例如,浓度间隔,其他代谢活化条件(即 S9 浓度或 S9 来源)]进行重复试验可能是有用的;

——多倍体细胞数量的增加可能表明,试验样品可能潜在的抑制有丝分裂的过程,并诱发染色体数目畸变。核内复制染色体的细胞数量的增加可能表明试验样品具有抑制细胞周期进展的潜力,因此多倍体细胞和核内复制的细胞应分别记录下来。

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,有效期(适用时);

——在培养液中的 pH、渗透压(适用时)。

b) 浸提介质:

——介质的选择;

——在最终细胞培养液中介质所占的百分比。

c) 细胞:

——细胞的类型和来源;

——细胞培养的代数(适用时);

——细胞培养方法;

——模态染色体数量。

d) 试验条件：

——中期分裂相阻断剂的确认，如浓度和接触时间；

——浓度选择依据和测试的平行数，细胞毒性资料（如有）；

——细胞培养液的组成，CO_2 体积分数（适用时）和湿度水平；

——培养温度；

——培养时间；

——接触时间；

——接触后收获时间；

——接种时细胞密度（适用时）；

——代谢活化系统的类型和组成（S9 的来源，S9 混合物的制备方法、S9 混合物以及在最终培养液的浓度或体积；S9 的质量控制，适用时）；

——阳性和阴性对照物的最终浓度；

——载玻片制备方法和染色技术；

——测试的可接受标准；

——畸变的标准；

——细胞毒性的测试方法（适用时）；

——细胞毒性和方法的其他相关信息（适用时）；

——阳性、阴性或可疑结果的接受标准；

——测定 pH、渗透压的方法（适用时）。

e) 结果：

——细胞毒性的测定结果，如 RPD 或 RICC（适用时）；

——畸变类型，包含裂隙；

——试验组和对照组中计数的细胞数量，染色体畸变的细胞数量，含或不含裂隙的畸变类型。

——细胞倍性的变化（多倍体细胞和核内复制的细胞）（如有）；

——浓度-反应关系（如可能）；

——阴性和阳性对照资料（浓度和溶剂）；

——历史阴性和阳性资料；

——统计分析方法，p 值。

f) 结果的讨论。

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，约 5～6 周龄。推荐采用苯巴比妥和 β-萘黄酮联合诱导。d_1、d_2、d_3、d_4 大鼠腹腔注射苯巴比妥，每天 1 次。d_1 剂量为 30 mg/kg；d_2、d_3、d_4 每次剂量为60 mg/kg。d_3 和 d_4，在注射苯巴比妥的同时，腹腔注射 β-萘黄酮，每天 1 次，每次剂量为 80 mg/kg。

注：也可采用多氯联苯(Aroclor 1254)，将 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。

A.1.2 第 5 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 ℃)。

A.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。

A.1.4 S9 制成后，经无菌检查，测定蛋白含量，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。

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 ℃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 ℃保存。

A.2.3 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)，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 ℃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 ℃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 ℃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，pH 7.4)	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	8.5g
KCl	0.2 g
磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	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 6.8，0.103 MPa 20 min 灭菌或滤菌。4 ℃保存。

B.2 Giemsa 储备液

取 Giemsa 染料 3.8 g，置研钵中，加少量甲醇研磨，逐渐加甲醇至 375 mL，溶解后再加 125 mL 纯甘油，于 37 ℃温箱保温 48 h，在此期间摇动数次，放置 1 周～2 周过滤备用。

B.3 Giemsa 应用液

取 1 mL 储备液加入 10 mL pH 6.8 磷酸缓冲液，临用时现配。

B.4 固定液

甲醇（分析纯）：冰乙酸（分析纯）以 3：1 混合，临用时现配。

B.5 二甲基亚砜（DMSO）

光谱纯。

参 考 文 献

[1] YY/T 0127.16 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 哺乳动物细胞体外染色体畸变试验

[2] ISO 10993-3:2014 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

[3] OECD 473(2016) 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

中华人民共和国医药
行业标准
医疗器械遗传毒性试验 第2部分：
体外哺乳动物细胞染色体畸变试验
YY/T 0870.2—2019
*
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 1.25 字数 30千字
2019年6月第一版 2019年6月第一次印刷
*
书号：155066·2-34235 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)68510107

YY/T 0870.2-2019