



中华人民共和国国家标准

GB/T 16886.5—2017/ISO 10993-5:2009
代替 GB/T 16886.5—2003

医疗器械生物学评价 第 5 部分：体外细胞毒性试验

Biological evaluation of medical devices—
Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity

(ISO 10993-5:2009, IDT)

2017-12-29 发布

2018-07-01 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

中国标准出版社授权北京万方数据股份有限公司在中国境内(不含港澳台地区)推广使用

目 次

前言	III
引言	V
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 样品和对照品制备	2
5 细胞系	4
6 培养基	4
7 贮存培养细胞制备	4
8 试验步骤	5
9 试验报告	8
10 结果评定	8
附录 A (资料性附录) 中性红摄取(NRU)细胞毒性试验性	9
附录 B (资料性附录) 集落形成细胞毒性试验	15
附录 C (资料性附录) MTT 细胞毒性试验	19
附录 D (资料性附录) XTT 细胞毒性试验	23
参考文献	27

中国标准出版社授权北京万方数据股份有限公司在中国境内(不含港澳台地区)推广使用

前 言

GB/T 16886《医疗器械生物学评价》，由下列部分组成：

- 第 1 部分：风险管理过程中的评价与试验；
- 第 2 部分：动物福利要求；
- 第 3 部分：遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验；
- 第 4 部分：与血液相互作用试验选择；
- 第 5 部分：体外细胞毒性试验；
- 第 6 部分：植入后局部反应试验；
- 第 7 部分：环氧乙烷灭菌残留量；
- 第 9 部分：潜在降解产物的定性与定量框架；
- 第 10 部分：刺激与迟发型超敏反应试验；
- 第 11 部分：全身毒性试验；
- 第 12 部分：样品制备与参照材料；
- 第 13 部分：聚合物降解产物的定性与定量；
- 第 14 部分：陶瓷降解产物的定性与定量；
- 第 15 部分：金属与合金降解产物的定性与定量；
- 第 16 部分：降解产物与可沥滤物毒代动力学研究设计；
- 第 17 部分：可沥滤物允许限量的建立；
- 第 18 部分：材料化学表征；
- 第 19 部分：材料物理化学、形态学和表面特性表征；
- 第 20 部分：医疗器械免疫毒理学试验原则和方法。

本部分为 GB/T 16886 的第 5 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替 GB/T 16886.5—2003《医疗器械生物学评价 第 5 部分：体外细胞毒性试验》，与 GB/T 16886.5—2003 相比，主要技术变化如下：

- 修改了“材料浸提液的制备”“试验步骤”“结果评价”等相关内容，给出了细胞毒性定性和定量评价指标（见 4.2、第 8 章和第 10 章，2003 版的 4.2、第 8 章和第 10 章）；
- 增加了性红摄取（NRU）细胞毒性试验（见附录 A）；
- 增加了集落形成细胞毒性试验（见附录 B）；
- 增加了 MTT 细胞毒性试验（见附录 C）；
- 增加了 XTT 细胞毒性试验（见附录 D）。

本部分使用翻译法等同采用 ISO 10993-5:2009《医疗器械生物学评价 第 5 部分：体外细胞毒性试验》。

与本部分中规范性引用的国际文件有一致性对应关系的我国文件如下：

GB/T 16886.1—2011 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（ISO 10993-1:2009, IDT）

GB/T 16886.12—2017 医疗器械生物学评价 第 12 部分：样品制备与参照材料（ISO 10993-12:2012, IDT）

本部分由国家食品药品监督管理总局提出。

GB/T 16886.5—2017/ISO 10993-5:2009

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: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、国家食品药品监督管理局总局北京医疗器械质量监督检验中心、江苏省医疗器械检验所、上海生物材料研究测试中心。

本部分主要起草人:侯丽、孙晓霞、王蕊、贺学英、高静贤、王莎莎、孙皎、黄哲玮。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB/T 16886.5—1997;

——GB/T 16886.5—2003。

引 言

体外细胞毒性试验具有通用性,广泛适用于各种医疗器械和材料的评价。因此,GB/T 16886 的本部分的目的不是规定一个单一的试验方法,而是规定一个试验方案,需要在一系列试验步骤中判断,以选出最合适的试验。

试验分成三类:浸提液试验、直接接触试验、间接接触试验。

根据被评价样品的性质、使用部位和使用特性选择这些试验中的一类或几类。

试验的选择决定了供试样品的制备方法、培养细胞的制备以及细胞与样品或其浸提液接触的方式。

接触试验结束时,对细胞毒性作用和毒性程度进行评价。GB/T 16886 的本部分放开了对评价方式的选择,这一策略使得可以一系列试验可供选用,反映了许多提倡体外生物学试验团体的观点。

细胞毒性测定中所使用的大量方法和终点测定方法可分成以下评价类型:

- 按形态学方法评定细胞损伤;
- 细胞损伤的测定;
- 细胞生长的测定;
- 细胞代谢特性的测定。

在这四种类型中,每一类都有几种可供选择的方法,研究者宜了解试验的分类及其相应的专项技术,以便可以与类似器械或材料的其他结果在实验室内部和各实验室间的水平上具有可比性。附录中给出了定量试验方法举例。GB/T 16886 的本部分还给出了试验结果的解释指南。

中国标准出版社授权北京万方数据股份有限公司在中国境内(不含港澳台地区)推广使用

医疗器械生物学评价

第5部分:体外细胞毒性试验

1 范围

GB/T 16886 的本部分描述了评定医疗器械体外细胞毒性的试验方法。

本部分规定了与器械和/或器械浸提液直接接触或通过扩散的方式与培养细胞接触的孵育方法。

本部分适用于适宜的生物学参数体外测定哺乳动物细胞的生物学反应。

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。

ISO 10993-1 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(Biological evaluation of medical devices—Part 1:Evaluation and testing within a risk management process)

ISO 10993-12 医疗器械生物学评价 第12部分:样品制备与参照样品(Biological evaluation of medical devices—Part 12:Sample preparation and reference materials)

3 术语和定义

ISO 10993-1 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

培养器皿 culture vessels

适用于细胞培养的器皿,包括玻璃培养皿、塑料培养瓶或塑料多孔培养板和微量滴定板等器皿。

注:在这些试验方法中,这些器皿只要符合组织培养级别的要求,并适用于哺乳动物细胞培养,可以互换使用。

3.2

阳性对照材料 positive control material

按照本部分试验时可再现细胞毒性反应的材料。

注:阳性对照的目的是显示适用试验系统的反应,例如用有机锡作稳定剂的聚氨酯¹⁾已用作固体材料和浸提液的阳性对照,苯酚的稀释液用于浸提液的阳性对照。除了一种材料外还可采用纯化学物质来证明试验系统的性能。

3.3

空白 blank

不含试验样品的浸提介质,浸提期间置于与试验样品相同的器皿中,并经受与试验样品相同的条件。

注:空白的目的是为了评价浸提器皿、浸提介质和浸提过程可能的干扰作用。

1) 含二乙基二硫代氨基甲酸锌(ZDEC)和二乙基二硫代氨基甲酸盐(ZDBC)的聚氨酯可从 Hatano 研究所食品药品安全中心(Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Japan)获取。给出的信息是为了便利本部分的使用者,不代表标准发布者认可这些产品,相等的产品如能够产生相同的结果也可以使用。

3.4

阴性对照材料 **negative control material**

按照本部分试验时不产生细胞毒性反应的材料。

注：阴性对照的目的是显示细胞的背景反应，例如高密度聚乙烯²⁾以作为合成聚合物的阴性对照，氧化铝陶瓷棒则用作牙科材料的阴性对照。

3.5

试验样品 **test sample**

用于生物学试验、化学试验或评价的材料、器械、器械的一部分、组件、浸提液或其中一部分。

3.6

近汇合 **subconfluency**

在对数生长期末，约 80% 的细胞汇合。

4 样品和对照品制备

4.1 总则

试验应选用：

- a) 试验样品浸提液；和/或
- b) 试验样品自身。

样品制备应符合 ISO 10993-12。

每一试验应包括阴性对照和阳性对照。

4.2 材料浸提液的制备

4.2.1 浸提原则

为了测定潜在的毒理学危害，除非在临床应用过程中需要，浸提条件宜模拟或严于临床使用条件，但不导致试验材料发生诸如熔化、溶解或化学结构任何改变等明显变化。因为某些材料的特性（如生物可降解材料），在浸提过程中可能会发生化学结构的改变。

注：浸提液中任何内源性或外源性物质的浓度及其接触试验细胞的量取决于界面面积、浸提体积、pH、化学溶解度、扩散率、渗透压、搅拌、温度、时间和其他因素。

对于患者在使用中混合两种或多种组分而成为最终产品的器械（如骨水泥），该器械在浸提前不宜清洗。清洗该试验样品可能会减少或去除该器械上的残留物。如果该试验样品在无菌环境中使用，宜采用已灭菌的试验样品浸提化学组分。

4.2.2 浸提介质

根据试验样品的化学特性选择浸提介质，应进行论证并形成文件。哺乳动物细胞试验中应使用下列一种或几种介质：

- a) 含血清培养基；
- b) 生理盐水溶液；
- c) 其他适宜的介质。

介质的选择宜反映出浸提的目的，应考虑使用极性和非极性两种介质。含血清培养基是首选的浸

2) 高密度聚乙烯可从美国药典委员会(Rockville, MD, USA)和 Hatano 研究所食品和药品安全中心(Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Japan)获取。给出的信息是为了便利本部分的使用者，不代表标准发布者认可这些产品，相等的产品如能够产生相同的结果也可以使用。

提介质,优先选用含血清培养基用于浸提是由于其具有支持细胞生长以及浸提极性和非极性两种物质的能力。除了含血清培养基,在明确要浸提极性物质(例如离子化合物)时宜考虑采用无血清培养基。其他适宜的介质包括纯水和二甲基亚砜(DMSO)。在所选择的测试系统中,DMSO如高于0.5%(体积分数)时有细胞毒性。与含血清培养基浸提法相比,由于DMSO浸提液稀释度较大,可浸提物的细胞接触浓度会比较低。

注1: 试验可能会采用不同类型的血清(例如胎牛血清、牛/小牛血清、新生小牛血清),血清的选择根据细胞类型而定。

注2: 考虑到血清/蛋白质已知在某种程度上会同溶出物进行结合是很重要的。

4.2.3 浸提条件

4.2.3.1 浸提应采用无菌技术,在无菌、化学惰性的封闭容器中进行,应符合ISO 10993-12。

4.2.3.2 应按照下列一种条件并应按照器械特性和具体使用情况进行浸提,除了之后给出的情况外:

- a) $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、 $(24 \pm 2)\text{h}$;
- b) $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、 $(72 \pm 2)\text{h}$;
- c) $(70 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、 $(24 \pm 2)\text{h}$;
- d) $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、 $(1 \pm 0.2)\text{h}$ 。

上述浸提条件是基于历史资料,已用于提供器械或材料风险评估中潜在危害的测定。可采用其他条件(例如在 37°C 时延长或缩短浸提时间),模拟临床使用中的浸提或提供潜在危害的一种适当的测定,但应进行论证并形成文件。对短期(累积接触时间不大于4h)与未受损皮肤或黏膜接触并且是非植入的器械,在a)~c)所给条件下,浸提时间可小于24h但不小于4h。

含血清培养基只能按照a)规定的浸提条件,因为浸提温度超过 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 会对血清化学和/或血清稳定性以及培养基中其他成分产生不良影响。

对聚合物试验样品,由于高温会改变浸提物成分,浸提温度不宜超过材料玻璃化温度。

4.2.3.3 浸提液接触细胞之前,如果进行过滤、离心或用其他方法处置,最终报告(见第9章)中对此应详细记录并对这些步骤加以说明,任何对浸提液pH的调整也应在报告中说明。宜避免对浸提液进行处理,例如对pH的调整,因为这会影响到试验结果。

4.3 直接接触试验材料的制备

4.3.1 试验样品形态

在细胞毒性检测中,各种形状、尺寸或物理状态(如液体、凝胶、固体等)的材料未经修整即可进行测试。

固体材料首选试验样品宜至少有一个平面,如无平面则应修整出平面。

4.3.2 试验样品的无菌性

4.3.2.1 应考虑试验样品的无菌性。

4.3.2.2 取自灭菌器械试验样品的试验全过程应按无菌操作法进行。

4.3.2.3 试验样品如取自通常非无菌供应但在使用前灭菌的器械,应按照制造商推荐的方法灭菌,并且试验全过程应按无菌操作法进行。

用于试验系统之前,规定试验样品制备方法时宜考虑灭菌方法或灭菌剂对器械的影响。

4.3.2.4 试验样品如取自使用中不需要灭菌的器械,则应在供应状态下使用,在试验全过程中应按无菌操作法进行。为了避免细胞培养的微生物污染,对试验材料进行灭菌或许是合理的,但是灭菌过程不应改变试验材料的性能。

如使用非灭菌试验样品,宜检查细菌污染情况,因为这可能会导致虚假的细胞毒性评定。

4.3.3 液体试验样品

对液体试验样品进行试验应：

- a) 直接放置；或
 - b) 放置到生物惰性吸水性的基质上。
- 滤膜是已发现的适用的惰性吸水性基质。

4.3.4 吸水性试验样品

对吸水性试验样品，如果适宜，试验前应用培养基将其浸透，以防止其吸收试验器皿中的培养基。

4.4 对照品制备

宜选择对照品，可采用与试验样品相同的步骤制备。

5 细胞系

优先采用已建立的细胞系并应从认可的贮源获取³⁾。

在需要特殊敏感性时，如能证明其反应的再现性和准确度，应只能使用直接从活体组织获取的原代培养细胞、细胞系和器官型培养物。

若冻存某一贮存培养细胞系时，则应将其放在相应培养基内，在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下冻存，培养基内加有低温防护剂，如二甲基亚砜或甘油。长期贮存(数月至数年)只能在 $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下冻存。

试验应只能使用无支原体污染细胞，使用前宜检测原代培养细胞是否存在支原体。

定期检查细胞(如形态、倍增时间、有代表性的染色体数目)是重要的，因为试验敏感性会随着传代次数而发生改变。

宜采用良好细胞培养操作规程，见参考文献[5]。

6 培养基

培养基应无菌。

含血清或无血清培养基应符合选定细胞系的生长要求。

培养基中可含有对试验无不良作用的抗生素。

贮存条件应进行确认。

注：培养基的稳定性与其成分和贮存条件有关。

培养基的 pH 应保持在 7.2~7.4。

7 贮存培养细胞制备

用选定的细胞系和培养基制备试验所需足够的细胞。使用存储的培养细胞时，如加有低温防护剂

3) 例如，ISO 专家认同的适宜的细胞系有美国菌种保藏中心 CCL1(NCTC clone 929)、CCL 163(Balb/3T3 clone A31)、CCL 171(MRC-5)和 CCL 75(WI-38)、CCL 81(Vero)和 CCL 10[BHK-21(C-13)]和 V-79 379A。给出该信息是为了便利本部分的使用者，不代表 ISO 认可这些产品。其他细胞系如能产生相同的或更具相关性的结果也可使用。

要除去,使用前至少传代培养一次。

传代培养细胞时,采用适合细胞系的酶分散法和/或机械分散法移出和重悬细胞。

8 试验步骤

8.1 平行样数

应至少采用三个平行试验样品数和对照品数。

8.2 浸提液试验

8.2.1 本试验用于细胞毒性定性和定量评定。

8.2.2 从持续搅拌的细胞悬浮液中吸取等量的悬浮液,注入与浸提液接触的足够数量的各器皿内,轻轻转动器皿使细胞均匀地分散在器皿的表面。

8.2.3 根据培养基选择适宜的缓冲系统,在含或不含二氧化碳的空气中,(37±1)℃进行培养。

试验宜在近汇合单层细胞或新鲜悬浮细胞上进行。

在集落形成试验中,应只能采用适宜低密度细胞。

8.2.4 试验开始前用显微镜验证培养细胞的近汇合和形态学情况。特殊情况下,在试验起始点可接种指数生长细胞(如原代细胞、高增殖细胞)。

8.2.5 试验可选用:

a) 浸提原液;和/或

b) 浸提原液和以浸提介质作稀释剂的浸提液的系列稀释液。

或者,已知或怀疑材料的溶解度受限时,宜通过改变试验样品与浸提介质的原始浸提比例达到稀释。

试验如采用单层细胞,应弃去培养器皿中的培养基,在每个器皿内加入等量浸提液或其稀释液。

试验如采用悬浮细胞,细胞悬浮液制备好后立即将浸提液或其稀释液加到每只平行器皿中。

8.2.6 采用水等非生理浸提液时,浸提液用培养基稀释后应在最高生理相容浓度下进行试验。

注:推荐使用浓缩的(如2倍、5倍)培养基稀释水性浸提液。

8.2.7 加入已知等量的空白和阴性及阳性对照液至其他平行器皿中。

注:适宜时,还可用新鲜培养基做对照试验。

8.2.8 器皿按8.2.3中所述同样条件进行培养,适当的培养周期与选定的具体方法相一致。

8.2.9 经过至少24 h的培养后,按8.5确定细胞毒性反应。

8.3 直接接触试验

8.3.1 本试验用于细胞毒性定性和定量评价。

8.3.2 从持续搅拌的细胞悬浮液中吸取已知等量的悬浮液,注入与试验样品直接接触的足够数量的各器皿内。轻轻水平转动器皿,使细胞均匀地分散在每只器皿的表面。

8.3.3 根据培养基所选的缓冲系统,在含或不含二氧化碳的空气中,(37±1)℃进行培养,直至培养细胞生长至近汇合。

8.3.4 试验开始前用显微镜检查培养细胞的近汇合和形态学情况。特殊情况下,在试验起始点可接种指数生长细胞(如原代细胞、高增殖细胞)。

8.3.5 弃去培养器皿中的培养基,加入新鲜培养基至各器皿内。

8.3.6 在每只器皿中央部位的细胞层上小心地各放置一个试验样品的试样,确保试样覆盖细胞层表面约十分之一。

如经证实也可采用其他试样表面与细胞层表面比率。

操作时应注意防止试样不必要的移动,否则可能会导致细胞的物理性损伤,如不必要的移动可造成脱落细胞的碎片。

注:适宜时,在细胞加入前将试样放入培养器皿内。

8.3.7 同法制备阴性对照和阳性对照材料器皿。

8.3.8 器皿按 8.3.3 中所述同样条件进行培养,适当的培养周期(最少 24 h)与选定的具体方法相一致。

8.3.9 在加入化学物/染料之前除去上层培养基,按 8.5 确定细胞毒性反应。

8.4 间接接触试验

8.4.1 琼脂扩散试验

8.4.1.1 本试验用于细胞毒性定性评定,本法不适用于不能通过琼脂层扩散或可能与琼脂相互作用的可滤物质。使用琼脂扩散试验进行细胞毒性评定应进行论证。

8.4.1.2 从持续搅拌的细胞悬浮液中吸取已知等量的悬浮液,注入足够数量的试验用各平行器皿内。轻轻水平转动器皿,使细胞均匀地分散在每只器皿的表面。

8.4.1.3 根据培养基所选的缓冲系统,在含或不含二氧化碳的空气中,(37±1)℃进行培养,直至生长曲线的对数生长期末细胞近汇合。

8.4.1.4 试验开始前用显微镜检查培养细胞的近汇合和形态学情况。

8.4.1.5 弃去器皿中的培养基,然后将溶化琼脂与含血清的新鲜培养基混合,使琼脂最终质量浓度为 0.5%~2%,并吸取适宜体积加入至每只器皿内。细胞培养只能使用适合于哺乳动物细胞生长的琼脂。这种琼脂/培养基的混合物宜为液态,并且温度适合于哺乳动物细胞。

注:各种不同分子量和纯度的琼脂可通用。

8.4.1.6 将试验样品的平行试样小心地放在每只器皿的固化琼脂层上,确保试样覆盖细胞层表面约十分之一。

如经证实也可采用其他试样表面与细胞层表面比例。

任何吸水性材料置于琼脂之前先用培养基进行湿化处理,以防止琼脂脱水。

8.4.1.7 同法制备阴性对照和阳性对照材料器皿。

8.4.1.8 按 8.4.1.3 中所述的同样条件培养 24 h~72 h。

8.4.1.9 从琼脂上小心地取下试样之前、之后检查细胞测定细胞毒性。

用活体染料如中性红可有助于检测细胞毒性。活体染料可在试样培养前或培养后加入,如在培养前加,应在避光条件下进行细胞培养,以防止因染料光活化作用而引起细胞损伤。

8.4.2 滤膜扩散试验

8.4.2.1 本试验用于细胞毒性定性评定。

8.4.2.2 在足够数量的每只试验用平行器皿内,各放置一枚孔径 0.45 μm、无表面活性剂的滤膜,并加入已知的等量持续搅拌的细胞悬浮液,轻轻转动器皿使细胞均匀地分散在每只滤膜的表面。

8.4.2.3 根据培养基所选的缓冲系统,在含或不含二氧化碳的空气中,(37±1)℃进行培养,直至生长曲线的对数生长期末细胞近汇合。

8.4.2.4 弃去器皿内的培养基,将滤膜细胞面向下,放在固化的琼脂层上(见 8.4.1.5)。

8.4.2.5 将试验样品的平行试样小心地放到滤膜无细胞面的上面。滤膜上放置不产生反应的环,用以保留浸提液和新鲜调和的混合物。

8.4.2.6 同法制备阴性对照和阳性对照材料滤膜。

8.4.2.7 按 8.4.2.3 所述的同样条件培养 2 h±10 min。

8.4.2.8 从滤膜上小心地取下试样,并从琼脂面上小心分离开滤膜。

8.4.2.9 采用适宜的染色步骤测定细胞毒性反应。

8.5 细胞毒性的测定

8.5.1 可采用定性或定量方法测定细胞毒性反应。细胞毒性的定量评价更好一些,定性方法适合筛选用途。

定性评价:用显微镜检查细胞,必要时采用细胞化学染色,评价诸如一般形态、空泡形成、脱落、细胞溶解和胞膜完整性等方面的改变。在试验报告中应描述性地或以数字记录正常形态的变化,表 1 和表 2 中给出了用于对试验样品分级的方法。

表 1 浸提液细胞毒性形态学定性分级

级别	反应程度	全部培养细胞观察
0	无	胞浆内有离散颗粒,无细胞溶解,无细胞增殖下降情况
1	轻微	不超过 20% 的细胞呈圆缩、疏松贴壁、无胞浆内颗粒或显示形态学方面的改变;偶见细胞溶解;仅观察到轻微的细胞生长抑制现象
2	轻度	不超过 50% 的细胞呈圆缩、无胞浆内颗粒,无大范围细胞溶解;可观察到不超过 50% 的细胞生长抑制现象
3	中度	不超过 70% 的细胞层包含圆缩细胞或溶解细胞;细胞层未完全破坏,但可观察到超过 50% 的细胞生长抑制现象
4	重度	细胞层几乎完全或完全破坏

表 2 琼脂和滤膜扩散试验以及直接接触试验反应分级

级别	反应程度	反应区域观察
0	无	试样周围和试样下面未观察到反应区域
1	轻微	试样下面有一些畸形细胞或退化细胞
2	轻度	反应区域局限在试样下方范围
3	中度	反应区域超出试样尺寸至 1.0 cm
4	重度	反应区域超出试样 1.0 cm 以上

试验报告中应包括评价方法和评价结果。

按照表 1 和表 2 分级方法,分级大于 2 级时被认为有细胞毒性作用。

定量评价:测定细胞死亡、细胞生长抑制、细胞增殖或集落形成。可以用客观的方法对细胞数量、蛋白总量、酶的释放、活体染料的释放、活体染料的还原或其他可测定的参数进行定量测试。试验报告中应记录使用的客观方法和反应。

细胞活性下降大于 30% 被认为有细胞毒性反应。其他判定标准,对于替代细胞系或多层式组织结构,应对包括不同的分界点或可接受的试验与对照结果的比例进行论证。对判定标准应进行论证并形成文件。

附录 A~附录 D 中描述的测试方案可用于浸提液细胞毒性的定量测定。

注:在国际确认研究中,附录 A 和附录 B 被证明适用于化学物,并且在国际协同试验中,附录 A 和附录 B 被证明适用于医疗器械。对于有细胞毒性反应的材料,这两种方案可通过计算 IC_{50} 值(估计影响终点的 50% 的抑制浓度)进行细胞毒性反应分级。附录 C 和附录 D 描述了其他广泛用于细胞毒性定量测定的方案。

有些检测细胞毒性的特殊方法,可能需要零点或基线细胞培养对照。

8.5.2 应慎重选择评价方法,试验样品如果释放对试验系统或对检测有干扰的物质时,试验结果可能无效。

释放甲醛的材料只有在评价甲醛对细胞活性的影响后材料的试验结果才可靠。

8.5.3 各平行培养器皿的检测结果如有显著差异,则判定试验不当或无效。这种情况下应重复试验或采用替代方法。

8.5.4 阴性、阳性及任何其他对照品(参照、介质、空白、试剂等)在试验系统中如无预期的反应,则应重复整个试验。

9 试验报告

试验报告应至少包括下列各项内容:

- a) 试验机构名称和地址;
- b) 试验操作者姓名;
- c) 试验开始和结束日期;
- d) 样品的描述;
- e) 细胞系选择和细胞来源说明;
- f) 介质、血清和抗生素(如添加)的批号 and 公司名称;
- g) 试验方法和原理;
- h) 浸提步骤(适宜时)和可沥滤物的性质与浓度,如可能;
- i) 阴性、阳性和其他对照品;
- j) 细胞反应和其他观察情况;
- k) 结果评定所需的任何其他相关数据。

10 结果评定

应由有能力根据试验数据做出判定的人员进行结果的总体评定。细胞毒性数据应结合其他生物相容性数据和产品的预期用途进行评定。

细胞毒性试验结果的解释应考虑 ISO 10993-1 中给出的器械分类。

如出现细胞毒性反应,可采取进一步的评价,例如:

- a) 附加试验(培养基含血清或不含血清,改变培养基中血清的水平);
- b) 适宜时,浸提液分析(如灭菌或其他生产过程残留物);
- c) 稀释液的浓度反应分析;
- d) 可沥滤成分的化学表征;
- e) 其他试验步骤。

任何细胞毒性反应可能都是重要的。但是,这主要预示潜在的体内毒性,仅根据细胞毒性数据不一定能确定该器械不适合给定的临床应用。

附录 A

(资料性附录)

中性红摄取(NRU)细胞毒性试验性

A.1 总则

下列试验方案根据参考文献[1]的附录 C,仅描述与本试验相关的内容。

A.2 试验步骤

A.2.1 基本步骤

将 BALB/c 3T3 细胞接种至 96 孔平板内并持续培养 24 h(~1 倍周期),至形成半汇合单层(细胞维持和培养步骤方面的更多信息见参考文献[5])。然后与系列浓度的试验混合物接触,24 h 后测定每一试验浓度的 NRU 并与对照培养细胞测定进行比较。浸提液如显示细胞毒性反应,计算每一试验浓度(即试验化学物浓度)的生长抑制率。从浓度反应计算 IC_{50} (即 50%NRU 还原的浓度),以浸提液稀释百分比表示。浸提原液为 100%浸提液。

A.2.2 材料

A.2.2.1 细胞系

BALB/c 3T3 细胞,clone 31(如 ECACC86110401,欧洲细胞培养物保藏中心,英国索尔兹伯 SP4 0JG;CCL-163,美国典型培养物保藏中心[ATCC],美国弗吉尼亚州马纳萨斯)和从 CCL-163[ATCC]制备的 JCRB 9005(人类科学研究资源库,日本大阪)。

A.2.2.2 技术设备

A.2.2.2.1 培养箱:37 °C、湿化、5%CO₂ 气体[细胞培养基中如没有适宜的缓冲剂,也可采用 7.5%CO₂ 气体,因为细胞对 pH 变化非常敏感;但是大多数实验室常采用 5%CO₂ 气体,在培养基中添加羟乙基哌嗪乙磺酸[HEPES,4-(2-hydroxyethyl)-1piperazineethanesulfonic acid],有较好的缓冲作用。

A.2.2.2.2 层流柜:生物安全标准。

A.2.2.2.3 水浴:37 °C。

A.2.2.2.4 倒置相差显微镜。

A.2.2.2.5 实验室喷灯。

A.2.2.2.6 离心机:配置选用的微量滴定板转子。

A.2.2.2.7 实验室天平。

A.2.2.2.8 96 孔板光度计:配置 540 nm 滤光片。

A.2.2.2.9 摇荡器:用于微量滴定板。

A.2.2.2.10 细胞计数仪或血细胞计数器。

A.2.2.2.11 移液器。

A.2.2.2.12 8 通道移液器。

A.2.2.2.13 冻存管。

A.2.2.2.14 组织培养瓶:80 cm²、25 cm²。

A.2.2.2.15 96孔组织培养微量滴定板。

A.2.2.3 化学物、培养基和血清

A.2.2.3.1 改良杜氏依格尔培养基(DMEM):不含L-谷氨酰胺。

A.2.2.3.2 L-谷氨酰胺,200 mmol/L或 glutamax。

A.2.2.3.3 新生小牛血清(NBCS)。

注意:不应使用胎小牛血清(FCS)。由于细胞液泡的形成,FCS可导致O.D.值大幅度下降。

由于NBCS的批间变异性,首先检查一批3T3细胞生长刺激性能(20 h~25 h倍增时间),并保留充足量的NBCS。

A.2.2.3.4 胰蛋白酶/EDTA溶液。

A.2.2.3.5 磷酸盐缓冲液(PBS):不含Ca²⁺和Mg²⁺(胰酶消化用)。

A.2.2.3.6 HEPES(见A.2.2.2.1)。

A.2.2.3.7 PBS,含Ca²⁺和Mg²⁺(漂洗用)。

A.2.2.3.8 青霉素/链霉素溶液。

A.2.2.3.9 中性红(NR)。

A.2.2.3.10 二甲基亚砜(DMSO):分析纯。

A.2.2.3.11 乙醇(ETOH):分析纯。

A.2.2.3.12 乙酸:分析纯。

A.2.2.3.13 蒸馏水或任何适用于细胞培养的纯水。

A.2.2.4 准备

A.2.2.4.1 总则

全部溶液(除了NR储备液、NR试验液和NR洗脱液)、玻璃器皿等应无菌,并且宜在无菌条件下和层流柜(生物安全标准)无菌环境中进行操作。

A.2.2.4.2 培养基

含有下列成分(在DMEM中的最终浓度)的DMEM(含碳酸氢钠缓冲剂):

a) 用于冷冻

——20% NBCS

——7%~10% DMSO

b) 用于常规培养

——10% NBCS

——4 mmol/L L-谷氨酰胺或 glutamax

——100 IU/mL 青霉素

——100 μg/mL 链霉素

——20 mmol/L HEPES

c) 用于处置试验样品

——5% NBCS

——4 mmol/L 谷氨酰胺或 glutamax

——100 IU/mL 青霉素

——100 μg/mL 链霉素

——20 mmol/L HEPES

完全培养基宜保存在 4 °C 条件下,并且贮存不超过两周。

由于血清蛋白可能会掩盖试验物质的细胞毒性,处置试验样品的培养基血清浓度要减至 5%。不能完全去除血清,因为如果没有血清,细胞增殖会明显减少。

A.2.2.4.3 中性红(NR)储备液

——0.4 g NR 染料
——100 mL 水

使用前配置,在室温黑暗环境中可贮存两个月。市售配好的中性红储备液如按照标签要求贮存,可使用至失效日期。

A.2.2.4.4 中性红(NR)培养基

——1 mL NR 储备液
——79 mL DMEM

NR 培养基宜在 37 °C 孵育过夜,在加入细胞之前在 600g 离心 10 min(以除去 NR 结晶)。也可采用其他方法(如微孔滤器),只要能保证 NR 培养基除去结晶。等量的 NR 培养基在加入细胞之前宜放置在 37 °C 条件下(如水浴),在 15 min 内从 37 °C 环境中取出,并宜在制备后 30 min 内使用。

A.2.2.4.5 乙醇/乙酸溶液(NR 洗脱液)

——1% 乙酸溶液
——50% 乙醇
——49% 水

使用前现配,保存不超过 1 h。

A.2.2.4.6 样品浸提液制备

按照 ISO 10993-12 制备样品浸提液。

A.2.3 方法

A.2.3.1 总则

常规细胞培养方法见参考文献[1]的附录 C。

A.2.3.2 试验质量检查(I):阳性对照(PC)

每次细胞毒性试验都应包括阳性对照。

多数化学物有历史资料或实验室内、实验室间重复试验的支持,十二烷基硫酸钠(SLS, CAS 151-21-3)即是最经常用于试验的一种化学物,因此推荐作为阳性对照。在使用 SLS 时推荐 4 个浓度梯度:0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.15 mg/mL、0.2 mg/mL。

SLS 的 IC_{50} 历史平均值(Spielmann et.al., 1991^[10])为 0.093 mg/mL。

95% 置信区间为 0.070 mg/mL~0.116 mg/mL。

SLS 的 IC_{50} 如在 95% 置信区间,则试验符合接受标准。

推荐使用阳性参照材料和阴性参照材料[如 ZDEC 和 ZDBC(见脚注 1)和 3.2、3.4]。

A.2.3.3 试验质量检查(II):空白

未处理空白的光密度(NRU 的 OD_{540})绝对值(不涉及空白)可表明,在试验的两天内以每孔 1×10^4

接种的细胞是否以正常的倍增时间指数方式增长。

空白 OD_{540} 平均值如 ≥ 0.3 , 则试验符合接受标准。

对于检查细胞接种系统误差, 将空白按浸提条件进行处置(见 A.2.2.4.6), 并加到 96 孔板的左(第 2 列)、右(第 11 列)两侧(不应使用第 1 列和第 12 列; 见参考文献[1]的附录 E)。

左、右两列空白平均值与全部空白平均值相差如不大于 15%, 则试验符合接受标准。

对于细胞接种误差的检查, 也可以通过相差显微镜检查每块板, 以确保细胞数量一致。采用显微镜评价则可免除两列空白的操作。

A.2.3.4 浓度-反应质量检查

由浓度-反应得出的 IC_{50} 宜至少有两个或三个(如可能)NRU 抑制率在 10% 和 90% 之间的反应作为支撑。如果不是这样, 并且浓度稀释因子又很容易降低则放弃该试验并采用较小的稀释因子重复试验。

A.2.3.5 试验样品浸提液浓度

A.2.3.5.1 范围预测试验

用一个覆盖较大范围的常数因子, 如半对数稀释间隔, 将样品浸提原液稀释成 8 个浓度。如样品浸提液最高浓度培养细胞的活性下降 30% 或更低, 则材料可被认为无细胞毒性, 不必再进行主试验。

A.2.3.5.2 主试验

根据范围预测估算的浓度-反应曲线斜率, 主试验中浓度系列稀释因子宜较小(如 $\sqrt[6]{10} = 1.47$)。以分级反应的至少 3 个点尽量覆盖相关浓度范围(介于 10% 和 90% 反应之间), 避免太多无细胞毒性浓度和/或 100% 细胞毒性浓度。

A.2.3.6 试验步骤

注意: 原代细胞解冻后, 细胞在用于试验之前要传代 2 次~3 次。

表 A.1 给出了试验步骤操作流程。

第 1 天

——用培养基制备 1×10^5 个细胞/mL 的细胞悬液。采用多通道移液器将 100 μ L 只含培养基加到 96 孔组织培养微量滴定板的外围孔中(=空白, 见参考文献[1]的附录 E), 在其余孔中加入 100 μ L 密度为 1×10^5 个细胞/mL 的细胞悬液(= 1×10^4 个细胞/孔)。每一试验样品浸提液制备一个板, 制备一个板用于阳性对照, 如有阴性对照材料再制备一个板。

——细胞培养 24 h(5% CO_2 , 37 $^{\circ}C$, >90% 湿度)以形成半汇合单层。在此培养期间确保细胞恢复、贴附至指数增长。

——在相差显微镜下检查每个板, 确保微量滴定板各孔细胞增长相对相等。进行该项检查是为了判定实验误差。

第 2 天

——培养 24 h 后吸出培养基。

——每孔加入 100 μ L 含适当浓度样品浸提液、或阴性对照、或阳性对照或介质(空白)的处理培养基。

——细胞培养 24 h(5% CO_2 , 37 $^{\circ}C$, >90% 湿度)。

第 3 天

24 h 处置后在相差显微镜下检查每个板, 判定细胞接种系统误差和对照与试验组细胞的生长特性。记录试验样品浸提液细胞毒性作用导致的细胞形态学方面的改变, 但这些记录不用于最高允许剂量(HTD)的计算或任何其他细胞毒性的定量测定。对照细胞的不良生长特性可表明实验误差, 并且可

能会由此放弃该试验。

NRU测定法是依据 Ellen Borenfreund (Borenfreund and Puerner^[3])提供的方法。中性红摄取进入溶酶体和活细胞液泡用于细胞数目和活性的定量指示。

- 用 100 μL 预温的 PBS 冲洗细胞,轻轻敲打去除清洗液。加 100 μL NR 培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、湿化的 5% CO_2 空气中孵育 3 h。
- 孵育后,去除 NR 培养基,用 150 μL PBS 清洗细胞。
- 完全倾倒和除去 PBS(可选用离心倒置滴定板的方式)。
- 加 150 μL NR 洗脱液(乙醇/乙酸)至全部孔,包括空白。
- 将微量滴定板置于摇荡器上快速震荡 10 min,直至 NR 从细胞中提取出来并形成均匀的溶液。
- 用微量滴定板光度计在 540 nm 以空白为参照测量显色溶液的吸光度。原始数据用文件格式(如 ASCII、TXT、XLS)保存,便于随后浓度-反应分析和 IC_{50} 的计算。

A.2.4 数据分析

试验样品浸提液每一浓度以 NRU 表示的细胞活性的计算,采用每一试验浓度 6 个平行值的 NRU 平均值。该值与全部空白的 NRU 平均值(如空白已符合空白接受标准)进行比较,以占未处理空白的百分比表示相对细胞活性。如可行,每一供试物的 8 个浓度宜覆盖无反应至细胞活性完全抑制范围。

表 A.1 3T3NRU 细胞毒性试验操作流程

时间 h	步骤
00 : 00	接种 96 孔板: 1×10^4 个细胞/100 μL DMEM 培养基/孔 孵育(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 22 h~24 h) ↓
24 : 00	除去培养基 ↓
24 : 00	加入用处理培养基制备的 8 个浓度的试验样品浸提液(100 μL) (未处理空白=处理培养基) 孵育(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 24 h) ↓
48 : 00	形态学改变的显微镜评价 除去处理培养基 用 150 μL PBS 冲洗一次 加入 100 μL NR 培养基 孵育(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 3 h) ↓
51 : 00	倾倒出 NR 培养基 用 150 μL PBS 冲洗一次 加入 150 μL NR 洗脱液定色 (乙醇/乙酸液) ↓
51 : 40	震荡滴定板 10 min
51 : 50	在 540 nm 测量 NR 吸光度(即细胞活性)

样品浸提液最高浓度(100%浸提液)相对细胞活性如小于对照组的70%,从浓度-反应测定试验化学物细胞活性50%抑制浓度(即 IC_{50})。可选择下列两种方法。

——手工图示方法

推荐使用概率坐标纸, X =因变量, Y =自变量,因为大部分情况下浓度-反应函数在相关范围内一般为线性。这种方法也可采用半对数纸。

或

——用于浓度-反应数据的任何适当的非线性回归方程(首选 Hill function⁴⁾或 logistic 回归)。

在使用 IC_{50} 进行进一步计算之前,宜合理核查拟合曲线的质量。

样品浸提液最高浓度(100%浸提液)的细胞相对活性如 \geq 对照组的70%,材料应被认为无细胞毒性。

4) Hill 函数是无变化和蛇形,为多剂量-反应曲线的可接受模型。

附录 B
(资料性附录)
集落形成细胞毒性试验

B.1 总则

本试验方案是根据用于医疗材料和器械基本生物学试验的日本指南的细胞毒性试验的第 I 部分，见参考文献[2]。

注：下列方案仅描述了导则第 I 部分中与细胞毒性试验有关的章节。

B.2 试验步骤**B.2.1 基本步骤**

将 V79 细胞加到 6 孔板中，保持培养 24 h 至开始对数生长阶段。然后与系列浓度的试验物接触，孵育 6 d，使集落较大时计数。用甲醇固定集落，吉姆萨液染色并计数。浸提液如对细胞显示细胞毒性作用，计算 IC_{50} (浓度抑制率至 50%)，以浸提液百分比表示。

B.2.2 材料**B.2.2.1 细胞系**

V79 细胞(JCRB 0603, 人类科学研究资源库, 日本大阪; 或美国和欧洲细胞库的其他细胞)。

注：推荐使用 V79 细胞，因为其能形成大并清晰的集落。

B.2.2.2 技术设备

B.2.2.2.1 培养箱: 37 °C, 湿化、5%CO₂/空气。

B.2.2.2.2 层流柜: 生物安全标准。

B.2.2.2.3 水浴: 37 °C。

B.2.2.2.4 倒置相差显微镜。

B.2.2.2.5 立体显微镜。

B.2.2.2.6 实验室喷灯。

B.2.2.2.7 实验室天平。

B.2.2.2.8 细胞计数仪或血细胞计数器。

B.2.2.2.9 移液器。

B.2.2.2.10 移液管。

B.2.2.2.11 组织培养瓶: 75 cm²、25 cm² 或组织培养皿: 100 mm 直径。

B.2.2.2.12 6 孔组织培养微量滴定板。

B.2.2.3 化学物、培养基和血清

B.2.2.3.1 Eagle 最低限量基本培养基(MEM): 含 Eagle 平衡盐溶液。

B.2.2.3.2 胎小牛血清(FCS)。

注：由于 FCS 批间变异性，首先用 V79 细胞检查一批 FCS 的生长刺激性能，并保留充足量的 FCS。

B.2.2.3.3 胰蛋白酶/EDTA 溶液。

B.2.2.3.4 磷酸盐缓冲液(PBS):不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} (胰酶消化用)。

B.2.2.3.5 青霉素/链霉素溶液。

B.2.2.3.6 二甲基亚砷(DMSO):分析纯。

B.2.2.3.7 甲醇:分析纯。

B.2.2.3.8 吉姆萨液。

B.2.2.3.9 磷酸盐缓冲液。

B.2.2.3.10 蒸馏水或任何适用于细胞培养的纯水。

B.2.2.3.11 碳酸氢钠。

B.2.2.3.12 L-谷氨酰胺。

B.2.2.3.13 MEM 非必需氨基酸液。

B.2.2.3.14 丙酮酸钠:100 mmol/L。

B.2.2.4 准备

B.2.2.4.1 总则

全部溶液(除了吉姆萨液)、玻璃器皿等应无菌,并且宜在无菌条件下和层流柜(生物安全标准)无菌环境中进行操作。

B.2.2.4.2 培养基

含有下列成分的 1 000 mL Eagle MEM:

a) 用于冷冻和常规培养,含 10%FCS(MEM 10)

- 111 mL FCS
- 2.2 g 碳酸氢钠
- 0.292 g L-谷氨酰胺

b) 用于浸提和处置,含 5%FCS(MEM 05)

- 53.5 mL FCS
- 5 mL MEM 非必需氨基酸液
- 10 mL 丙酮酸钠,100 mmol/L
- 0.292 g L-谷氨酰胺
- 2.2 g 碳酸氢钠

完全培养基宜在 4 °C 保持,并且贮存不超过 1 个月。

由于血清蛋白可能会掩盖试验物质的细胞毒性,处置培养基的血清浓度要减至 5%。不能完全去除血清,因为如果没有血清,细胞增殖会明显减少。如对试验无不良影响,培养基中可添加适量抗生素。

B.2.2.4.3 5%吉姆萨液

- 5 mL 吉姆萨液
- 95 mL 任何种类磷酸盐缓冲液,pH6.5~7.5

使用前现配。

B.2.2.4.4 样品浸提液制备

按照 ISO 10993-12 制备样品浸提液,但是样品表面积与浸提介质体积的浸提比率推荐采用 6 cm²/mL,样品质量与浸提介质体积的浸提比率推荐采用 0.1 g/mL。见参考文献[6]、[7]和[11]。

取 100% 浸提液,用 MEM05 培养基稀释,制备各种百分比的稀释浸提液。

B.2.3 方法

B.2.3.1 总则

常规细胞培养方法见参考文献[1]的附录 C。

B.2.3.2 试验质量检查(I):阳性对照(PC)和阴性对照(NC)

每次细胞毒性试验都应包括阳性对照和阴性对照。推荐阳性和阴性参照材料,如 ZDEC 和 ZDBC (见脚注 1)。

下列接受标准宜用于 ZDEC 和 ZDBC:

- a) ZDEC 的 IC_{50} 宜不超过 7%。
- b) ZDBC 的 IC_{50} 宜不超过 80%。

B.2.3.3 试验质量检查(II):空白

空白集落平均数如至少为细胞板每孔细胞数目的 70%,则试验符合接受标准。

B.2.3.4 浓度-反应质量检查

由浓度-反应得出的 IC_{50} 宜至少有 2 个或 3 个(如可能)对照抑制率在 10% 和 90% 之间的反应作为支撑。否则,浓度稀释因子可能易于降低,放弃该试验并采用较小的稀释因子重复试验。

B.2.3.5 试验样品浸提液浓度

B.2.3.5.1 范围预测试验

用一个覆盖较大范围的常数因子,如 $1 \geq 1/10 \geq 1/100 \geq 1/1\ 000$,将样品浸提原液稀释成 4 个浓度。如样品浸提液最高浓度培养细胞的活性下降 30% 或更低(小于 30%),则材料可被认为无细胞毒性,不必再进行主试验。

B.2.3.5.2 主试验

根据范围预测估算的浓度-反应曲线斜率,主试验中浓度系列稀释因子宜较小。以分级反应的至少 3 个点尽量覆盖相关浓度范围(介于 10% 和 90% 反应之间),避免太多无细胞毒性浓度和/或 100% 细胞毒性浓度。

B.2.3.6 试验步骤

注意:原种细胞解冻后,细胞在用于试验之前要传代 2 次~3 次。

第 1 天

用 MEM05 培养基制备 33.3 个细胞/mL 的细胞悬液。6 孔板的每孔加入 3 mL 细胞悬液。

第 2 天

孵育 24 h 后从每孔中吸出培养基。加入 2 mL 用 MEM05 培养基制备的 100% 浸提液或稀释浸提液。每一浓度平行制备 3 孔。置培养箱再孵育 6 d。

第 8 天

从每孔中吸出处理培养基,用 PBS 冲洗每一孔,加入甲醇固定集落,再用 5% 吉姆萨液染色。计算每一孔集落数目。

B.2.3.7 结果表示

- 用立体显微镜观察各孔,计数每孔中由 50 个或更多细胞组成的集落数目。
 - 记录每一孔的集落数目。
 - 计算每一浸提液浓度的平均集落数目。
 - 浸提液平均集落数目除以对照组集落数目,以百分数表示系数(平板效率:PE)。
 - 样品浸提液最高浓度(100%浸提液)平板效率如小于对照组的 70%,则材料应被认为有潜在细胞毒性,试验样品的细胞毒性以 IC_{50} 值百分数表示。
 - 计算 IC_{50} (浓度抑制 PE 至 50%),即 50%相对存活率剂量,从较高存活剂量到低于 50%存活剂量的数据中进行计算。
 - 平板效率如 \geq 对照组的 70%,材料应被认为无细胞毒性。
- 注:当最高浓度的平板效率在 50%~70%之间时,计算最高浓度的 IC_{50} 值没有实际意义。

B.2.4 试验报告

应按照第 9 章出具试验报告;应给出下列补充信息:

- a) 给定条件中对照 PE;
- b) 全部试验数据,包括集落数目、集落形成抑制曲线,如可能给出试验样品 IC_{50} 值。

附 录 C
(资料性附录)
MTT 细胞毒性试验

C.1 总则

下列试验方案通过代谢活性测定细胞的存活率,见参考文献[9]。黄色水溶液 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid]在活细胞内代谢性还原,生成蓝紫色不可溶的甲臞。活细胞的数目与甲臞溶于醇类后用光度计测定的色度相关。

C.2 试验步骤

C.2.1 基本步骤

L929 细胞接种至 96 孔板,维持培养 24 h(1 倍周期),至形成半汇合单层(细胞维持和培养步骤方面的更多信息见参考文献[5])。然后与系列浓度试验化合物接触。接触 24 h 后测定每一试验浓度甲臞形成,与对照培养细胞的甲臞形成进行比较。计算每一试验浓度生长抑制百分比。

C.2.2 材料

C.2.2.1 细胞系

采用 L929 细胞(NCTC clone 929;CCL 1,美国典型培养物保藏中心[ATCC],美国弗吉尼亚州马纳萨斯;ECACC No.88102702,欧洲细胞培养物保藏中心,英国索尔兹伯 SP4 0JG),细胞培养物应无支原体。

C.2.2.2 技术设备

- C.2.2.2.1 培养箱:37 °C,湿化,5%CO₂/空气。
- C.2.2.2.2 层流柜:生物安全标准。
- C.2.2.2.3 水浴:37 °C。
- C.2.2.2.4 倒置相差显微镜。
- C.2.2.2.5 实验室喷灯。
- C.2.2.2.6 离心机:选配有微量滴定板转子。
- C.2.2.2.7 实验室天平。
- C.2.2.2.8 96 孔板光度计:配置 570 nm 滤光片(参照 650 nm)。
- C.2.2.2.9 摇荡器:用于微量滴定板。
- C.2.2.2.10 细胞计数仪或血细胞计数器。
- C.2.2.2.11 移液器。
- C.2.2.2.12 8 通道移液器。
- C.2.2.2.13 冻存管。
- C.2.2.2.14 组织培养瓶或组织培养器皿。
- C.2.2.2.15 96 孔组织培养微量滴定板。

C.2.2.3 化学物、培养基和血清

- C.2.2.3.1 依格尔最低限量基本培养基(MEM):不含酚红、谷氨酰胺和碳酸氢钠。

C.2.2.3.2 胎小牛血清(FCS)。

C.2.2.3.3 胰蛋白酶/EDTA 溶液。

C.2.2.3.4 磷酸盐缓冲液(PBS)。

C.2.2.3.5 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)。

C.2.2.3.6 异丙醇:分析纯。

C.2.2.4 准备

C.2.2.4.1 总则

全部溶液、玻璃器皿等应无菌,并且宜在无菌条件下和层流柜(生物安全标准)无菌环境中进行操作。

C.2.2.4.2 培养基

含有下列成分(在 MEM 中的最终浓度)的 MEM(含碳酸氢钠缓冲剂):

a) 用于冷冻

——20% FCS

——7%~10% DMSO

b) 用于常规培养

——10% FCS

——4 mmol/L 谷氨酰胺或 glutamax

——100 IU/mL 青霉素

——100 μg/mL 链霉素

完全培养基宜在 4 °C 保持,并且贮存不超过两周。

C.2.2.4.3 MTT 溶液

MTT 新鲜溶于不含酚红的 MEM 中,浓度为 1 mg/mL。溶液采用注射过滤器(孔径≤0.22 μm)经无菌过滤法除菌。溶液宜当天使用。

C.2.2.4.4 样品浸提液制备

按照 ISO 10993-12 制备样品浸提液。

C.2.3 方法

C.2.3.1 总则

常规细胞培养方法见参考文献[1]的附录 C。

C.2.3.2 试验质量检查(I):阳性对照(PC)和阴性对照(NC)

每次细胞毒性试验都宜包括阳性对照和阴性对照。推荐阳性和阴性参照材料,如 ZDEC 和 ZDBC (见脚注 1)。

C.2.3.3 试验质量检查(II):空白

未经处理空白的光密度(OD_{570})绝对值可表明,在试验的两天内以每孔 1×10^4 接种的细胞是否以正常的倍增时间以指数方式增长。

空白 OD_{570} 平均值如 ≥ 0.2 ,则试验符合接受标准。

为了检查细胞接种系统误差,将空白加到 96 孔板的左(第 2 列)、右(第 11 列)两侧(不应使用第 1 列和第 12 列;参见参考文献[1]的附录 E)。

左、右两列空白平均值与全部空白平均值相差如不大于 15%,则试验符合接受标准。

对于细胞接种误差的检查,也可以通过相位差显微镜检查每块板,以确保细胞数量一致。采用显微镜评价则可免除两列空白的操作。

C.2.3.4 试验步骤

注意:贮存细胞解冻后,细胞在用于试验之前要传代 2 次~3 次。

表 C.1 给出了试验步骤操作流程。

冻存细胞传代生长后第 1 天

——采用酶促消化(胰蛋白酶/EDTA)将培养细胞从培养瓶中移出,细胞悬液在 200g 离心 3 min。用培养基重悬细胞悬液,调整密度为 1×10^5 个细胞/mL。采用多通道移液器将 100 μ L 培养基加到 96 孔组织培养微量滴定板的外围孔中(=空白,见参考文献[1]的附录 E),在其余孔中加入 100 μ L 密度为 1×10^5 个细胞/mL 的细胞悬液(= 1×10^4 个细胞/孔)。

——细胞孵育 24 h(5%CO₂, 37 °C, >90%湿度)以形成半汇合单层。在此孵育期间确保细胞恢复、贴附至指数增长。

——在相差显微镜下检查每个板,确保微量滴定板各孔细胞增长相对相等。进行该项检查是为了判定实验误差。

第 2 天

——孵育 24 h 后吸出培养基。

——每孔加入 100 μ L 含适当浓度样品浸提液、或阴性对照、或阳性对照或溶剂(空白)的处理培养基。试验或阳性对照浸提液宜至少有 4 个浓度,最高浓度宜采用 100%浸提液,其余浓度可为单一对数间隔范围内的适当浓度。阴性对照只宜检验 100%浸提液,宜使用培养基作为空白。

——细胞孵育 24 h(5%CO₂, 37 °C, >90%湿度)。

第 3 天

24 h 处置后在相差显微镜下检查每个板,判定细胞接种系统误差和对照与试验组细胞的生长特性。记录试验样品浸提液细胞毒性作用导致的细胞形态学方面的改变,但这些记录不用于任何细胞毒性定量测定。对照细胞的不良生长特性可表明实验误差,并且可能会因此放弃该试验。

平板检查后小心移除培养基,这是一个重要步骤,因为浸提液中的化学还原剂也会还原 MTT,导致假阴性结果。将 50 μ L MTT 溶液(见 C.2.2.4.3)加到每一试验孔中,平板在 37 °C 培养箱中再孵育 2 h。然后弃去 MTT 溶液,每孔加入 100 μ L 异丙醇溶液。震荡平板,置于配置 570 nm 滤光片的微孔滴定板光度计上测定吸光度(参照波长 650 nm)。

表 C.1 MTT 细胞毒性试验操作流程

时间 h	步骤
00 : 00	接种 96 孔板: 1×10^4 个细胞/100 μ L MEM 培养基/孔 孵育(37 °C, 5%CO ₂ , 22 h~26 h) ↓
24 : 00	除去培养基 ↓

表 C.1 (续)

时间 h	步骤
24 : 00	加入用处理培养基制备的≥4个浓度的试验样品浸提液(100 μL) (未处理空白=处理培养基) 孵育(37 °C, 5%CO ₂ , 24 h) ↓
48 : 00	形态学改变的显微镜评价 除去培养基 加入 50 μL MTT 溶液 孵育(37 °C, 5%CO ₂ , 2 h) ↓
51 : 00	除去 MTT 溶液 每孔加入 100 μL 异丙醇 ^{1]} 震荡滴定板 ↓
51 : 30	在 570 nm 测量吸光度(参照 650 nm)

C.2.4 数据记录

原始数据文件中要记录产生的数据。以表格形式出具结果,包括试验组、阴性对照、空白对照和阳性对照组。

C.2.5 数据分析

活细胞数减少导致了样品中代谢活性降低,这直接与生成的蓝紫色甲臞量有关,在 570 nm 测量光密度。按式(C.1)与空白等式比较计算存活率下降:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{100 \times OD_{570e}}{OD_{570b}} \dots\dots\dots (C.1)$$

式中:

OD_{570e}——试验样品 100%浸提液光密度平均值;

OD_{570b}——空白光密度平均值。

存活率较低时,试验样品潜在的细胞毒性较高。

如存活率下降到<空白的 70%,则具有潜在的细胞毒性。试验样品 50%浸提液存活率宜至少与 100%浸提液的存活率相同或较高,否则宜重复试验。

1] ISO 10993-5:2009 中误为“每孔 100 mL 异丙醇”。

附录 D
(资料性附录)
XTT 细胞毒性试验

D.1 总则

下列试验方案通过线粒体脱氢酶测定细胞的存活率,见参考文献[9]。

XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide]在活细胞内代谢还原,生成水溶性甲贲产物。活细胞的数目与用光度计测定的色度相关。

D.2 试验步骤**D.2.1 基本步骤**

L929 细胞接种至 96 孔板,维持培养 24 h(1 倍周期),至形成半汇合单层(细胞维持和培养步骤方面的更多信息见参考文献[5])。然后与系列浓度试验化合物接触。接触 24 h 后测定每一试验浓度甲贲形成,与对照培养细胞进行比较。计算每一试验浓度生长抑制百分比。

D.2.2 材料**D.2.2.1 细胞系**

采用 L929 细胞(NCTC clone 929:CCL 1,美国典型培养物保藏中心[ATCC],美国弗吉尼亚州马纳萨斯;ECACC No.88102702,欧洲细胞培养物保藏中心,英国索尔兹伯 SP4 0JG),细胞培养物应无支原体。

D.2.2.2 技术设备

D.2.2.2.1 培养箱:37 °C,湿化、5%CO₂/空气。

D.2.2.2.2 层流柜:生物安全标准。

D.2.2.2.3 水浴:37 °C。

D.2.2.2.4 倒置相差显微镜。

D.2.2.2.5 实验室喷灯。

D.2.2.2.6 离心机:选配微量滴定板转子。

D.2.2.2.7 实验室天平。

D.2.2.2.8 96 孔板光度计:配置 450 nm 滤光片(参照 650 nm)。

D.2.2.2.9 振荡器:用于微量滴定板。

D.2.2.2.10 细胞计数仪或血细胞计数器。

D.2.2.2.11 移液器。

D.2.2.2.12 8 通道加样器。

D.2.2.2.13 冻存管。

D.2.2.2.14 组织培养瓶或组织培养器皿。

D.2.2.2.15 96 孔组织培养微量滴定板。

D.2.2.3 化学物、培养基和血清

D.2.2.3.1 依格尔最低限量基本培养基(MEM):不含酚红、谷氨酰胺和碳酸氢钠。

D.2.2.3.2 胎小牛血清(FCS)。

D.2.2.3.3 胰蛋白酶/EDTA 溶液。

D.2.2.3.4 磷酸盐缓冲液(PBS)。

D.2.2.3.5 XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxyaniline inner salt]。

D.2.2.3.6 PMS(吩嗪硫酸甲酯)。

D.2.2.4 准备

D.2.2.4.1 总则

全部溶液、玻璃器皿等应无菌,并且宜在无菌条件下和层流柜(生物安全标准)无菌环境中进行操作。

D.2.2.4.2 培养基

含有下列成分(在 MEM 中的最终浓度)的 MEM(含碳酸氢钠缓冲剂):

a) 用于冷冻

——20% FCS

——7%~10% DMSO

b) 用于常规培养

——10% FCS

——4 mmol/L 谷氨酰胺或 glutamax

——100 IU/mL 青霉素

——100 μg/mL 链霉素

完全培养基宜在 4 °C 保持,并且贮存不超过两周。

D.2.2.4.3 XTT/PMS 溶液

XTT 新鲜溶于不含酚红、56 °C~60 °C 的 MEM 中,浓度为 1 mg/mL,用振荡器混匀。溶液采用注射过滤器(孔径≤0.22 μm)经无菌过滤法除菌。PMS(吩嗪硫酸甲酯)用 PBS 缓冲液配制成 5 mmol/L 溶液,采用 0.22 μm 过滤器无菌过滤法除菌。

使用前将 PMS 溶液加到 XTT 溶液中,浓度为 25 μmol/L(每毫升 XTT 溶液中加 5 μL 5 mmol/L 的 PMS)。XTT/PMS 溶液即刻加到试验孔中。

D.2.2.4.4 样品浸提液制备

采用不含酚红、含 FCS 的 MEM 按照 ISO 10993-12 制备样品浸提液。

D.2.3 方法

D.2.3.1 总则

常规细胞培养方法见参考文献[1]的附录 C。

D.2.3.2 试验质量检查(I):阳性对照(PC)和阴性对照(NC)

每次细胞毒性试验都宜包括阳性对照和阴性对照。推荐阳性和阴性参照材料,如 ZDEC 和 ZDBC [见脚注 1)]。

D.2.3.3 试验质量检查(II):空白

未经处理空白的光密度(OD_{450})绝对值可表明,在试验的两天内以每孔 1×10^4 接种的细胞是否以正常的倍增时间以指数方式增长。

空白 OD_{450} 平均值如 ≥ 0.2 , 则试验符合接受标准。

为了检查细胞接种系统误差,将空白加到 96 孔板的左(第 2 列)、右(第 11 列)两侧(不应使用第 1 列和第 12 列;参见参考文献[1]的附录 E)。

左、右两列空白平均值与全部空白平均值相差如不大于 15%, 则试验符合接受标准。

对于细胞接种误差的检查,也可以通过相差显微镜检查每块板,以确保细胞数量一致。采用显微镜评价则可免除两列空白的操作。

D.2.3.4 试验步骤

注意: 贮存细胞解冻后,细胞在用于试验之前要传代 2 次~3 次。

表 D.1 给出了试验步骤操作流程。

冻存细胞传代生长后第 1 天

——采用酶促消化(胰蛋白酶/EDTA)将培养细胞从培养瓶中移出,细胞悬液在 200g 离心 3 min。

用培养基重悬细胞悬液,调整密度为 1×10^5 个细胞/mL。采用多通道移液器将 100 μ L 培养基加到 96 孔组织培养微量滴定板的外围孔中(=空白,见参考文献[1]的附录 E),在其余孔中加入 100 μ L 密度为 1×10^5 个细胞/mL 的细胞悬液(= 1×10^4 个细胞/孔)。

——细胞孵育 24 h(5% CO_2 , 37 $^{\circ}C$, >90% 湿度)以形成半融合单层。在此孵育期间确保细胞恢复、贴附和指数增长。

——在相差显微镜下检查每个板,确保微量滴定板各孔细胞增长相对相等。进行该项检查是为了判定实验误差。

第 2 天

——孵育 24 h 后吸出培养基。

——每孔加入 100 μ L 含适当浓度样品浸提液、或阴性对照、或阳性对照或溶剂(空白)的处理培养基。试验或阳性对照浸提液宜至少检验 4 个浓度,最高浓度宜采用 100% 浸提液,其余浓度可为单一对数间隔范围内的适当浓度。阴性对照只宜检验 100% 浸提液,宜使用培养基作为空白。

——细胞孵育 24 h(5% CO_2 , 37 $^{\circ}C$, >90% 湿度)。

第 3 天

24 h 处置后在相差显微镜下检查每个板,判定细胞接种系统误差和对照与试验组细胞的生长特性。记录试验样品浸提液细胞毒性作用导致的细胞形态学方面的改变,但这些记录不用于任何细胞毒性定量测定。对照细胞的不良生长特性可表明实验误差,并且可能会因此放弃该试验。

平板检查后将 50 μ L XTT/PMS 溶液加到每一试验孔中,平板在 37 $^{\circ}C$ 培养箱中再孵育 3 h~5 h。平板宜保持在避光环境中。小心地震荡平板,从每孔中吸出 100 μ L 等份的液体至一块新平板的对应孔内,置于配置 450 nm 滤光片的微孔滴定板光度计上测定吸光度(参照波长 630 nm)。

表 D.1 XTT 细胞毒性试验操作流程

时间 h	步骤
00 : 00	接种 96 孔板: 1×10^4 个细胞/100 μ L MEM 培养基/孔 孵育 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO ₂ , 22 h~26 h) ↓
24 : 00	除去培养基 ↓
24 : 00	加入用处理培养基制备的 ≥ 4 个浓度的试验样品浸提液 (100 μ L) (未处理空白 = 处理培养基) 孵育 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO ₂ , 24 h) ↓
48 : 00	形态学改变的显微镜评价 加入 50 μ L XTT/PMS 溶液 孵育 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO ₂ , 3 h~5 h) ↓
51 : 00	震荡平板 每孔中吸出 100 μ L 加到新平板中 ↓
51 : 30	在 450 nm 测量吸光度 (参照 630 nm)

D.2.4 数据记录

原始数据文件中要记录产生的数据。以表格形式出具结果,包括试验组、阴性对照、空白对照和阳性对照组。

D.2.5 数据分析

活细胞数减少导致了样品中线粒体脱氢酶总活性降低,这直接与生成的橙色甲瓞量有关,在 450 nm 测量光密度。按式(D.1)与空白比较计算存活率下降:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{100 \times OD_{450e}}{OD_{450b}} \dots\dots\dots (D.1)$$

式中:

OD_{450e} —— 试验样品 100% 浸提液光密度平均值;

OD_{450b} —— 空白光密度平均值。

存活率较低时,试验样品潜在的细胞毒性较高。

如存活率下降到 < 空白的 70%, 则具有潜在的细胞毒性。试验样品 50% 浸提液存活率宜至少与 100% 浸提液的存活率相同或较高, 否则宜重复试验。

参 考 文 献

- [1] Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity, 2001. NIH Publication No. 01-4500 available under (http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox_docs/guidance0801/iv_guide.pdf).
- [2] Guidelines for preclinical biological evaluation of medical materials and devices. MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan) memorandum, JIMURENRAKU Iryokiki-Shinsa, 36, 2003
- [3] BORENFREUND, E. and PUERNER, J. A. Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicological Letters*, 24, pp. 119-124, 1985
- [4] United States Pharmacopeia
- [5] COECKE, S., BALLS, M., BOWE, G., DAVIS, J., CSTRANTHALER, G., HARTUNG, T., HAY, R., MERTEN, O., PRICE, A., SCHECTMAN, L., STACEY, G. and STOKES, W. Guidance on Good Cell Culture Practice, A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, 33, pp. 261-287, 2005
- [6] ISAMA, K., MATSUOKA, A., HAISHIMA, Y. and TSUCHIYA, T. Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity using fibroblast L929 and V79 cells. *Mater. Trans.*, 43, pp. 3155-3159, 2002
- [7] TSUCHIYA, T. Studies on the standardization of cytotoxicity tests and new standard reference materials useful for evaluating the safety of biomaterials. *J. Biomaterials Applications*, 5, pp. 139-157, 1994
- [8] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Methods*, 65, pp. 55-63, 1983
- [9] SCUDIERO, D. A., SHOEMAKER, R. H., PAULL, K. D., MONKS, A., TIERNEY, S., NOFZIGER, T. H., CURRENS, M. J., SENIFF, D. and BOYD, M. R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, 48, pp. 4827-4833, 1988
- [10] SPIELMANN, H. and al., Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany, *Toxicol. In Vitro*, 5, pp. 539-542, 1991
-

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准

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—2017/ISO 10993-5:2009

*

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.org.cn

服务热线:400-168-0010

2017 年 12 月第一版

*

书号: 155066 · 1-59380

版权专有 侵权必究



GB/T 16886.5-2017

中国标准出版社授权北京万方数据股份有限公司在中国境内(不含港澳台地区)推广使用