ICS 11.060.10
C 33

YY

# 中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0127.17—2014

# 口腔医疗器械生物学评价
# 第 17 部分：
# 小鼠淋巴瘤细胞(TK)基因突变试验

**Biological evaluation of medical devices used in dentistry—**
**Part 17：Mouse lymphoma cells (TK) gene mutation test**

2014-06-17 发布　　2015-07-01 实施

国家食品药品监督管理总局　发布

# 前　言

本部分是《口腔医疗器械生物学评价》系列标准中的一部分标准。

《口腔医疗器械生物学评价系列标准》中的 YY/T 0268《牙科学　口腔医疗器械生物学评价　第1单元:评价与试验》是口腔医疗器械生物学评价与试验项目的选择,为指南性标准。

——YY/T 0127 是口腔医疗器械具体生物试验方法标准,其中 YY/T 0127 共分为以下部分:

——YY/T 0127.1　口腔材料生物试验方法　溶血试验;

——YY/T 0127.2　口腔医疗器械生物学评价　第2单元:试验方法　急性全身毒性试验:静脉途径;

——YY/T 0127.3　口腔医疗器械生物学评价　第3部分:根管内应用试验;

——YY/T 0127.4　口腔医疗器械生物学评价　第2单元:口腔材料生物试验方法　骨埋植试验;

——YY/T 0127.5　口腔医疗器械生物学评价　第5部分:吸入毒性试验;

——YY/T 0127.6　口腔材料生物学评价　第2单元:口腔材料生物试验方法　显性致死试验;

——YY/T 0127.7　口腔材料生物学评价　第2单元:口腔材料生物试验方法　牙髓牙本质应用试验;

——YY/T 0127.8　口腔材料生物学评价　第2单元:口腔材料生物试验方法　皮下植入试验;

——YY/T 0127.9　口腔材料生物学评价　第2单元:口腔材料生物试验方法　细胞毒性试验:琼脂覆盖法及分子滤过法;

——YY/T 0127.10　口腔医疗器械生物学评价　第2单元:试验方法　鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames 试验);

——YY/T 0127.11　牙科学　用于口腔的医疗器械生物相容性临床前评价　第2单元:口腔材料试验方法　盖髓试验;

——YY/T 0127.12　牙科学　口腔医疗器械生物学评价　第2单元:试验方法　微核试验;

——YY/T 0127.13　口腔医疗器械生物学评价　第2单元:试验方法　口腔黏膜刺激试验;

——YY/T 0127.14　口腔医疗器械生物学评价　第2单元:试验方法　急性经口全身毒性试验;

——YY/T 0127.15　口腔医疗器械生物学评价　第2单元:试验方法　亚急性和亚慢性全身毒性试验:经口途径;

——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;

——YY/T 0127.17　口腔医疗器械生物学评价　第17部分:小鼠淋巴瘤细胞(TK)基因突变试验。

本部分为 YY/T 0127 的第17部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本标准的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不应承担识别这些专利的责任。

本部分主要参照 GB/T 16886.3—2008(ISO 10993.3:2003)中推荐的 OECD GUIDLINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS "In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test" 476:1997 方法制定。

本部分由国家食品药品监督管理总局提出。

本部分由全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会(SAC/TC 99)归口。

本部分起草单位：四川医疗器械生物材料和制品检验中心（四川大学）、国家食品药品监督管理局北大医疗器械质量监督检验中心、上海生物材料研究测试中心、深圳市医疗器械检测中心。

本部分主要起草人：梁洁、袁暾、张金、孙姣、曹苹、林红、李秋、朱蔚精、陆华、刘尧。

# 口腔医疗器械生物学评价
# 第 17 部分：
# 小鼠淋巴瘤细胞(TK)基因突变试验

## 1 范围

YY/T 0127 的本部分规定了口腔医疗器械小鼠淋巴瘤细胞(TK)基因突变试验方法，包括操作步骤、数据处理和结果判定。

本部分适用于测定口腔医疗器械的致突变性。

## 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

**突变频率 mutant frequency**

观察到的突变细胞数除以存活细胞数。

3.2

**相对总生长 relative total growth**

处理组随时间延长细胞的增长与阴性对照组的细胞增长数之比，计算为相对悬浮生长与相对存活率的乘积。

3.3

**相对悬浮生长 relative suspension growth**

表达期末处理组与阴性对照组的细胞增长数之比。

3.4

**活力 viability**

表达期后平板培养时处理组细胞集落形成效率。

3.5

**相对存活率 relative survival；RS**

处理期末平板培养时处理细胞的集落形成效率。通常用处理组与阴性对照组细胞活力的相对数表示。

## 4 仪器及试剂

### 4.1 实验室常用设备

倒置相差显微镜，细胞计数器，洁净工作台，$CO_2$ 恒温培养箱，恒温水浴箱，移液器，低温高速离心机，低温冰箱(低于－80 ℃)或液氮罐等。

### 4.2 培养基、试剂及耗材

4.2.1 生长培养基：DMEM、RPMI 1640 培养基或其他合适的培养基，加 10%灭活马血清、100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素。

4.2.2 THMG 培养基：RPMI 1640 培养基，加 10%马血清、3 μg/mL 的胸苷、5 μg/mL 的次黄嘌呤、0.1 μg/mL的氨甲蝶呤和 7.5 μg/mL 的甘氨酸。

4.2.3 THG 培养基：不含氨甲蝶呤的 THMG 培养基。

4.2.4 集落培养基：RPMI 1640 培养基，加青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL、加 20%灭活马血清。

4.2.5 阳性对照物：甲基磺酸甲酯(MMS，以含 1%DMSO 的无血清培养基配制)、环磷酰胺(CPA，以无血清培养基配制)、苯并[a]芘、3-甲基胆蒽、三氟胸苷(TFT)。

4.2.6 pH 7.2 磷酸盐缓冲液：称取 NaCl 8.5 g、KCl 0.2 g、$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.85 g(或 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 1.13 g)、$KH_2PO_4$ 0.27 g，溶于 1 000 mL 蒸馏水中，用 pH 计测定并调节至 pH 7.2。高压灭菌，冷却后冷藏保存。

4.2.7 细胞培养皿，96 孔细胞培养板，离心管等。

## 5 样品制备

### 5.1 试样制备

5.1.1 按产品说明书制备试样。按 GB/T 16886.12 的原则制备试验液或浸提液。

注：固化类材料应考虑固化后放置时间对试验结果的影响。

5.1.2 溶剂或浸提介质可选用水、生理盐水、无血清培养基等。

5.1.3 适当时，应使用两种适宜的浸提介质，一种是极性溶剂，另一种是非极性溶剂或适合于医疗器械性质和使用的液体，两种溶剂均应与试验系统相容。

注：常用的非极性溶剂，如浓度不大于 1%的 DMSO 等。

### 5.2 对照

5.2.1 阴性对照：同批号受试物的溶剂或浸提介质。

5.2.2 阳性对照：无活化系统可选择甲基磺酸甲酯(MMS，以含 1%DMSO 的无血清培养基配制)、甲磺酸乙酯(EMS)、丝裂霉素 C(MMC)；有活化系统可选择环磷酰胺(CPA，以无血清培养基配制)、苯并[a]芘、3-甲基胆蒽等。

注 1：阴性和阳性对照都应与受试物相同的试验条件下制备。

注 2：必要时还应设置空白对照。

## 6 试验方法

### 6.1 细胞系

#### 6.1.1 细胞系

本部分使用 L5178Y $tk^{+/-}$ 3.7.2C 小鼠淋巴瘤细胞。

#### 6.1.2 细胞自发突变清除

每次试验前应适时检查细胞的自发突变频率。当细胞突变频率偏高时，按下列步骤对自发突变细胞进行清除：

a) 将对数生长的细胞配制成 $2\times10^5$ 个/mL，加入 100 倍的 THMG 液，加入量为总体积的 1%。置 $CO_2$ 培养箱(含体积分数 5% $CO_2$，下同)培养 24 h；

b) 培养 24 h 后以 200 g 离心 5 min，除去上清液，加入新鲜 RPMI 1640 培养液，细胞密度调整为 $2\times10^5$ 个/mL。加入 100 倍的 THG 液，加入量为总体积的 1%。培养 45 h～48 h，注意避免过度培养；

c) 将培养后的细胞以 200 g 离心 5 min，弃去上清液，加入新鲜培养基配制成 $5\times10^4$ 个/mL～$10\times10^4$ 个/mL的细胞悬液，培养 24 h 后，取少量细胞，测定 PE 和 SMF；

d) 将清除自发突变的细胞扩增后分装于冻存管中冻存。

### 6.2 体外代谢活化系统

小鼠淋巴瘤基因突变试验应在有和无代谢活化系统的条件下，使细胞与试验物质接触。本部分使用的代谢活化系统为大鼠肝 S9 加辅助因子(制备方法参见 YY/T 0127.10)。

### 6.3 染毒剂量(细胞与受试物接触)

6.3.1 在细胞与受试物接触时，应考虑受试物对细胞毒性的影响。宜根据细胞毒性与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 20%～80%范围内设高、中、低三个剂量组。组距可选择 $2\sim\sqrt{10}$ 之间的一个值，按等比级数分组。低剂量组应无细胞毒性或略有细胞毒性。或者，对于有毒性的材料，最高剂量可选择 10%～20%相对悬浮生长(RSG)的剂量。

6.3.2 对于无细胞毒性的受试物，可采用单剂量组试验(即限度试验)，受试物的浓度为最大耐受剂量；使用浸提液试验时，为浸提原液。

### 6.4 试验步骤

#### 6.4.1 细胞培养

取冻存的细胞，接种于生长培养基内，在 37 ℃，5% $CO_2$ 饱和湿度的培养箱中作常规悬浮培养，使细胞生长至对数生长期。取对数生长期的 L5178Y $tk^{+/-}$ 3.7.2C 小鼠淋巴瘤细胞，调整细胞浓度至$10^6$ 个/mL。

#### 6.4.2 处理(受试物与细胞接触)

取对数生长期且细胞浓度为 $10^6$ 个/mL 的细胞，分别加入含有不同剂量受试物或其浸提液的新鲜集落培养基中，在有或无代谢活化系统条件下，置 37 ℃，5% $CO_2$ 饱和湿度培养箱继续培养，通常为 3 h～6 h，(可延长到 1 个或多个细胞周期)。离心，弃上清液，用 PBS 或无血清培养基洗涤细胞 1 次，重新悬浮细胞于含 20%马血清的 RPMI 1640 培养基中，并调整细胞密度为 $2\times10^5$ 个/mL。

细胞与受试物接触 3 h～6 h，若试验结果为阴性时，还应在不加 S9 条件下进行细胞与受试物接触 24 h 的试验。

#### 6.4.3 $PE_0$(0 天的平板接种效率)测定

取 6.4.2 中获得的适量细胞悬液，梯度稀释至 8 个/mL，接种于 96 孔板(每孔 0.2 mL，即平均 1.6 个/孔)，每个剂量做一块 96 孔板，于 37 ℃，5% $CO_2$ 饱和湿度下培养 12 d，计数每块平板中有集落

生长的孔数，计算 0 d 的平板接种效率($PE_0$)。

### 6.4.4 表达

步骤 6.4.2 所得的细胞悬液继续培养 2 d，每天计数细胞密度并保持密度在 $10^6$ 个/mL 以下。计算相对悬浮生长(Relative Suspension Growth，RSG)。

### 6.4.5 $PE_2$(2 d 的平板接种效率)测定

步骤 6.4.4 的第 2 天表达培养结束后，取适量细胞悬液，按步骤 6.4.3 作梯度稀释并接种于 96 孔板，培养 12 d，计数每块平板有集落生长的孔数，计算 2 d 的平板接种效率($PE_2$)。

### 6.4.6 TFT 抗性突变频率(MF)测定

步骤 6.4.4 的第 2 天表达培养结束后，取适量细胞悬液，调整细胞密度为 $1\times10^4$ 个/mL，加入三氟胸苷，终浓度为 3 μg/mL。混匀，接种于 96 孔板(每孔加 0.2 mL，即平均 2 000 个/孔)，每个剂量组作 2 块平板，37 ℃，5%$CO_2$ 饱和湿度下培养 12 d，计数有突变集落生长的孔数。突变集落按大集落(LC：直径≥1/4 孔径，密度低)和小集落(SC：直径<1/4 孔径，密度高)分别计数，极小集落可再继续培养 3 d 后计数，计算 TFT 抗性突变频率(MF)。

## 7 数据处理

### 7.1 平板效率($PE_0$ 和 $PE_2$)

$$PE=\frac{-\ln(EW/TW)}{n}\times100\% \qquad \cdots\cdots(1)$$

式中：

$PE$ ——平板效率，$PE_0$ 或 $PE_2$；

$EW$——无集落生长的孔数；

$TW$——总孔数；

$n$ ——每孔接种细胞数，此式中 $n$ 取 1.6。

### 7.2 相对存活率(RS)

$$RS=\frac{PE_s}{PE_c}\times100\% \qquad \cdots\cdots(2)$$

式中：

$RS$ ——相对存活率，$RS_0$ 或 $RS_2$；

$PE$ ——平板效率，$PE_{0s}$、$PE_{0c}$或 $PE_{2s}$、$PE_{2c}$；

$s$ ——剂量组；

$c$ ——阴性对照组。

### 7.3 TFT 抗性突变频率(MF)

$$MF=\frac{-\ln(EW/TW)/n}{PE_2} \qquad \cdots\cdots(3)$$

应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)。

式中：

$MF$ ——TFT 抗性突变频率(通常以 $10^{-6}$表示)；

$PE_2$ ——第二天的平板效率；
$EW$ ——无集落生长的孔数；
$TW$ ——总孔数；
$n$ ——每孔接种细胞数，此式中 $n$ 取 2 000。

### 7.4 相对悬浮生长(RSG)

$$RSG = \frac{Hs}{Hc} \qquad \cdots\cdots(4)$$

式中：
$RSG$ ——相对悬浮生长；
$Hs$ ——处理组表达期末(第 2 天)细胞增殖倍数；
$Hc$ ——对照组表达期末(第 2 天)细胞增殖倍数。

### 7.5 相对总生长(RTG)

$$RTG = RSG \times RS_2 \times 100\% \qquad \cdots\cdots(5)$$

式中：
$RTG$ ——相对总生长；
$RSG$ ——相对悬浮生长；
$RS_2$ ——第 2 天的相对存活率。

### 7.6 小集落突变百分率(SCM)

$$SCM = \frac{S\text{-}MF}{T\text{-}MF} \times 100\% \qquad \cdots\cdots(6)$$

式中：
$SCM$ ——小集落突变百分率；
$S\text{-}MF$ ——小集落突变频率；
$T\text{-}MF$ ——总突变频率。

## 8 结果判定

### 8.1 试验成立的条件

8.1.1 阴性对照或溶剂对照在加与不加 S9 混合物时，短时间处理(3 h～6 h)：阴性对照和溶剂对照的 $PE_0$ 和 $PE_2$ 应为 60%～120%；MF 值应在 $50\times10^{-6}$～$170\times10^{-6}$；悬浮生长(SG)应在 8～32；长时间处理(24 h)：悬浮生长(SG)应在 32～180 范围，其余的 $PE_0$ 和 $PE_2$，MF 值与短时间处理相同。否则，试验数据不可用。

8.1.2 阳性对照的总突变频率(阳性的 MF 值减去阴性对照的 MF 值)应≥$300\times10^{-6}$。其中，小集落的 MF 值至少应为 40%，即 MF 值至少应≥$120\times10^{-6}$；或阳性对照的 MF 值与受试物的浓度存在剂量相关关系。

8.1.3 满足以上条件，试验结果成立。

### 8.2 数据统计分析

选择适当的统计方法，如 $X^2$ 检验，对数据进行统计学分析，显著性水平 $\alpha=0.05$。必要时进行线型趋势分析。

### 8.3 结果的判定

8.3.1 受试物 MF 值出现剂量依赖性增高趋势，各剂量组中任意一组剂量的 MF 值≥阴性对照值 MF 值加 $100\times10^{-6}$（总体评价因子），则判定为阳性。

8.3.2 当受试物的 MF 值≥阴性对照的 MF 值再加 $100\times10^{-6}$ 时（相当于阴性对照 MF 值的 2 倍），则判定为阳性。

8.3.3 各剂量组的 MF 值若出现剂量依赖性增高趋势，若各剂量组的 MF 值或高或低，各剂量组的数据相差较大时，应重复试验。

8.3.4 仅高剂量组的 MF 值出现明显增高，则试验结果可疑。

8.3.5 若试验条件成立，试验各剂量组均未见 MF 值明显增高，即可判定为阴性。

8.3.6 若任意一剂量组统计学结果有显著性差异，即判断为阳性。若统计学结果无显著性差异，即判断为阴性。

## 参 考 文 献

[1] GB/T 16886.1—2001 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

[2] GB/T 16886.3—2008 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] GB/T 16886.12—2005 医疗器械生物学评价 第12部分:样品制备与参照样品

[4] YY/T 0127.10—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames试验)

[5] GB 15193.20—2003 TK基因突变试验

[6] 卫生部.保健食品安全性毒理学评价规范.2003.

[7] 王欣,王雪,张旻,等.小鼠淋巴瘤细胞tk基因突变试验的结果判定.中国新药杂志.2010,16:1399-1401

[8] Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals in tended for human use (current step 2 version); International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.2008

YY/T 0127.17—2014

中华人民共和国医药
行业标准
口腔医疗器械生物学评价
第17部分：
小鼠淋巴瘤细胞(TK)基因突变试验
YY/T 0127.17—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 0.75 字数 13 千字
2014年9月第一版 2014年9月第一次印刷
*
书号：155066·2-27336 定价 18.00 元

YY/T 0127.17-2014