



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1465.1—2016

医疗器械免疫原性评价方法 第 1 部分：体外 T 淋巴细胞转化试验

Immunogenic evaluation method of medical devices —
Part 1: T Lymphocyte transformation test in vitro

2016-01-26 发布

2017-01-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

YY/T 1465《医疗器械免疫原性评价方法》由下列部分组成：

——第1部分：体外T淋巴细胞转化试验；

——第2部分：血清免疫球蛋白和补体成分测定(ELISA法)。

本部分为YY/T 1465的第1部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本部分由国家食品药品监督管理总局提出。

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：国家食品药品监督管理总局济南医疗器械质量监督检验中心、四川医疗器械生物材料和制品检验中心、上海生物材料研究测试中心。

本部分起草人：刘成虎、王贤美、侯丽、袁墩、梁洁、薛旻、孙皎。

引 言

免疫应答是机体的一种重要的防御机制。医疗器械作为外源性物质,在与人体接触后,可通过多种途径影响机体的免疫系统。目前,还不清楚医疗器械或材料刺激产生的免疫应答对宿主有利还是有害,特别是针对动物源性医疗器械、同种异体器械和组织工程器械等。因此,应用医疗器械、材料组分或浸提物进行免疫应答研究来获取相关的信息是非常重要的。

GB/T 16886.20 中给出了与人体接触医疗器械可能发生的免疫反应和潜在免疫毒性反应的指南,但缺少具体的试验方法。YY/T 1465 预期为 GB/T 16886.20 的实施提供具体的试验方法。YY/T 1465 的本部分提供了体外 T 淋巴细胞转化试验的方法,为医疗器械/材料特异性激发细胞介导免疫应答潜能提供检测方法,可作为 GB/T 16886.20 中免疫毒理学试验中的一项可供选择的方法标准。其他经确认适用的方法也可以采用。

YY/T 1465 的本部分给出的 MTT 法和 CFSE 法均具有一定的局限性,试验者宜对所选用方法的适用性进行确认,必要时宜考虑结合两种方法评价试验样品对 T 淋巴细胞转化功能的影响。

医疗器械免疫原性评价方法

第1部分：体外T淋巴细胞转化试验

1 范围

本部分给出了体外T淋巴细胞转化试验的MTT法和CFSE法,适用于评价医疗器械/材料对T淋巴细胞免疫功能的影响。

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 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分:动物福利要求

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

GB/T 16886.20 医疗器械生物学评价 第20部分:医疗器械免疫毒理学试验原则与方法

3 术语和定义

GB/T 16886.1 和 GB/T 16886.20 界定的术语和定义适用于本文件。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

FCS:胎牛血清

MTT:3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐:噻唑蓝

ConA:刀豆蛋白A

DMSO:二甲基亚砷

PBS:磷酸盐缓冲液

BSA:牛血清白蛋白

CFSE:羧基荧光素乙酰乙酸

FCM:流式细胞术

PE:藻红蛋白

CD:分化抗原

5 实验动物

5.1 总则

所有的动物试验应在经国家认可机构批准并符合实验室动物福利全部适用法规的实验室内进行,

并且还应符合 GB/T 16886.2 的要求。

5.2 动物的种属和要求

常用的实验动物为小鼠。本部分中推荐使用未进行过试验的健康的 BALB/c 小鼠, SPF 级, 6 周龄~8 周龄。如选用其他品系小鼠, 宜对其适宜性进行说明。正式试验前要将动物至少饲养 5 d 以适应实验室环境。试验动物宜标明种属、品系、来源、性别、体重和周龄。试验开始时, 动物的体重差异宜控制在最小范围, 每只动物的体重不能超过同性别平均体重的 $\pm 20\%$ 。推荐至少采用 3 只小鼠。

6 样品制备

按照 GB/T 16886.12 的原则进行试验样品制备。

注: 医疗器械/材料中可能存在的免疫原多为大分子物质, 宜对所选用试验样品制备方法的有效性进行说明。

7 MTT 法

7.1 原理

MTT 为一种浅黄色的细胞染料, 进入活细胞的 MTT 在线粒体中琥珀酸脱氢酶的作用下会形成不溶于水的蓝紫色结晶甲臜颗粒并沉积在细胞中, 将细胞中的甲臜溶解并用酶联免疫检测仪测定其吸光度值, 可间接反映活细胞的数量和/或代谢活性。淋巴细胞在受到抗原或丝裂原刺激时, 可发生特异性或非特异性免疫应答并发生增殖分化, 细胞的数量或代谢活性会增加。通过 MTT 染料检测淋巴细胞增殖能力, 即可反映医疗器械/材料中免疫原对淋巴细胞免疫功能的影响。

注 1: MTT 是一种常用的检测细胞增殖的染色标志物。其他适宜的染色标志物如 BrdU、MTS 和 CCK-8 等也可使用。 $^3\text{H-TdR}$ 是一种敏感性较高的检测细胞增殖的标志物, 但实验室应有使用放射性材料的资质并且试验人员经过相应的培训并取得合格证书。

注 2: 本方法适用于体外检测 T 淋巴细胞的增殖, 不排除其他种类细胞亚群的增殖对本实验结果的干扰。

7.2 淋巴细胞制备

脱颈椎处死 BALB/c 小鼠, 无菌取脾, 研磨制备单细胞悬液, 收集细胞悬液, $400g$ 离心 5 min , 弃上清, 加 5 mL 红细胞裂解液, 混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min , 加入含 $10\%\text{ FCS}$ 的 RPMI1640 培养液终止反应, $400g$ 离心 5 min , 弃上清, 加入含 $10\%\text{ FCS}$ 的 RPMI1640 培养液调整细胞浓度至 2×10^6 个细胞/ mL 。

7.3 试验分组

- a) 细胞培养液对照组(空白对照);
- b) 阴性对照组(细胞对照);
- c) 阳性对照组(细胞+ConA, $5\text{ }\mu\text{g/mL}$);
- d) 试验组: 细胞+适宜浓度的抗原(材料或浸提液)。

注: 对医疗器械/材料或其浸提液进行梯度稀释有助于得出免疫应答的剂量-效应关系, 推荐采用不同剂量组进行试验。

7.4 试验步骤

将细胞悬液加入 96 孔板, 每孔 $200\text{ }\mu\text{L}$, 设 6 个复孔。阳性对照组加入 ConA 至终浓度为 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

试验平板在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养至少 3 d¹⁾ 后取出, 600g 离心 5 min, 弃上清, 加入 MTT (1 mg/mL), 50 μL/孔, 继续培养 6 h, 加入 DMSO, 150 μL/孔, 振荡平板至甲臜颗粒完全溶解, 在酶标仪上于 570 nm 波长处测吸光度值(A), 参照波长为 630 nm。

7.5 数据分析

记录各组吸光度 A, 应用适宜的统计学方法处理试验结果。应用丝裂原确认试验系统是否正常工作, 同时也可比较细胞对抗原和丝裂原的免疫应答。

8 CFSE 法

8.1 原理

羧基荧光素乙酰乙酸(CFSE)是一种可穿透活细胞膜并不可逆地与细胞内蛋白质结合的活体荧光染料。当细胞分裂时, CFSE 标记荧光可平均分配至两个子代细胞中, 其荧光强度是亲代细胞的一半。因此, 在一个增殖的细胞群中, 各个连续细胞代的荧光强度呈 2 倍递减。将 CFSE 标记的淋巴细胞通过流式细胞术进行分析, 可以快速准确地检测特定亚群淋巴细胞的转化增殖情况。

8.2 试验步骤

8.2.1 按 7.2 无菌制备小鼠脾脏淋巴细胞悬液, 用 PBS 至少洗 2 次, 弃上清, 用 2 mL 含 0.1% BSA 的 PBS 重悬细胞, 分别加入 CFSE, 终浓度为 5 μM, 混匀。37℃ 避光孵育 15 min~30 min。

8.2.2 加入 3 mL 预冷的含 2% FCS 的 RPMI1640 培养液终止染色反应, 轻轻混匀, 冰上放置 5 min 后 400g 离心 5 min, 弃上清, 加入含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液 2 mL, 混匀。

8.2.3 按 7.3 试验分组将细胞悬液加入 24 孔板, 1 mL/孔, 每组设 3 个复孔。阳性对照组加入 ConA 至终浓度为 5 μg/mL。试验平板在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养至少 3 d²⁾。

8.2.4 收集各孔细胞, 用 PE 标记的抗小鼠 CD3 单克隆抗体在 4℃ 避光条件下孵育 30 min 后, 应用流式细胞术进行分析。

注: 可选择相应的流式抗体来分析特定亚群的淋巴细胞。

8.3 数据分析

采用平均荧光强度结合增殖细胞百分比来记录试验结果, 应用适宜的统计学方法处理试验结果。

9 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;
- c) 试验动物的种属、品系、周龄和体重;
- d) 试验条件和试验步骤;
- e) 试验结果;
- f) 结果评价;
- g) 结论。

1) 培养的天数宜根据材料的特性、文献报道及预实验结果确定。

2) 培养的天数宜根据材料的特性、文献报道及预实验结果确定。

参 考 文 献

- [1] ASTM F1906. Standard Practice for Evaluation of Immune Responses. In Biocompatibility Testing Using ELISA Tests, Lymphocyte Proliferation, Cell Migration
 - [2] Burleson, GR, Dean JH, Munson AE. Methods in Immunotoxicology. Wiley-Liss, New York, 1995
 - [3] Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Current Protocols in Immunology. NY, John Wiley, 1992
 - [4] Price, CP, Newman DJ. Principles and Practice of Immunoassay. Stockton Press, NY, 1991
 - [5] Wild D. The Immunoassay Handbook. Stockton Press, 1994
-