



# 中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0870.3—2019  
代替 YY/T 0870.3—2013

---

## 医疗器械遗传毒性试验 第3部分:用小鼠 淋巴瘤细胞进行的 TK 基因突变试验

Test for genotoxicity of medical devices—  
Part 3: TK gene mutation test using mouse lymphoma cells

2019-07-24 发布

2020-08-01 实施

---

国家药品监督管理局 发布



## 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3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 0870.3—2013《医疗器械遗传毒性试验 第3部分：用小鼠淋巴瘤细胞进行的体外哺乳动物细胞基因突变试验》，与 YY/T 0870.3—2013 相比，除编辑性修改外主要技术变化如下：

- 标准名称修改为《医疗器械遗传毒性试验 第3部分：用小鼠淋巴瘤细胞进行的 TK 基因突变试验》；
- 增加了术语：克隆效率(见 3.1)；染色体断裂剂(见 3.2)；移码突变剂(见 3.4)；有丝分裂重组(见 3.5)；突变(见 3.6)；表型表达时间(见 3.8)；悬浮生长(见 3.10)；相对悬浮生长率(见 3.11)；相对总生长(见 3.12)；S9 肝匀浆(见 3.13)；S9 混合物(见 3.14)；未处理对照(见 3.15)；
- 增加了对 S9 的注释(见第 5 章)；
- 修改了对细胞系的相关要求(见 6.1)；
- 修改了细胞自发突变清除的相关步骤(见 6.2)；
- 修改了支原体污染检测的相关要求(见 6.3)；
- 修改了核型稳定性检测的相关要求(见 6.4)；
- 增加了阳性对照的选择原则(见 9.2)；
- 增加了“未处理对照”(见 9.3)；
- 增加了预实验的概述(见 10.1.1)；
- 修改了“接触处理”的相关步骤(见 10.1.2)；
- 修改了“0 天的平板接种效率(PE<sub>0</sub> 平板)”，将平板培养时间改为 10 d~12 d(见 10.1.3)；
- 修改了平板培养时间，改为 10 d~12 d(见 10.2.3.3)；
- 增加了“相对悬浮生长率”(RSG)(见 11.3)；
- 增加了“相关总生长(RTG)”(见 11.4)；
- 删除了“式(4)小集落突变率”(见 11.4)；
- 增加了“实验室能力”(见 12)；
- 增加了“历史对照数据”(见 13)；
- 增加了“阴性判断标准”(见 14.1)；
- 增加了“阳性判断标准”(见 14.2)；
- 增加了“结果评价”(见 15)；
- 增加了背景知识(见附录 A)。

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、中国食品药品检定研究院。

本部分主要起草人：孙令骁、王国伟、韩倩倩、史建峰。

本部分所替代标准的历次版本发布情况为：

——YY/T 0870.3—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《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而成,同时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 的本部分参照 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 490(2016)《用 TK 基因进行的体外哺乳动物细胞基因突变试验》并结合医疗器械/材料自身特点制定,即在有和无代谢活化系统的情况下,通过医疗器械/材料诱导小鼠淋巴瘤细胞(L5178Y TK<sup>+</sup>/3.7.2C)基因正向突变情况,来评价试验样品潜在的致突变性。

本部分中根据在培养液中的生长能力和自发突变率是否稳定选择细胞。体外进行的试验通常都需要用外源性代谢活化系统。但外源性代谢活化系统并不能完全模拟哺乳动物体内的代谢条件。pH 和渗透压的改变或受试样品的细胞毒性较高等可导致假阳性结果,从而使试验结果无法反应体内基因突变的真实情况。OECD 中关于 TK 基因突变试验的背景知识参见附录 A。



## 医疗器械遗传毒性试验 第3部分:用小鼠 淋巴瘤细胞进行的 TK 基因突变试验

### 1 范围

YY/T 0870 的本部分规定了使用小鼠淋巴瘤细胞系(L5178Y TK<sup>+/−</sup> 3.7.2C)进行医疗器械/材料体外哺乳动物细胞基因突变试验的方法。

本部分适用于采用微孔板法,使用小鼠淋巴瘤细胞系(L5178Y TK<sup>+/−</sup> 3.7.2C)进行 TK 基因突变试验,采用相对存活率(RS)和相对总生长(RTG)两种指标来评估细胞毒性的方法。

注 1: 口腔材料的体外哺乳动物细胞基因突变试验见 YY/T 0127.17。

注 2: 纳米材料的体外哺乳动物细胞基因突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

**克隆效率 cloning efficiency**

低密度下接种的细胞长成可计数的集落的百分比。

#### 3.2

**染色体断裂剂 clastogen**

任何能引起细胞或生物体的染色体结构畸变的物质。

#### 3.3

**正向突变 forward mutation**

从原型(野生型)转变至突变型的基因突变,可引起酶活性和编码蛋白的改变和丢失。

#### 3.4

**移码突变剂 frameshift mutagens**

能引起 DNA 分子中单个或多个碱基对的增加或减少的物质。

#### 3.5

**有丝分裂重组 mitotic recombination**

在有丝分裂过程中,同源染色单体之间的重组可能诱导 DNA 双链断裂或杂合性缺失。

3.6

**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。

3.7

**突变频率 mutant frequency(MF)**

观察到的突变体细胞与活细胞的数目之比值。

3.8

**表型表达时间 phenotypic expression time**

从处理期结束以后,细胞内基因组水平遗传物质改变,而先前存在的基因产物都被耗尽最终导致表型改变的时间过程。

3.9

**相对存活率 relative survival(RS)**

处理结束后,接种的处理细胞形成集落的能力(平板效率),通常以试验组与阴性对照组的平板效率比值表示。

3.10

**悬浮生长 suspension growth(SG)**

在试验过程中的处理期和表型表达期内细胞的增殖倍数。对于短期接触(4 h)悬浮生长是第一天的增殖倍数乘以第二天的增殖倍数。如果进行长期接触(24 h),悬浮生长是处理期内细胞的增殖倍数乘以表达期第一天和第二天细胞的增殖倍数。

3.11

**相对悬浮生长率 relative suspension growth(RSG)**

试验组与阴性对照组/未处理对照组总的两天的悬浮生长的比值,包括处理期内试验组与阴性对照组/未处理对照组相对生长率的比值。

3.12

**相对总生长 relative total growth(RTG)**

衡量试验组细胞毒性的指标,是试验组在试验的处理期、两天的表达期和突变体筛选克隆期内(相对于阴性对照组)相对生长率的衡量指标。

3.13

**S9 肝匀浆 S9 liver fractions**

9 000 r/min 离心后的肝匀浆上层液体,即新鲜肝脏提取物。

3.14

**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。

3.15

**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<sub>2</sub> 培养箱、恒温水浴箱、恒温振荡器、倒置显微镜、光学显微镜、压力蒸汽灭菌器等。

注:本部分推荐的试验方法为微孔板法。



## 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 B 的规定或购买市售商品。培养液和试剂参见附录 C 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

### 6.1 细胞系

使用小鼠淋巴瘤细胞系(L5178Y TK<sup>+/−</sup>−3.7.2C)。鉴于细胞性状稳定性要求, 试验细胞系最好新取自冻存细胞。细胞在 35 °C~38 °C 培养, 增殖周期为 10 h 左右。实验室宜测定细胞周期时间, 并与公开发表的细胞特征相一致。经过传代培养后, 细胞呈对数生长状态, 细胞持续培养最多不超过 3 个月。

### 6.2 细胞自发突变清除

6.2.1 宜适时检查冻存细胞的自发突变频率。一般试验细胞系的平均自发突变频率为  $50 \times 10^{-6} \sim 170 \times 10^{-6}$ 。当细胞突变频率偏高时, 按 6.2.2~6.2.4 对自发突变细胞进行清除。

6.2.2 将对数生长的细胞配制成  $2 \times 10^5$  个/mL, 加入 100 倍的 THMG 液, 加入量为总体积的 1%。置 CO<sub>2</sub> 培养箱(含 CO<sub>2</sub> 体积分数 5%)培养 24 h;

6.2.3 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, 细胞浓度调整为  $2 \times 10^5$  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;

6.2.4 将培养后的细胞以 200 g 离心 5 min, 除去上清液后加入培养液直接使用或加入冻存液, 细胞浓度调整为  $2 \times 10^5$  个/mL~ $5 \times 10^6$  个/mL。分装于冻存管中冻存。

### 6.3 支原体污染检测

宜对新购买细胞或冻存细胞之前进行支原体的检测, 以保证细胞无支原体的污染。

### 6.4 核型稳定性检测

宜通过检测平均染色体数目来判断核型稳定性, 通常对新购买细胞或冻存细胞之前进行, 以保证细胞没有发生核型的变化。

## 7 试验前准备

### 7.1 器具灭菌

与试验和对照样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 °C 30 min, 或置电热干燥箱内 160 °C 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—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(如乙醇或丙酮),则应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诱变剂的能力和测试外源性代谢活化系统的有效性(如适用),以及能充分检测大/小集落的 TK 突变体。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。

阳性对照细胞毒性的上限应该与试验组相同,即相对存活率(或相对总生长)不能低于 10%。可使用一个浓度(或者系列浓度中的一个浓度)的试验结果来证明已经满足阳性对照的可接受标准。而且,阳性对照的 MF 值必须在实验室已经建立的可接受范围内。

表 1 阳性对照物质举例

| 代谢活化条件     | 阳性对照物                                               | CASRN     |
|------------|-----------------------------------------------------|-----------|
| 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   |
| 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   |
|            | 环磷酰胺一水化合物<br>(cyclophosphamide monohydrate)         | 6055-19-2 |
|            | 7,12-二甲苯蒽<br>[7,12-dimethylbenz(a)anthracene, DMBA] | 57-97-6   |
|            | 3-甲基胆蒽(3-methylcholanthrene)                        | 56-49-5   |

### 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,还需设置未处理对照。

## 10 试验步骤

### 10.1 预试验(如怀疑试验样品可能对本试验细胞系产生毒性作用时)

#### 10.1.1 概述

应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。如果测试物使培养液的 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。

当怀疑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,最高的试验浓度为相对存活率(或相对总生长)在 10%~20% 的浓度,梯度稀释宜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。

#### 10.1.2 接触处理

以 0.9%氯化钠注射液作为浸提介质为例,取生长良好的细胞,建议调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL (以保证细胞终浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL)。无活化系统组取 10 mL 细胞悬液与 2 mL 试验或对照样品以及 1 mL PBS 混合,加入含血清培养基至终体积为 20 mL;有活化系统组取 10 mL 细胞悬液,加入 2 mL 试验或对照样品以及 S9 混合液 1 mL,加入含血清培养基至终体积为 20 mL。将上述各种混合液置于 37 °C 振荡培养 4 h,振荡频率为 70 r/min~80 r/min。

注:若无活化系统组在接触 4 h 后结果为阴性,宜延长至 24 h。

#### 10.1.3 0 d 的平板接种效率( $PE_0$ )平板

将 10.1.2 混合液以 200 g 离心 5 min,去除上清液,用无血清 RPMI 1640 培养基洗涤细胞两次,用含 20% 血清的 RPMI 1640 培养基梯度稀释至细胞数量为 8 个/mL,接种 96 孔板,每孔加 0.2 mL (即每孔平均细胞接种数为 1.6 个)。每种剂量接种两块平板。将平板放置于 CO<sub>2</sub> 培养箱 37 °C 培养 10 d~12 d。

#### 10.1.4 集落计数

目视或在显微镜及其他适宜用具下观察计数各平板无集落生长的孔数。

#### 10.1.5 数据处理

按 11.1~11.5 中的式(1)、式(2)、式(3)、式(4)、式(5)计算 PE、RS 或 RTG。

### 10.2 主试验

#### 10.2.1 接触处理

同 10.1.2。

#### 10.2.2 表达

将上述各种混合液以 200 g 离心 5 min,去除上清液,用无血清 RPMI 1640 培养基洗涤细胞两次。

重新悬浮于含 10% 血清的 RPMI 1640 培养基中,建议调整细胞浓度为  $3 \times 10^5$  个/mL,37℃ 培养 2 d。于 24 h 时检查细胞浓度并调整为  $3 \times 10^5$  个/mL。

10.2.3 平板制备

按下列方法制备各组微孔平板。

10.2.3.1 第 1 天的平板接种效率( $PE_0$ ):取 10.2.1 接触处理后离心重悬的细胞悬液,用含 20% 血清的 RPMI 1640 培养基梯度稀释至细胞数量为 8 个/mL,接种 96 孔板,每孔加 0.2 mL(即每孔平均细胞接种数为 1.6 个)。每种剂量接种两块平板。

10.2.3.2 第 2 天的平板接种效率( $PE_2$ ):第 2 天表达培养结束后,取适量细胞悬液,按 10.2.3.1 所述方法接种 96 孔板,每种剂量接种两块平板。

10.2.3.3 TFT 拮抗平板:第 2 天表达培养结束后,取适量细胞悬液,用含 20% 血清的 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度为  $1 \times 10^4$  个/mL,加入 TFT(三氟胸苷,终浓度为 3  $\mu$ g/mL),混匀,接种 96 孔板,每孔加 0.2 mL(即每孔平均细胞接种数为 2 000 个)。每种剂量接种两块平板。将全部平板放置于 CO<sub>2</sub> 培养箱 37℃ 培养 10 d~12 d。

10.2.4 集落计数

目视或在显微镜及其他适宜用具下观察计数各平板无集落生长的孔数。若试验组结果为阳性,宜至少记录最高浓度阳性组以及阴性对照和阳性对照的大小集落数。若试验组结果为阴性,宜记录阴性对照和阳性对照的大小集落数。突变集落按大集落(LC:直径 $\geq 1/4$ 孔径,呈薄层分布,密度低)和小集落(SC:直径 $< 1/4$ 孔径,呈块状,密度高)分别计数,极小集落可再继续培养 3 d 后计数。

11 数据处理

11.1 平板效率( $PE_0$  和  $PE_2$ )

按式(1)分别计算  $PE_0$  和  $PE_2$ 。

$$PE = \frac{-\ln(EW/TW)}{1.6} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中:  
PE ——平板效率, $PE_0$  或  $PE_2$ ;  
EW ——无集落生长的孔数;  
TW ——平板总孔数;  
1.6 ——每孔接种细胞数。

11.2 相对存活率(RS)

按式(2)计算相对存活率。

$$RS = \frac{PE_a}{PE_b} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中:  
RS ——相对存活率, $RS_0$  或  $RS_2$ ;  
 $PE_a$  ——试验样品组平板效率;  
 $PE_b$  ——阴性对照组平板效率。

11.3 相对悬浮生长率(RSG)

按式(3)计算相对悬浮生长率。

$$RSG = \frac{SG_{1(a)} \times SG_{2(a)}}{SG_{1(b)} \times SG_{2(b)}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

$SG_{1(a)}$ ——表达期第一天试验组细胞增殖倍数;

$SG_{2(a)}$ ——表达期第二天试验组细胞增殖倍数;

$SG_{1(b)}$ ——表达期第一天对照组细胞增殖倍数;

$SG_{2(b)}$ ——表达期第二天对照组细胞增殖倍数。

注: 如果进行长期接触(24 h), 悬浮生长是处理期内细胞的增殖倍数乘以表达期第一天和第二天细胞的增殖倍数。

#### 11.4 相对总生长(RTG)

按式(4)计算相对总生长。

$$RTG = RSG \times RS_2 \times 100\% \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

RSG——相对悬浮生长;

$RS_2$ ——第2天的相对存活率。

#### 11.5 TFT 抗性突变频率(MF)

按式(5)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)。

$$MF = \frac{-\ln(EW/TW)/N}{PE_2} \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中:

MF——TFT 抗性突变频率,  $\times 10^{-6}$ ;

EW——无集落生长的孔数;

TW——平板总孔数;

N——每孔接种细胞数, 2 000;

$PE_2$ ——第2天的平板接种效率。

注: 当计算 L-MF 和 S-MF 时, EW 分别指无大集落生长和无小集落生长的孔数。

### 12 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。

在无代谢活化的情况下, 应用短期和长期接触选择阳性对照物质, 并在有代谢活化系统的情况下进行短期接触, 以证明实验室具有检测诱变剂的能力并确定代谢活化系统的有效性, 证明在处理期、表型表达期和突变体筛选期细胞生长条件和计数程序的适用性。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。

### 13 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, 阴性对照宜与已发布的对照数据(若有)一致。随着更多

的试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,并显示该方法在实验室内“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组最好是平行处理组细胞的突变频率。阴性对照应理想地在历史阴性对照数据库分布的 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是“处于控制范围内”,并且没有技术或人为失败,那么就可以将其纳入历史对照分布中。

## 14 结果判定

### 14.1 阴性判断标准

阴性对照的  $PE_0$  和  $PE_2$  为 65%~120%,突变频率 MF 值应在  $50 \times 10^{-6} \sim 170 \times 10^{-6}$ ,或在各实验室历史数据范围内,而且阴性对照的 T-MF 小于本实验室历史记录的 2 倍。

当采用 RTG 作为细胞毒性衡量指标时,短期处理(3 h~4 h)的悬浮生长应在 8 倍~32 倍,长期处理(24 h)的悬浮生长应在 32 倍~180 倍。

### 14.2 阳性判断标准

阳性对照应满足以下两个标准中至少一个标准则试验有效,否则应重新试验:

- 阳性对照 T-MF 与阴性对照有显著差异,比阴性对照高  $300 \times 10^{-6}$  以上,其中,阳性对照的小集落突变频率应占 40%以上,即阳性对照的小集落突变频率减去阴性对照的小集落突变频率应  $\geq 120 \times 10^{-6}$ 。
- 阳性对照的小集落突变频率比阴性对照高  $150 \times 10^{-6}$  以上。

## 15 结果评价

- 在试验成立的前提下,试验样品各剂量组 T-MF 出现有统计学意义的剂量反应性增长或至少有一个剂量组 T-MF 与阴性对照有显著差异,且超过总评价因子(global evaluation factor, GEF)(微孔法为  $126 \times 10^{-6}$ )以上并具重现性,为阳性结果。

注:总评价因子(global evaluation factor, GEF)(微孔法为  $126 \times 10^{-6}$ )是遗传毒性试验国际工作会议(IWGT)依据实验室间收集的数据分析推荐的。

- 在试验成立的前提下,试验样品各剂量组 T-MF 没有出现有统计学意义的剂量反应性增长或有剂量组 T-MF 与阴性对照相比有增加但小于  $126 \times 10^{-6}$ ,该试验为阴性结果。
- 如果只在细胞的相对存活率(或相对总生长)为 10%~20%时才出现阳性结果时,则试验结果可疑,应在解释试验结果时慎重,如果只在细胞的相对存活率(或相对总生长)低于 10%时才出现 T-MF 显著增加,那么该结果不认为是阳性结果。
- 如果没有剂量组的细胞相对存活率(或相对总生长)在 10%~20%之间,那么当(1)一系列相对存活率(或相对总生长)在 20%~100%的剂量组且至少有一个剂量组的相对存活率(或相对总生长)在 20%~25%之间均无致突变性(无剂量反应性增长,与阴性或者历史对照数据相比无突变频率 MF 值无显著增加)时,或(2)一系列相对存活率(或相对总生长)在 25%~100%的剂量组无致突变性,且在相对存活率(或相对总生长)略低于 10%时有一个剂量组呈阴性时,试验结果为阴性。

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。

## 16 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,实验室使用史;
  - 细胞系的细胞培养方法;
  - 细胞倍增时间。
- d) 试验条件:
  - 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<sub>2</sub> 体积分数和湿度水平;
  - 培养温度;
  - 培养时间;
  - 接触时间;
  - 接种时细胞密度;
  - 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;
  - 表达期时间(包括接种的细胞数量,细胞传代和接种程序,适用时);
  - 选择培养基的确认和浓度;
  - 试验方法种类(软琼脂法或微孔板法);
  - 活细胞和突变体细胞的计数方法;
  - 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);
  - 接板后的培养时间;
  - 集落的尺寸和类型的定义(包括小集落和大集落的判定标准);
  - 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:
  - 处理时的细胞数量;
  - 细胞毒性的测定结果,如 RS(适用时);
  - 选择培养基和非选择培养基中接板的细胞数量;
  - 非选择培养基中的集落数目,选择培养基中抗性集落的数目和相关突变频率;
  - 阴性和阳性对照以及至少一个浓度的试验样品阳性结果(若有)的集落尺寸和相关变异

- 频率；
- 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(适用时)；
- f) 结果的讨论；
- g) 结论。



## 附录 A

### (资料性附录)

### 背景知识

体外哺乳动物细胞基因突变试验的目的是检测由医疗器械中所含有的化学物质诱导的基因突变。试验中使用的细胞系能检测在特异性的内源性胸苷激酶基因(TK)中发生的正向突变。本部分使用细胞系 L5178Y TK<sup>+/−</sup>—3.7.2C 小鼠淋巴瘤细胞系(通常称为 L5178Y, ATCC<sup>®</sup> CRL-9518<sup>™</sup>)。

胸苷激酶基因常染色体的杂合性能够使得在 TK<sup>+/−</sup> 突变到 TK<sup>−/−</sup> 后缺乏胸苷激酶的细胞以可见集落的形式存在。这可能是影响 TK 基因的遗传事件所造成的,包括基因突变(点突变,移码突变,小缺失等)和染色体事件(大缺失,染色体重排和有丝分裂重组),后者一般是肿瘤抑制基因在人类肿瘤产生中的常见遗传变化,表现为杂合性的缺失。理论上携带 TK 基因的整个染色体的缺失是由于纺锤体的损伤和/或有丝分裂不分离造成的,这可以在小鼠淋巴瘤试验(MLA)中得到检测。事实上,细胞遗传学和分子学综合分析清楚的表明一些 MLA 的 TK 突变体是由于染色体不分离造成的。然而,有证据表明当采用标准细胞毒性准则时(本部分所述),TK 基因突变试验不能有效地检测非整倍体剂,因此,这些试验不适用于检测非整倍体剂。

在 TK 基因突变检测中,产生了两种不同表型的 TK 突变体;正常生长的突变体即生长速度与 TK 杂合的细胞生长速度相同和缓慢生长的突变体,其细胞倍增时间会延长。正常生长的和缓慢生长的突变体在 MLA 中被认为是大集落和小集落。缓慢生长的突变体受到了包括在 TK 位点附近的假定生长调节基因在内的基因损伤,从而导致倍增时间延长,成为小集落。缓慢生长突变体的诱导物质与在染色体水平上诱导染色体发生结构变化的物质有关系。正常生长的突变体在 TK 位点附近的假定生长调节基因没有受到损伤,从而使突变体以与亲本细胞相似的速度进行生长,成为正常生长的突变体。与大部分正常生长突变体的诱导物质有关的物质主要是点突变剂。因此,有必要计数缓慢生长和正常生长的突变体以便重新得到所有的突变体,同时也能提供一些对于由特殊试验物质所诱导的损伤类型(突变剂对断裂剂)的认识。

在试验中应注意避免可能导致人为阳性结果的条件(也就是可能与试验系统的相互作用),也就是阳性结果不是因为试验物质和细胞的遗传物质发生相互作用的结果;这些条件包括 pH 或者渗透压的改变,与培养液成分发生相互作用,或细胞毒性过高。对于 MLA 试验如果细胞毒性超过了推荐的最高细胞毒性则认为细胞毒性是过度的。另外,如果试验物质是胸苷类似物或者药理作用与胸苷类似物相似,那么就会在细胞处理阶段通过自发突变的突变体选择性生长增加突变频率,这就需要额外的试验方法来进行充分的评估。

突变体的细胞由于 TK<sup>+/−</sup> 突变成 TK<sup>−/−</sup> 从而缺乏胸苷激酶活性,对于嘧啶类似物三氟胸苷(TFT)的细胞生长抑制作用具有抗性,具有胸苷激酶基因的细胞对 TFT 比较敏感,导致细胞的代谢受到抑制从而停止进一步的细胞分裂。因此,突变体细胞能够在加入 TFT 后继续分裂形成可见的集落,而含有 TK 激酶的细胞则不会。

悬液中的细胞在有/无外源代谢活化系统的情况下与样品接触,一段合适的时间后再次培养以确定细胞毒性和突变体筛选前的表型表达。细胞毒性是由 MLA 试验中的相对存活率(或相对总生长)来决定的。处理后的培养物在生长培养液中保持一段充足的时间,以允许接近最佳诱导突变的表型进行表达。在表型表达后,突变频率为在含有选择剂的培养基中接种已知数目的细胞来检测突变体克隆数确定,在不含有选择剂的培养基中测定克隆效率(活力)。经过合适的孵育时间后进行集落计数,突变频率是基于突变体集落数目进行计算的并且通过突变体筛选时的克隆效率进行校正。

由于 MLA 试验是使用 L5178Y 细胞系的 TK<sup>+/−</sup>—3.7.2C 亚株来表征的,这个特定的细胞亚株必须应用于 MLA 试验。L5178Y 细胞系来源于用甲基胆蒽诱导的 DBA-2 小鼠的胸腺淋巴瘤。Clive 和

他的同事用乙基甲磺酸盐处理 L5178Y 细胞(被 Clive 命名为  $TK^{+/+}-3$ ),使用溴脱氧尿苷作为选择剂分理出一个  $TK^{-/-}$ (命名为  $TK^{-/-}-3.7$ )。一个产生自发突变的  $TK^{+/-}$  克隆(命名为  $TK^{+/-}-3.7.2$ )和一个亚克隆(命名为  $TK^{+/-}-3.7.2C$ )从  $TK^{-/-}$  克隆中被分离出来,被特征性的应用于 MLA 试验中。细胞系的核型已经公布。标准的染色体数目是 40 条。有一条中心染色体(t12;13)应该被认为是一条染色体。小鼠的 TK 基因位点位于第 11 号染色体的末端。L5178Y $TK^{+/-}-3.7.2C$  细胞系在 P53 等位基因处有突变,并产生突变型 p53 蛋白。 $TK^{+/-}-3.7.2C$  细胞系的 p53 状态可能是这个细胞系能检测染色体大范围损伤的原因。

**附录 B**  
(资料性附录)  
**S9 和 S9 混合液制备**

**B.1 大鼠肝 S9 液**

**B.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  $\beta$ -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  $\beta$ -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。

**B.1.2** 第 5 d 用颈动脉放血法处死动物,打开腹腔,用 20 mL 新鲜冷至 4 °C 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 °C)。

**B.1.3** 将制成的肝匀浆在低温(0 °C~4 °C)高速离心机上,以 9 000 g 离心 10 min,吸出上清液为肝 S9 液。

**B.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 °C 低温保存,保存期不超过 1 年。

**B.2 S9 混合液辅助因子**

**B.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 °C 保存。

**B.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 °C 保存。

**B.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 °C 保存。

**B.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 °C 以下)。

**B.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 °C 以下)。

**B.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 C**  
(资料性附录)  
**试剂和培养液制备**

**C.1 磷酸盐缓冲液**

|                                                               |        |
|---------------------------------------------------------------|--------|
| NaCl                                                          | 8.5 g  |
| KCl                                                           | 0.2 g  |
| 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) | 2.85 g |
| 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )                             | 0.27 g |

溶于 1 000 mL 蒸馏水中,调 pH 为 7.4,0.103 MPa 20 min 灭菌或滤菌。4 ℃ 保存。

**C.2 二甲基亚砜(DMSO)**

光谱纯。

**C.3 THG 溶液(100 倍)**

|        |       |
|--------|-------|
| 胸腺嘧啶核苷 | 30 mg |
| 次黄嘌呤   | 50 mg |
| 甘氨酸    | 75 mg |

以上成分用 100 mL 无血清 RPMI 1640 培养基溶解后过滤除菌,−20 ℃ 保存。

**C.4 THMG 溶液(100 倍)**

按下列步骤配制:

- a) 配制氨甲喋呤溶液(1 000 倍):向避光的容器中加入 3.0 mg 氨甲喋呤、19.45 mL 9 g/L 的氯化钠溶液、1 mol/L 氢氧化钠溶液 0.35 mL,溶解后加入 1 mol/L 盐酸溶液 0.2 mL;
- b) 配制 THMG 溶液(100 倍):取上述氨甲喋呤溶液 0.55 mL,加入按 C.1.3 制备的 THG 溶液(100 倍)4.95 mL。过滤除菌。

### 参 考 文 献

- [1] 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
  - [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 490(2016) 用 TK 基因进行的体外哺乳动物细胞基因突变试验
-

