ICS 11.060.10
C 33

YY

# 中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0127.12—2008

# 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

**Dentistry—Biological evaluation of medical devices used in dentistry Part 2:Test method—Micronucleus test**

2008-04-25 发布　　2009-06-01 实施

国家食品药品监督管理局　发布

数码防伪

中华人民共和国医药
行业标准
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 0127.12—2008
*
中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045
网址 www.spc.net.cn
电话:68523946 68517548
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 0.5 字数 8千字
2008年11月第一版 2008年11月第一次印刷
*
书号:155066·2-19187 定价 10.00 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)68533533

# 前　言

《口腔材料生物学评价》第2单元，共分为如下几部分：

——YY/T 0127.1—1993　口腔材料生物试验方法　溶血试验

——YY/T 0127.2—1993　口腔材料生物试验方法　静脉注射急性全身毒性试验

——YY/T 0127.3—1998　口腔材料生物学评价　第2单元：口腔材料生物试验方法　根管内应用试验

——YY/T 0127.4—1998　口腔材料生物学评价　第2单元：口腔材料生物试验方法　骨埋植试验

——YY/T 0127.5—1999　口腔材料生物学评价　第2单元：口腔材料生物试验方法　吸入毒性试验

——YY/T 0127.6—1998　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—2001　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—2001　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—2001　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—2001　口腔材料生物学评价　第2单元：口腔材料生物试验方法　鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames试验)

——YY/T 0127.11—2001　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：口腔材料生物试验方法　盖髓试验

——YY/T 0127.12—2007　牙科学　口腔医疗器械生物学评价　第2单元：微核试验

——YY/T 0279—1995　口腔材料生物试验方法　口腔粘膜刺激试验

——YY/T 0244—1996　口腔材料生物试验方法　短期全身毒性试验：经口途径

本部分为YY/T 0127的第12部分。

本部分是口腔医疗器械生物学评价系列标准生物试验方法中遗传毒性试验的具体试验方法之一。

本部分主要依据ISO 10993.3：2003《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》中推荐的OECD 474的方法，并参考我国GB/T 15193.5—2003《食品安全性毒理学评价程序和方法》而制定。

OECD 474“骨髓细胞微核试验”的适用范围是化学物质。GB/T 15193.5—2003的适用范围是食品。由于大多数医疗器械/口腔材料是不溶性的，试验主要以浸提液为试验物质。因此本标准试验剂量水平的选择和采样时间与上述标准不同。

本标准由国家食品药品监督管理局提出。

本标准由全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会归口。

本标准负责起草单位：四川医疗器械生物材料和制品检验中心。

本标准参加起草单位：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。

本标准主要起草人：四川医疗器械生物材料和制品检验中心：朱蔚精、谭言飞、张伶俐、梁洁；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：林红、刘文一。

# 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

## 1　范围

YY/T 0127的本部分规定了口腔医疗器械遗传毒性——骨髓细胞微核试验方法和技术要求。

本部分适用于检测口腔医疗器械及其组分或其浸提液可能的致突变作用。

## 2　规范性引用文件

下列文件中的条款通过YY/T 0127的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

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 16886.12—2005,ISO 10993-12:2002,IDT)

## 3　器具

解剖器械、生物显微镜、载玻片。

## 4　试剂

试剂均用分析纯试剂,试验用水为蒸馏水。

### 4.1　小牛血清

经过滤灭菌的小牛血清,置56 ℃±1 ℃水浴箱保温0.5 h～1 h灭活。保存于4 ℃冰箱内。也可用小鼠或大鼠血清代替。

### 4.2　Giemsa储备液

取Giemsa染料3.8 g,置乳钵内,加甲醇375 mL,研磨,待染料全部溶解后,再加入甘油125 mL,置37 ℃温箱保温48 h,振摇数次。过滤后室温放置两周或更长时间。备用。

### 4.3　Giemsa应用液

取1份Giemsa储备液,加6份磷酸盐缓冲液(pH 6.8～7.0)混合,临用时配制。

### 4.4　磷酸盐缓冲液(pH 6.8～7.0)

2/15 mol磷酸氢二钠;

2/15 mol磷酸二氢钾。

### 4.5　甲醇

## 5　试验动物

5.1　种系选择:推荐使用小鼠或大鼠,也可使用其他合适的哺乳动物种系。

试验使用健康年青的成年小鼠。通常使用7周～12周龄,体重25 g～30 g昆明种小鼠,或体重150 g～200 g的Wistar大鼠或用130 g～170 g的SD大鼠。

5.2　每组若用两种性别的动物,至少雌、雄各5只。若用单一雄性动物,每组至少6只。动物购买后至少适应环境3 d。

## 6 给药剂量和分组

剂量水平、采样时间和次数：根据需要可从 6.1、6.2、6.3 剂量选择方法中选择其中的一种。

6.1 对遗传毒性的初始(期)评价，可使用一个剂量的受试物。该剂量为最大耐受剂量或产生一些细胞毒性指标的剂量。采样次数和时间：应采样三次，第一次采样时间不得早于给试验物质后 18 h～24 h，第三次采样不得晚于 72 h。

当有科学实验或初期评价数据证明出现细胞毒性改变时，也可采用附加的剂量水平。若为了确认而使用微核试验时，至少应增加 2 个附加剂量水平。同时设溶剂(或浸提介质)对照组和阳性对照组，阳性对照物可用环磷酰胺 40 mg/kg 体重经口或腹腔注射。也可采用其他已知能产生微核细胞数增加的物质为阳性对照物。

6.2 以最大耐受剂量为最高剂量，下设 2 个剂量组，中剂量组为最高剂量的 1/2，低剂量组为高剂量组的 1/5。其采样时间为第二次给试验物质后 6 h。

6.3 按 GB/T 16886.12 的规定制备溶液或浸提液。

6.3.1 若试验物质为可溶性，则用适宜的介质制备成溶液或稀释液。40 mg/kg 为最高剂量组，中剂量组为高剂量组的 1/5，低剂量组为中剂量组的 1/5。其采样时间与 6.2 相同。

6.3.2 若试验物质为浸提液，以浸提液原液(0.2 g/mL 浸提液)为最高剂量组，中剂量组为高剂量组的 1/5，低剂量组为中剂量组的 1/5。浸提介质采用生理盐水。其采样时间与 6.2 相同。

## 7 试验步骤

### 7.1 试样制备

试验物(受试物)：固体或液体受试物应能在等渗溶液中溶解，如不能溶解，应能在适当的介质中溶解或混悬，或按 GB/T 16886.12 制备浸提液。应采用新鲜制备的试验液进行试验(固化类材料应按说明书制样后，并在室温固化 2 h 制备浸提液。浸提液应在制备后 24 h 内使用)。

### 7.2 试验物与动物接触

采用等容给药法。受试物与阴性或阳性对照物采用经口灌胃、腹腔注射或静脉注射 50 mL/kg 体重。

### 7.3 采样时间

根据细胞周期和不同受试物的作用特点，确定取材时间。常采用两次给受试物方法，即 30 h 给药两次，间隔 24 h，于第二次给试验物后 6 h，颈椎脱臼处死动物，采样。

## 8 骨髓涂片的制备

8.1 于清洁载玻片上，滴加小牛血清 1～2 滴，取动物的胸骨或股骨，挤压或剪碎胸骨或股骨，与小牛血清混匀，常规推片，或用小牛血清冲洗股骨骨髓腔，制成细胞悬液，推片。涂片自然干燥后，放入甲醇中固定 10 min～15 min。

8.2 将涂片固定后保存。

8.3 染色方法：常用 Giemsa 染色法，也可用荧光染色法。

8.3.1 Giemsa 染色法：染色临用时，用 Giemsa 应用液染色或将固定后的涂片放入 Giemsa 应用液中染色 15 min～20 min，立即用 pH 6.8～7.0 的磷酸盐缓冲液或用蒸馏水冲洗。作好标记，置阴凉干燥处保存。

8.3.2 荧光染色法：采用 1/10 000 吖啶橙染色。

## 9 涂片观察

9.1 显微镜观察：选择细胞完整、分散均匀、着色适当的涂片区域，在油镜下观察。每一动物至少计数 1 000 个嗜多染红细胞，观察计数含有微核的嗜多染红细胞数。微核细胞率以 $10^{-3}$ 表示。用 Giemsa 染色，嗜多染红细胞被染成深蓝色，成熟红细胞呈粉红色。典型的微核为单个的、圆形、边缘光滑整齐，着

色与细胞核一致，呈紫红色或蓝紫色。其直径通常为细胞的1/20～1/5。

嗜多染红细胞与正染红细胞的比例(PCE/RBC)可作为细胞毒性指标之一。一般计数200个细胞中正染红细胞所占的比例。试验组嗜多染红细胞的总数应不小于对照组的20%。否则应降低最高剂量组的剂量。

9.2 荧光显微镜观察：嗜多染红细胞中的微核(DNA)呈黄绿色荧光；细胞浆中呈红色荧光(RNA)。

## 10 数据和报告

以表格的形式给出试验组、阴性组和阳性对照组的嗜多染红细胞数；含有微核的嗜多染红细胞数和微核细胞千分率；嗜多染红细胞与正染红细胞的比例。

数据的处理：采用卡方检验、双侧t检验或泊松分布检验等方法进行数据统计处理。

## 11 结果评价

有如下现象之一表明被试样品具有致突变性：

a) 嗜多染红微核细胞率明显增加，并有统计学意义；或有明显剂量-效应关系；

b) 至少在一个试验点上微核细胞率增加并具有可重复的、有统计学意义的阳性反应。

一种被试验物质既没有统计学意义的剂量-效应关系，又没有在某一试验点上的可重复的阳性反应，则认为被试物在该试验系统中没有致突变作用。

注1：一般阴性对照组的微核细胞率$<5\times10^{-3}$，供参考。但应有本试验室所用动物的自发微核细胞率作参考。

注2：Giemsa染色中获得的可疑阳性或弱阳性结果的被试物，必须用荧光染色鉴别以便进一步肯定或否定阳性结果。规定见8.3.2和9.2。

YY/T 0127.12—2008

## 参 考 文 献

[1] ISO/TR 7405:1984 牙科材料生物学评价.

[2] 中华人民共和国卫生部药政局(一九九三).新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药学 药理学 毒理学).

[3] GB/T 15193.5—2003 食品安全性毒理学评价程序和方法.

[4] OECD 474 OECD Quideline for Testing of Chemicals—Genetic Toxicology:Micronucleus Test.

YY/T 0127.12-2008

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·2-19187

定价: 10.00 元