ICS 11.040.01
C 30

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0870.6—2019

医疗器械遗传毒性试验 第6部分：体外哺乳动物细胞微核试验

Test for genotoxicity of medical devices—Part 6: In vitro mammalian cell micronucleus test

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》由以下部分组成：

——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；

——第6部分：体外哺乳动物细胞微核试验。

本部分为YY/T 0870的第6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、深圳市药品检验研究院(深圳市医疗器械检测中心)。

本部分主要起草人：王鸾鸾、王昕、曹苹、王晓炜、林钟石。

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)《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 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 487(2016)方法，在有或无代谢活化系统的情况下，在培养细胞与医疗器械/材料接触时使用细胞胞质分裂阻断剂(如细胞松弛素 B)进行处理，通过对存在双核细胞的哺乳动物细胞的微核情况进行分析，评价试验样品潜在的致畸变性。

YY/T 0870 的本部分的目的是为了筛选医疗器械/材料中具有导致哺乳动物细胞胞质形成微核潜能的物质。微核可来源于无着丝粒的染色体片段或在细胞有丝分裂后期不能迁往细胞两极的整条染色体。该试验用于检测在细胞暴露于受试物期间或暴露后，受试物对经历过分裂的细胞诱发断裂和非整倍体作用的活性。YY/T 0870 本部分需要使用外源性代谢活化系统。但是，这种外源性系统不能完全模拟哺乳动物的体内情况。避免由 pH、渗透压的改变或高水平细胞毒性可能导致的假阳性结果。

YY/T 0870 的本部分选用已建立的细胞系、人类或啮齿动物来源的原代细胞。根据培养能力、核型稳定性(包括染色体数目)和微核背景频率选择试验用的细胞。目前，虽然现有的数据无法提出确切的建议，但在评估化学危险时，考虑到 p53 状态、遗传(核型)稳定性、DNA 修复能力和来源(啮齿动物与人类)的选择是很重要的。因此，本部分的使用者可考虑这些和其他细胞特性对检测微核的细胞系性能的影响。

医疗器械遗传毒性试验
第6部分：体外哺乳动物细胞微核试验

1 范围

YY/T 0870的本部分规定了医疗器械/材料体外哺乳动物细胞微核试验方法。本部分适用于通过测定医疗器械/材料产生的体外哺乳动物细胞微核数目，筛选医疗器械/材料是否具有潜在遗传毒性作用。

注：纳米材料的相关试验可参照本部分进行。

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

非整倍体剂 aneugen

通过与细胞有丝分裂和减数分裂周期相关的成分互相作用，引起细胞或生物体非整倍染色体形成的任何物质。

3.2

非整倍体 aneuploidy

正常二倍体(或单倍体)染色体数目中缺少或增加一条或多条，但不是整套染色体(多倍体)的增减。

3.3

细胞增殖 cell proliferation

作为细胞有丝分裂的结果，细胞的数量增加。

3.4

着丝粒 centromere

一条染色体内的两条染色单体连接在一起的DNA区域。

3.5

断裂剂 clastogen

任何能引起细胞群或真核生物染色体结构畸变的物质。

3.6

胞质分裂 cytokinesis

细胞核在有丝分裂后形成两个子细胞的胞浆分离过程，并且每个子细胞都有一个细胞核。

3.7

胞质分裂阻断增殖指数　cytokinesis-block proliferation index;CBPI

胞质分裂阻断剂处理组的细胞群的激发分裂细胞数与未处理的细胞群对照的比值。

3.8

细胞阻滞　cytostasis

细胞生长增殖抑制。

3.9

细胞毒性　cytotoxicity

在使用细胞松弛素 B(cytoB)时，与阴性对照相比 CBPI 或 RI 的减少数。

3.10

微核　micronuclei

从细胞主核分离并独立于细胞主核的小核，由在细胞有丝分裂或减数分裂末期遗留在胞质内的染色体片段或整条染色体形成。

3.11

p53 状态　p53 status

p53 蛋白质参与细胞周期调控、细胞凋亡和 DNA 修复。在缺乏功能性 p53 蛋白质的细胞中，当 DNA 损伤时，不能通过抑制细胞周期或不能通过凋亡或其他机制(例如诱导 DNA 修复)消除损伤的细胞，理论上更容易发生基因突变或染色体畸变。

3.12

复制指数　replication index;RI

在暴露期和恢复时处理组完成的细胞分裂与未处理的对照相比所占的比率。

4　主要设备

超净工作台、CO_2 培养箱、恒温水浴箱、倒置显微镜、光学显微镜、压力蒸汽灭菌器等。

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 A 的规定或购买市售商品。培养液和试剂参见附录 B 的规定制备或购买市售商品。胞质分裂阻断剂(cytoB)购买市售商品。

注 1：在细胞的处理过程中避免使用会降低分裂指数的试剂，尤其是一些钙络合剂。

注 2：cytoB 的适合浓度一般为 3 μg/mL～6 μg/mL。实验室测定每种细胞类型使用的 cytoB 合适浓度，以保证在溶剂/载体对照组中获得理想的双核细胞数。当受试物用流式细胞术评价微核时，cytoB 是不适用的。

6　细胞系

可选用的细胞系为中国仓鼠肺细胞(CHL)、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、中国仓鼠肺细胞(V79)、小鼠淋巴瘤细胞(L5178Y)或人细胞系如 TK6 等。宜使用合适的培养液和培养条件(培养容器、湿化的 5%CO_2，培养温度 37 ℃)来维持所培养细胞的生长。宜定期检查细胞系染色体数目的稳定性和支原体污染情况。

注 1：cytoB 对 L5178Y 可能具有潜在的细胞毒性，在使用此细胞时不推荐使用 cytoB。使用其他细胞株和细胞类型宜根据本标准规定可接受的条件说明其合理性。

注 2：当使用原代细胞时，在可行的情况下考虑使用来自人类的原代细胞，并根据人类伦理原则和规定进行抽样。

人外周血淋巴细胞宜来自年轻(约18岁～35岁)、无吸烟史、无已知疾病且最近未接触遗传毒性物质(如化学试剂、电离辐射)的献血者;如果从一个以上的供血者获得的细胞混合使用时说明献血者的数量;女性的微核频率随着年龄增加而增加的现象要比男性更为明显,因此注意选择混合使用的献血者。

注3:由于不同细胞周期对试验样品的敏感程度未知,将细胞培养物保持在对数细胞生长期(细胞系)或刺激分化(淋巴细胞的原代培养物),以使其在细胞周期的不同阶段暴露于试验样品。需要用有丝分裂剂刺激分裂时,通常不再使用同步化的原代细胞(例如有丝分裂刺激48 h的人淋巴细胞),但只要证据合理也可以接受。

7 试验前准备

7.1 器具灭菌

与试验样品和对照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 ℃ 30 min,或置电热干燥箱内160 ℃ 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。可采用0.9%氯化钠注射液(或细胞培养液)和/或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 10993-3:2014附录A中针对不同的医疗器械提供了A,B,C三种样品制备方法,可参考使用。

注2:若采用浸提液进行试验,考虑采用单剂量组试验(即试验样品原液或100%的浸提原液)时,对试验所采用的剂量范围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,最终接触时浓度宜不大于1.0%(体积分数);在使用DMSO溶解cytoB时,作为浸提介质的有机溶剂与溶解cytoB的有机溶剂的总体积不大于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),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时考虑产品的溶解度、pH和渗透压对试验体系的影响。

9 对照样品制备

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染色体断裂剂、非整倍体剂能力以及测试外源性代谢活化系统的有效性(如适用)。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。如果在有和无活化系统的短期接触试验中采用一种断裂剂作为唯一的阳性对照时,在长期接触组宜采用一种非整倍体剂作为阳性对照。

表 1　阳性对照物举例

特征	化学物	化学物质登记号
无外源性代谢活化系统	阿糖胞苷	147-94-4
	丝裂霉素 C	50-07-7
	甲磺酸甲酯	66-27-3
	4-硝基喹啉-N-氧化物	56-57-5
有外源性代谢活化系统	苯并(a)芘	50-32-8
	环磷酰胺	50-18-0
非整倍体剂	秋水仙碱	64-86-8
	长春碱	143-67-9

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，还需设未处理对照。

10　试验步骤

10.1　预实验

对怀疑有细胞毒性反应的试验样品应进行预实验。宜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。如果试验样品使培养液的 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。宜在有或无代谢活化的情况下，使用适当的细胞死亡和生长的指标来确定细胞毒性，以保证有足够数目的细胞处于有丝分裂状态。

使用 cytoB 处理时，推荐使用 CBPI[见式(1)、式(2)]或 RI[见式(3)、式(4)]来评价选用的细胞系的细胞毒性。

$$\mathrm{CBPI}=\frac{[S+(2\times D)+(3\times M)]}{T_{\mathrm{O}}} \qquad \cdots\cdots(1)$$

式中：

S ——单个核细胞数；

D ——双核细胞数；

M ——多核细胞数；

T_{O}——细胞总数。

$$\text{细胞阻滞}=\left(1-\frac{\mathrm{CBPI_T}-1}{\mathrm{CBPI_C}-1}\right)\times 100\% \qquad \cdots\cdots(2)$$

式中：

$\mathrm{CBPI_T}$ ——试验样品组的胞质分裂阻断增殖数；

$\mathrm{CBPI_C}$ ——阴性对照组或未处理对照组的胞质分裂阻断增殖指数。

$$\mathrm{RI}=\frac{[D_{\mathrm{T}}+(2\times M_{\mathrm{T}})]\div T_{\mathrm{T}}}{[D_{\mathrm{C}}+(2\times M_{\mathrm{C}})]\div T_{\mathrm{C}}}\times 100\% \qquad \cdots\cdots(3)$$

式中：

D_T ——试验样品组双核细胞数；

M_T ——试验样品组多核细胞数；

T_T ——试验样品组细胞总数；

D_C ——阴性对照组或未处理对照组双核细胞数；

M_C ——阴性对照组或未处理对照组多核细胞数；

T_C ——阴性对照组或未处理对照组细胞总数。

$$细胞阻滞 = (1 - RI) \times 100\% \quad \cdots\cdots(4)$$

用 cytoB 处理培养的细胞，测定培养物中单个核、双核和多核细胞相对出现频率可提供暴露处理对细胞增殖作用、细胞毒性和细胞停滞作用准确的定量，并能确保只对暴露处理期间和处理后发生分裂的细胞进行分析计数。至少用 500 个细胞来测定 CBPI 或 RI，通过对处理和对照培养物的一些测定得到的量值大小进行比较来估算细胞毒性。评估细胞毒性的其他标志（如细胞完整性、凋亡、坏死、中期计数、细胞周期）可以提供有价值的信息，但是不能替代 CBPI 或 RI。

当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，即在收获细胞时，试验用最高浓度的细胞毒性发生率应控制在（55±5）%，应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。

10.2 接触处理

10.2.1 试验分为短期接触组（有和无代谢活化系统）和长期接触组（无代谢活化系统），按 10.2.2 和 10.2.3步骤操作。

10.2.2 将一定浓度的细胞接种于培养皿（瓶）内，置于 CO_2 培养箱内培养，保证细胞在收获期处于对数生长状态。

10.2.3 吸去培养皿（瓶）中的培养液，在处于对数生长状态的细胞中加入试验液或对照液、S9 混合液（不加 S9 混合液时，需用培养液补足）和含 cytoB 的细胞培养液，置于培养箱中。短期接触组接触 3 h～6 h，吸去培养皿（瓶）中的液体，用生理等渗液洗细胞 3 次，加入含 cytoB 的新鲜细胞培养液继续培养，继续培养至 1.5 个～2.0 个的正常细胞周期时收获细胞。长期接触组接触时间（约 1.5 个～2.0 个的正常细胞周期时）应持续直到收获细胞。

注 1：有些特定的物质（如核酸类似物），尤其存在 p53 状态的细胞，可能需要使用超过 1.5 个～2.0 个正常细胞周期的接触时间进行检测。当延长取样时间（培养周期总共是 3.0 个～4.0 个），必须注意细胞是否还处于旺盛的分裂期中。

注 2：如果采用淋巴细胞，需要使用有丝分裂刺激剂启动细胞周期。

注 3：当细胞处于有丝分裂期时很容易脱落，因此在换液过程中可能导致部分细胞丢失，将原培养液和冲洗液中的细胞离心后再加入新鲜培养液中培养。

注 4：一般设置 2 个平行皿/瓶，若能获得足够细胞数，可采用单皿/瓶。

10.3 收获细胞与制片

若采用 35 mm 培养皿的试验体系，推荐的收获细胞与制片的步骤如下：

a) 消化：用胰蛋白酶液消化细胞，待细胞脱落后加入含血清的细胞培养液终止胰蛋白酶作用，混匀，放入离心管内以 200 *g* 离心 5 min～7 min，弃去上清液。

b) 低渗：加入 0.075 mol/L 氯化钾溶液 5 mL～7 mL，用滴管将细胞轻轻地吹打混匀，放入 37 ℃水浴中低渗处理 10 min～20 min，加入 1 mL～2 mL 固定液（甲醇：冰乙酸＝3：1）混匀。以 200 *g* 离心 5 min～7 min，弃去上清液。

c) 固定：加入 5 mL～7 mL 固定液，混匀后固定 10 min～20 min，以 200 *g* 离心 5 min～7 min，弃去上清液。同法再固定 1 次～2 次，弃去上清液。

d) 滴片：加入数滴新鲜固定液，混匀。将混悬液滴于冰水预冷的载玻片上，自然干燥。

e) 染色：将滴片用姬姆萨染液染色，晾干备用。

注1：标本片可以用多种方法染色，如姬姆萨、DNA特异性荧光染色等。使用荧光染色(如丫啶橙或Hoechst33258)时，可排除在非DNA特异性染色的一些人为的伪象。

注2：如果鉴别微核的成分(染色体/染色体断片)，可以用抗着丝粒抗体、带有全着丝粒DNA探针的FISH法、全着丝粒特异性引物原位延伸标记等技术，阳性剂可选用秋水仙碱或长春碱。

10.4 结果观察

宜在用显微镜分析之前，所有标本片进行独立编号。每一试验组至少分析计数2 000个分散良好的双核细胞。对细胞中出现一个或多个的微核虽可以提供有价值的信息，但不做强行规定进行统计分析。需要注意不计数形状不规则的或两个核大小差别很大的双核细胞；也不要被分散不好的多核细胞混淆误认为是双核细胞。

注：当采用2个平行皿/瓶时，将2 000个分散良好的双核细胞均一分配。

10.5 实验室能力

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。

在无代谢活化系统的情况下选择阳性对照物质进行短期和长期接触，在有代谢活化系统的情况下选择阳性对照物质进行短期接触，以证明实验室具有检测微核发生率的能力并确定代谢活化系统的有效性。选择的阳性物的浓度范围宜在背景的基础上提供可重复性和与浓度相关的增加，以验证测试系统的灵敏度和动态范围。

10.6 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，阴性对照宜与已公开发布的对照数据(若有)一致。随着更多的实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%置信区间内。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皿(瓶)试验中细胞微核的发生率，或平行皿(瓶)的细胞微核率的总和。阴性对照应理想地在该分布的95%置信区间内。同时，在95%置信区间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“处于控制范围内”，并且没有技术或人为差错，那么就可以将其纳入历史对照分布中。

11 数据处理

宜评价双核细胞的微核发生率。报告对一个或多个的微核发生率记录，但不做强行规定进行统计分析。

宜记录主试验中试验组和对照组的细胞毒性或细胞停滞状态。宜提供各个培养物的资料，所有资料以表格的形式进行总结。

采用合适的统计学方法对结果进行处理，以评价试验样品的致畸变性。

12 结果判定

12.1 可接受准则

可接受准则基于以下：

——对于实验室历史阴性对照数据库，阴性对照被认为是可以接受的；

——阳性对照不但在历史阳性对照数据库范围内，并且与阴性对照相比明显增加，具有统计学意义；

——在溶剂对照中的细胞毒性标准应符合要求；

——所有的试验条件都要进行检测，除非有一个结果是阳性的；

——选择最高浓度的标准与预试验描述的一致（适用时）。

12.2 结果评估

12.2.1 阳性反应

如果满足了所有的可接受标准，当满足以下试验条件时，短期接触组（有和无代谢活化系统）和长期接触组（无代谢活化系统）中任一组试验样品结果被认为明确的阳性：

——与阴性对照相比，微核率的增加在统计学上有显著性差异；在多剂量组试验时，评估显示有剂量-效应关系；

——任一组结果超出了历史的阴性对照数据的分布范围（例如，95%置信区间）。

12.2.2 阴性反应

如果满足了所有的可接受标准，当满足以下试验条件时，短期接触组（有和无代谢活化系统）和长期接触组（无代谢活化系统）中的试验样品结果被认为明确的阴性：

——与阴性对照相比，微核率的增加在统计学上无显著性差异；在多剂量组试验时，评估显示无剂量-效应关系；

——所有结果都在历史阴性对照数据的分布内（例如，95%置信区间）。

12.3 结果解释

按照下列内容对结果进行解释：

——没有必要对明确的阳性或阴性结果进行核实。

——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。可增加镜检细胞数（适用时）或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。

——在体外微核试验中测定到诱发微核的化学物，可能成为它们诱发染色体断裂、丢失，或者两种损伤发生的原因。应用抗着丝粒抗体、全着丝粒特异性原位探针和其他的技术，可进一步分析确定微核的诱发是由于断裂作用或是诱发非整倍体作用活性所致。

13 试验报告

试验报告中宜包含下列信息：

a) 试验样品：

——来源，批号，有效日期，如果可能；

——受试物的稳定性，如果知道；

——受试物在介质中的溶解性和稳定性，如果知道；

——测定受试物在培养基中的 pH，渗透压和沉淀反应，适当的。

b) 介质：

——介质选择的合理性；

——在最终细胞培养基中介质所占的百分比。

c) 细胞：

——所用细胞类型和来源；

——无支原体污染的资料；

——细胞培养的代数（适用时）；

——细胞系的细胞培养方法；

——细胞系的模式染色体数量。

d) 试验条件：

——胞质分裂阻断剂（cytoB）的确认，如浓度和接触时间；

——在培养基中受试物的最终浓度（μg/mL，mg/mL，mmol/L）；

——细胞培养液的组分，CO_2 体积分数（适用时）和湿度水平；

——溶剂和所加受试物的浓度（和/或体积）；

——培养温度和时间；

——接触时间；

——接触后收获时间；

——接种时细胞浓度（适用时）；

——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）；

——阳性和阴性对照物的最终浓度；

——制片和染色所用技术和方法；

——计数微核细胞的标准（分析细胞的选择和微核的鉴定）；

——分析细胞的数目；

——细胞毒性的测试方法；

——细胞毒性和方法的其他相关信息（适用时）；

——阳性、阴性或可疑结果的接受标准；

——测定 pH、渗透压和沉淀的方法（如果有）。

e) 结果：

——符合用于分析的细胞的定义；

——细胞毒性的测量，CBPI 或 RI 计数；其他的指标（细胞覆盖程度，细胞凋亡，细胞坏死，中期相细胞数，双核细胞频率）；

——用于暴露处理的培养基的 pH 和渗透压(如果有);

——每个暴露处理组和对照组的培养物应分别计数带有微核的细胞数,并说明其是双核细胞还是单核细胞(如果适用);

——剂量反应关系,如果可能;

——阴性(溶剂/载体)和阳性对照资料(浓度/剂量和溶剂);

——历史性阴性对照(溶剂/载体)和阳性对照资料;

——统计学分析,P 值(如果有)。

f) 结果的讨论。

g) 结论。

附 录 A
（资料性附录）
S9 和 S9 混合液制备

A.1 大鼠肝 S9 液

A.1.1 选健康雄性成年 SD 或 Wistar 大白鼠，约 5 周龄～6 周龄。推荐采用苯巴比妥和 β-萘黄酮联合诱导。d1、d2、d3、d4 大鼠腹腔注射苯巴比妥，每天 1 次。d1 剂量为 30 mg/kg 体重；剩下 3 d 每次剂量为相当于 60 mg/kg 体重。d3 和 d4，在注射苯巴比妥的同时，腹腔注射 β-萘黄酮，每天 1 次，每次剂量为 80 mg/kg 体重。

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。

A.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 ℃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 ℃）。

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

A.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 ℃低温保存，保存期不超过一年。

A.2 S9 混合液辅助因子

A.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 ℃保存。

A.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 ℃保存。

A.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 ℃保存。

A.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 ℃以下）。

A.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 ℃以下）。

A.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 B
（资料性附录）
试剂和培养液制备

B.1 磷酸盐缓冲液

NaCl	8.5 g
KCl	0.2 g
磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	2.85 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.27 g

溶于 1 000 mL 蒸馏水中，调 pH 为 6.8，0.103 mPa，20 min 灭菌或滤菌。4 ℃保存。

B.2 Giemsa 储备液

取 Giemsa 染料 3.8 g，置研钵中，加少量甲醇研磨，逐渐加甲醇至 375 mL，溶解后再加 125 mL 纯甘油，于 37 ℃温箱保温 48 h，在此期间摇动数次，放置 1 周～2 周过滤备用。

B.3 Giemsa 应用液

取 1 mL 储备液加入 10 mL pH 6.8 磷酸缓冲液，临用时现配。

B.4 固定液

甲醇（分析纯）：冰乙酸（分析纯）以 3：1 混合，临用时现配。

参 考 文 献

[1] ISO 10993-3:2014 Biological evaluation of medical devices Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity

中华人民共和国医药
行业标准
医疗器械遗传毒性试验
第6部分：体外哺乳动物细胞微核试验
YY/T 0870.6—2019
*
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)68533533　发行中心：(010)51780238
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 1.25　字数 28 千字
2019年8月第一版　2019年8月第一次印刷
*
书号：155066·2-34362　定价　26.00 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)68510107

YY/T 0870.6-2019