



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1434—2016

人类体外辅助生殖技术用 医疗器械 体外鼠胚试验

Medical devices for human in vitro assisted reproductive technology—
In vitro mouse embryo assay

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

本标准按照 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。

本标准由国家食品药品监督管理总局提出。

本标准由中国食品药品检定研究院归口。

本标准起草单位：中国食品药品检定研究院、中国科学院遗传与发育生物学研究所。

本标准主要起草人：韩倩倩、冯晓明、戴建武、肖志峰、尹艳云、徐丽明、章娜。

人类体外辅助生殖技术用 医疗器械 体外鼠胚试验

1 范围

本标准规定了体外鼠胚试验方法,适用于与配子和/或胚胎接触的人类体外辅助生殖技术用医疗器械的安全性评价。

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 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分:动物福利

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

YY/T 0995—2015 人类辅助生殖技术用医疗器械 术语和定义

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语、定义

YY/T 0995—2015 界定的以及下列术语适用于本文件。

注:以下胚胎均指小鼠胚胎。

3.1.1

囊胚 blastocyst

受精卵经卵裂形成的具有囊胚腔的胚胎。

3.1.2

1-细胞胚胎 1-Cell Embryo

受精但尚未发生卵裂的合子。

3.1.3

2-细胞胚胎 2-Cell Embryo

完成第一次卵裂的含两个卵裂球的胚胎。

3.2 缩略语

PMSG:孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotrophin)

hCG:人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin)

4 试验方法

4.1 概述

本试验是采用小鼠胚胎体外常规培养体系,在从受精卵到囊胚的培养过程中,根据待检产品的功能

和特性,在相应培养环节使用待检液体类产品或者器具类产品的浸提液,通过观察早期胚胎从受精卵到囊胚的发育情况来评价待检产品对胚胎发育的潜在毒性。

体外鼠胚试验有 1-细胞方法和 2-细胞方法,无论使用 1-细胞方法还是 2-细胞方法进行鼠胚试验,试验步骤都应当尽可能模拟该产品用于人类辅助生殖培养的操作程序。本试验需要在具备条件的洁净实验室内进行。

注:推荐使用 1-细胞胚胎方法。

4.2 试验材料

4.2.1 试验动物

试验动物品系:选择敏感和稳定的品系。

试验动物周龄:雌鼠 6 周龄~8 周龄,性成熟雄鼠。

动物福利应符合 GB/T 16886.2 的要求。

注:有关试验动物品系的选择参见附录 A,推荐使用 B6D2F1 等杂交一代小鼠。试验动物购买自有资质的试验动物生产机构。

4.2.2 试剂

a) PMSG。

b) hCG。

c) 适合的培养液,经鼠胚试验检测合格。

注:推荐使用 M2 培养液进行胚胎收集和冲洗,使用 M16 培养液进行供试品浸提液制备和胚胎培养。

d) 透明质酸酶:经鼠胚试验检测合格。

c) 培养用油:经鼠胚试验检测合格。

4.2.3 耗材

a) 冲胚针。

b) 显微镊。

c) 眼科剪。

d) 移卵装置。

e) 10 μ L、100 μ L、1 000 μ L 移液器吸头。

f) 培养皿。

以上所用耗材需对胚胎无毒性。

4.2.4 仪器

a) CO₂ 培养箱

温度 37 $^{\circ}$ C $\pm$ 0.3 $^{\circ}$ C,相对湿度大于 90%(饱和湿度),5%或 6% CO₂。或者三气培养箱。

b) 体视和倒置显微镜

含 37 $^{\circ}$ C $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C 恒温装置。

4.3 试验过程

4.3.1 样品准备

4.3.1.1 供试品准备

胚胎体外培养相关的液体类供试品,按照产品使用说明进行合理运输、保存和使用。试验过程中根

据产品的临床使用说明来准备供试品。人类辅助生殖器具类供试品按照 GB/T 16886.12 的要求合理浸提,浸提介质推荐使用 M16 培养液。

4.3.1.2 对照组准备

a) 阳性对照组

所使用的阳性对照品应经方法学验证,证实其在规定的使用方法和剂量下能够产生有统计学意义的胚胎毒性。

b) 阴性对照组

阴性对照组使用 M2、M16 培养液。

注:试验中使用的所有与胚胎接触的培养液和耗材都应是已经通过鼠胚试验检测的产品。

4.3.2 试验程序

4.3.2.1 超数排卵

选择 6 周龄~8 周龄雌鼠,经腹腔注射 PMSG 10 IU/只;48 h 后经腹腔注射 hCG 10 IU/只,注射 hCG 当日雌鼠与同品系雄鼠合笼过夜。

4.3.2.2 准备培养皿

培养胚胎前在细胞培养皿中制备一定数量 30 μ L~50 μ L 大小的液体微滴(培养液),表面覆盖培养用油,在 CO₂ 培养箱内预平衡 4 h~18 h。

4.3.2.3 鼠胚采集

合笼第二天早上检查交配情况,选择见栓小鼠备用。

a) 1-细胞胚胎收集:注射 hCG 后 18 h~22 h 后处死见栓雌鼠,在输卵管壶腹部收集 1-细胞胚胎。将收集到的絮状受精卵团放置到 37 $^{\circ}$ C 提前预热好的透明质酸酶中,当胚胎周围的卵丘和颗粒细胞被消化分离后立即转移、清洗后,挑选出正常形态的受精胚胎,转移到培养微滴中,用于 1-细胞鼠胚检测试验。

b) 2-细胞胚胎收集:注射 hCG 后 40 h~48 h 后,处死见栓雌鼠。用显微镊将输卵管末端(输卵管伞)套上冲胚针,用培养液将胚胎从输卵管中冲洗出来,收集到的 2-细胞胚胎经冲洗后用于 2-细胞鼠胚检测试验。

4.3.2.4 体外培养

采用微滴法培养,将收集到的鼠胚随机分成一个阳性对照组、一个阴性对照组和一个供试品组,置于已平衡的培养液(见 4.3.2.2)中,于 37 $^{\circ}$ C,5%或 6% CO₂,饱和湿度的培养箱中培养。每组鼠胚数不少于 50 个。

注 1: 每组试验鼠胚来自 3 只~5 只小鼠,将每只孕鼠的胚胎随机分配到各试验组进行试验。建议每个微滴中不超过 20 个胚胎。

注 2: 供试品准备、试验过程中供试品接触方式、供试品接触时间随供试品种类而各有不同,具体给样时间和方式参照附录 B。

4.3.3 试验结果

1-细胞胚胎体外分别培养 96 h,或 2-细胞 72 h 后记录囊胚数量。

观察指标:囊胚形态观察。

可接受准则:

- a) 阳性对照组的囊胚形成率显著低于阴性对照组；
- b) 阴性对照组的囊胚形成率 $\geq 80\%$ 。

4.3.4 试验结果报告

4.3.4.1 数据分析

对形成囊胚的受精卵比例进行计算：

$$\text{囊胚形成率}(\%) = \frac{\text{囊胚数}}{\text{1-细胞期或 2-细胞期的胚胎数}} \times 100\%$$

4.3.4.2 囊胚质量判断

目前常用的方法主要有形态观察法。

发育良好的囊胚，囊胚腔充分扩张，内细胞团大小适中，滋养层细胞连接紧密且大小均匀。发育差的囊胚，囊胚腔小，内细胞团小或无内细胞团，滋养层细胞稀疏。

注：在具备技术条件的情况下，鼓励兼用囊胚细胞计数法对发育期的胚胎进行分析。

4.3.4.3 试验报告内容

试验报告应包含如下信息：

- a) 供试品信息；
- b) 试验动物信息；
- c) 试验条件；
- d) 试验程序；
- e) 试验结果；
- f) 试验结论。

附 录 A
(资料性附录)
关于试验动物选择的说明

实验动物按遗传学可分为同基因型(近交系、突变系、杂交 F1 代等)和不同基因型(封闭群)。

在鼠胚试验中收集胚胎用的小鼠,应具备遗传稳定、对药物敏感、且敏感性均一的特点。近交系小鼠和杂交 F1 代小鼠具有基因型相同、遗传稳定、表现型均一的特点,国际上常用的 F1 代动物有: AKD2F、BA2CF1、BCF1、BCBAF1、B6D1F1、CKAF1、B6D2F1、CBA/C57、CAF1 等。

附 录 B

(资料性附录)

试验中供试品接触时间和接触方式的确定

鼠胚试验中使用的液体大致分为两类,一类是相对长时间的直接或者间接接触胚胎,例如胚胎培养液、囊胚培养液、体外受精液、培养用油等,在胚胎培养的过程中需要与胚胎直接或者间接的接触 24 h 以上;一类是相对短时间的直接或间接接触胚胎,例如卵泡冲洗液等,在胚胎体外培养过程中与胚胎接触时间短,大约在数小时或者数分钟。因此,在鼠胚试验中,要根据体外培养的实际操作情况,让鼠胚在待检测液体中孵育时间尽可能的接近实际培养时间。

推荐使用 M2 培养液作为缓冲液。M16 培养液可以支持鼠胚从受精卵发育到囊胚阶段,推荐使用 M16 培养液作为供试液接触后的培养液。

表 B.1 试验中供试品接触时间和接触方式的确定

鼠胚操作 步骤	供试品						
	卵泡冲洗液/ 缓冲液/精子 洗涤液	胚胎冷冻/ 解冻液	受精液	卵裂 培养液	囊胚 培养液	器具类产 品浸提液	其他
收集胚胎	缓冲液 (M2)	缓冲液 (M2)	缓冲液 (M2)	缓冲液 (M2)	缓冲液 (M2)	缓冲液 (M2)	缓冲液 (M2)
培养前处理	供试品中孵 育 20 min	按照供试品 生产商使用 方法进行处 理	供试品中孵 育 24 h	供试品中清 洗 2~3 遍	培养液 (M16)	供试品浸提 液清洗 2~ 3 遍	液 体 类: 根据产品 使用方式 在胚胎相 应培养阶 段使用
1~2 细胞胚 胎到 6~8 细胞	培 养 液 (M16) 中 培养	培 养 液 (M16) 中 培养	培 养 液 (M16) 中 培养	供试品中培 养 至 6-8 细胞	培养液 (M16)	供试品浸提 液中培养	
6~8 细胞到 囊胚	培 养 液 (M16) 中 培养	培 养 液 (M16) 中 培养	培 养 液 (M16) 中 培养	培 养 液 (M16) 中 培养	供试品中培 养至囊胚	供试品浸提 液中培养	

参 考 文 献

- [1] Gardner DK, Reed L, Linck D, Sheehan C, Lane M. Quality Control in Human IVF. *Sem. Reprod. Med.* 23:319-324
- [2] Gardner DK, Lane M. Embryo Culture Systems in In Vitro Fertilization: A Practical Approach. Ed. Gardner DK, Informa Health Care, NY, 2007:221-282
- [3] Weiss TJ, Warnes GM, Gardner DK. Mouse Embryos and Quality Control in Human IVF. *Reprod. Fertil. Dev.* 1992, 4(1):105-107
- [4] Davidson A, Vermesh M, Lobo RA, Paulson RJ. Mouse Embryo Culture as Quality Control for Human In Vitro Fertilization: The One-cell Versus Two-cell Model. *Fert. Steril.* 1988, 49: 514-521
- [5] US Federal Register, Obstetric and Gynecologic Devices: Reclassification and Classification of Medical Devices Used for In Vitro Fertilization and Related Assisted Reproduction Procedures. 63: 48428-48437, 1998.
- [6] Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2003
- [7] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Devices and Radiological Health, Devices Used for In Vitro Fertilization and Related Assisted Reproduction Procedures: Submission Guidance for a 510(k) Draft Guidance.
- [8] Australian Government, Department of Health and Ageing, Therapeutic Goods Administration, In Vitro Fertilisation (IVF) Solutions
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
人 类 体 外 辅 助 生 殖 技 术 用
医 疗 器 械 体 外 鼠 胚 试 验
YY/T 1434—2016

*

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

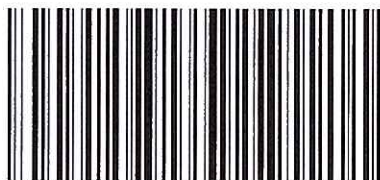
中 国 标 准 出 版 社 秦 皇 岛 印 刷 厂 印 刷
各 地 新 华 书 店 经 销

*

开 本 880×1230 1/16 印 张 0.75 字 数 16 千 字
2017 年 1 月 第 一 版 2017 年 1 月 第 一 次 印 刷

*

书 号 : 155066 · 2-31092 定 价 18.00 元



YY/T 1434-2016

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