



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1465.4—2017

医疗器械免疫原性评价方法 第4部分：小鼠腹腔巨噬细胞吞噬 鸡红细胞试验 半体内法

Immunogenic evaluation method of medical devices—
Part 4: Phagocytosis of mouse peritoneal macrophages on chicken erythrocytes—
Ex-vivo method

2017-03-28 发布

2018-04-01 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》，分为以下部分：

- 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)；
- 第 3 部分：空斑形成细胞测定 琼脂固相法；
- 第 4 部分：小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验 半体内法；
- 第 5 部分：用 M86 抗体测定动物源性医疗器械中 α -Gal 抗原清除率。

本部分为 YY/T 1465 的第 4 部分。

有关其他方面的医疗器械免疫原性评价方法将有其他部分的标准。

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：四川医疗器械生物材料和制品检验中心、山东省医疗器械产品质量检验中心。

本部分起草人：袁曦、梁洁、乔春霞、郑秀娥。

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。

医疗器械导致的免疫毒性反应可能涉及免疫应答的各个方面,包括刺激/急性炎症、慢性炎症、免疫抑制、免疫刺激、超敏反应及自身免疫等。这些过程可能涉及多种免疫细胞,尤其是淋巴细胞,粒细胞及巨噬细胞等。其中巨噬细胞是一类重要的免疫细胞,直接参与固有性免疫和适应性免疫应答的多个方面。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 的本部分预期为 GB/T 16886.20 的实施提供具体的试验方法。本部分给出的小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力测定方法,为医疗器械/材料对机体非特异性免疫及抗原递呈过程的影响提供检测方法,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。但该方法具有一定的局限性,在使用前,宜对方法的适用性进行确认。其他经确认的方法也可以采用。

医疗器械免疫原性评价方法
第 4 部分：小鼠腹腔巨噬细胞吞噬
鸡红细胞试验 半体内法

1 范围

YY/T 1465 的本部分给出了半体内法测定小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的方法。
本部分适用于评价医疗器械/材料对巨噬细胞吞噬能力的影响。

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 16886.1—2011,ISO 10993-1:2009,IDT)

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 16886.2—2011,ISO 10993-2:2006,IDT)

GB/T 16886.11 医疗器械生物学评价 第 11 部分：全身毒性试验(GB/T 16886.11—2011,ISO 10993-6:2006,IDT)

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)

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(GB/T 16886.20—2015,ISO/TS 10993-20:2006,IDT)

3 术语和定义

GB/T 16886.1、GB/T 16886.2、GB/T 16886.12 和 GB/T 16886.20 界定的术语和定义适用于本文件。

4 试验原理

使用鸡红细胞免疫小鼠后，小鼠巨噬细胞可将其作为异物识别并吞噬。通过染色计数吞噬了鸡红细胞的巨噬细胞的数量可反映巨噬细胞的吞噬功能。当医疗器械/材料作用于机体时，通过检测巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬能力的变化情况，即可评价医疗器械/材料对机体巨噬细胞吞噬功能的影响。

5 试验动物

5.1 动物种属的选择

本试验选择的动物种属为小鼠，雌雄不限。Bal b/c 小鼠是优先推荐的品系。宜使用体重在 18 g～22 g

YY/T 1465.4—2017

成年未生育过且未受孕的小鼠。在试验开始时,动物体重差异宜最小,并不超过平均体重的±20%。当有充分数据证实时,也可以选择其他品系动物。

5.2 动物准备

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。随机选择动物,进行个体标记,并于试验前在实验室条件下适应至少 5 d。

6 样品制备及接触途径

6.1 对于医疗器械中常见的不溶性非降解物质,可根据 GB/T 16886.12 的原则,制备样品浸提液。宜使用适宜的溶剂进行加严浸提,以溶出所有可浸提的组分。浸提液宜当日制备除非有稳定性数据说明贮存的可接受性。按照样品的预期用途,宜按照 GB/T 16886.11 的要求确定样品/浸提液的动物接触方式。常用的动物接触方式可包括灌胃,腹腔注射及静脉注射等。接触剂量及接触时间可参考 GB/T 16886.11 中急性,亚急性,亚慢性及慢性全身毒性试验的要求进行设计,并在最终试验报告中写明。

6.2 对于可降解的医疗器械,应根据预期临床应用方式设计器械与动物接触/免疫方式。当有可获得的研究文献时,可以考虑采用已有文献报道的方法进行试验设计,以与现有数据进行比较。当没有可参考的动物接触/免疫方式时,可考虑与预期临床应用方式相似的植入途径。

6.3 液体试验物质可直接使用或稀释使用。

注:医疗器械中免疫原多为大分子物质,如制备样品浸提液,宜对选用浸提方法的有效性进行说明。

7 对照样品的选择

7.1 阳性对照

推荐使用能够促进巨噬细胞吞噬能力的阳性对照物质包括:100 IU/g 的 γ 干扰素 (IFN- γ) 或 10 mg/kg 植物血凝素 A (PHA);能够抑制巨噬细胞吞噬能力的阳性对照物质包括:5 mg/kg 的地塞米松或 200 mg/kg 的环磷酰胺。也可使用其他经过充分论证的阳性对照试验物质。阳性对照物质的选择及应用方式宜根据受试样品的预期用途及试验目的确定。

7.2 阴性对照

使用 GB/T 16886.12 中推荐的浸提介质(如生理盐水)以与试验样品相同的处理方式进行操作。

注:当存在已知的有长期临床使用史,其免疫毒性水平已被认为可接受且与试验样品组成与预期使用方式均相同的已上市产品时,也可作为阴性对照,但其应用需经充分的论证。

8 试验步骤

8.1 试验分组

将实验动物按照随机原则进行以下分组,每组至少 5 只动物:

- a) 试验样品组;
- b) 阳性对照组;
- c) 阴性对照组。

注:对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,推荐试验样品组采用不同剂量进行试验。

8.2 鸡红细胞悬液制备

新鲜抗凝鸡血,1 000g 离心 5 min 后弃上清,用无菌生理盐水离心洗涤 3 次,弃去上清。用生理盐水将其配制成 5%(体积分数)的鸡红细胞悬液。

8.3 样品及对照接触

样品接触阶段:各实验组动物按本标准第 6 章选定的剂量,途径及周期进行样品接触。阴性对照组动物则按相同的方式以阴性对照品(浸提介质)进行接触。

巨噬细胞吞噬检测试验阶段:样品接触期结束后第 1 天及第 2 天各阳性对照组分别按以上设定总剂量的 1/4 分别注射阳性对照物质,试验组及阴性对照组不进行任何操作。试验开始第 3 天各组各只动物腹腔注射 0.5%淀粉生理盐水溶液 0.5 mL,并于注射后轻揉小鼠腹部以使其分散均匀。试验开始第 4 天及第 7 天各阳性对照组分别按以上设定剂量的 1/4 再次分别注射阳性对照物质,试验样品组及阴性对照组不进行任何操作。

8.4 鸡红细胞免疫

试验第 8 天每只动物腹腔注射 5%的鸡红细胞悬液 0.5 mL。8 h~12 h 后,处死动物,正中剪开腹壁皮肤,腹腔中注入 2 mL 生理盐水,轻揉小鼠腹部 1 min,吸出腹腔洗液 1 mL,分别滴于 2 张载玻片上,放入垫有湿纱布的具盖试验盒中,移至 37℃孵箱中温育 30 min。温育完成,于生理盐水中漂洗,以除去未贴壁的细胞。晾干后以 1:1 丙酮-甲醇溶液固定 5 min,4%(体积分数)Giemsa-磷酸盐缓冲液染液染色 3 min,流水冲洗,蒸馏水漂洗晾干。

9 结果计算

显微镜下计数巨噬细胞,每张片随机计数 200 个,按式(1)、式(2)计算每只动物的吞噬百分率和吞噬指数。

$$\text{吞噬百分率} = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞总数}} \times 100\% \quad \cdots \cdots (1)$$
$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞总数}}{\text{计数的巨噬细胞总数}} \quad \cdots \cdots (2)$$

注 1: 若滴片颜色过深,可用 1% HCl 脱色;过浅则可复染。
注 2: 若腹腔吸出液体为血性渗出液,不宜使用。

10 结果判定

当试验组与阴性对照组在吞噬百分率与吞噬指数上出现具有统计学意义的差异时,可认为试验物质对小鼠巨噬细胞吞噬功能有影响。如使用梯度稀释的材料物质或其浸提液进行试验,出现吞噬百分率与吞噬指数上的剂量效应关系时,提示可能存在对巨噬细胞吞噬功能的影响。

11 可靠性检查

- 11.1 阳性对照是通过使用已证明对巨噬细胞吞噬功能具有促进或抑制作用的物质,来证实试验的适宜性。当需要证实实验室具有进行本试验的能力并能够开展实验室内重复性和实验室间再现性评价时,推荐每次试验都使用阳性对照。
- 11.2 对于经常进行本试验(频率不少于每月一次)并具有长期开展阳性对照的数据证实其具有获得可重复的和准确的阳性结果能力的实验室,可以周期性地(间隔≤6 个月)进行阳性对照试验。

YY/T 1465.4—2017

12 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) 试验动物的品系、年龄和体重；
- d) 试验条件和试验步骤；
- e) 试验结果；
- f) 结果评价；
- g) 结论。

doc88-vuonge

参 考 文 献

- [1] Anderson, JM, Rodriguez, A, Chang, DT., Foreign body reaction to biomaterials, Semin Immunol, 20(2), 86-100.
 - [2] Burleson, GR, Dean JH, and Munson AE., Methods in Immunotoxicology, Wiley-Liss, New York, 1995.
 - [3] 中华人民共和国卫生部药政局.新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药学 药理学 毒理学).北京:中华人民共和国卫生部药政局.1993.
 - [4] 司传平.医学免疫学试验.北京:人民卫生出版社.1999.
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
医疗器械免疫原性评价方法
第 4 部分:小鼠腹腔巨噬细胞吞噬
鸡红细胞试验 半体内法

YY/T 1465.4—2017

*

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.org.cn

服务热线:400-168-0010

2017 年 11 月第一版

*

书号:155066·2-31568

版权专有 侵权必究



YY/T 1465.4—2017