



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0127.16—2009

口腔医疗器械生物学评价 第2单元：试验方法 哺乳动物细胞体外染色体畸变试验

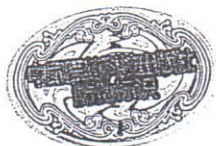
Biological evaluation of medical devices used in dentistry

Part 2: Test method

In Vitro mammalian chromosome aberration test

2009-12-30 发布

2011-06-01 实施



国家食品药品监督管理局

发布

前 言

本标准是口腔医疗器械生物学评价系列标准中的一项标准。

口腔医疗器械生物学评价系列标准中的第一单元,YY/T 0268:2008《牙科学 口腔医疗器械生物学评价 第1单元:评价与试验》是口腔医疗器械生物学评价与试验项目的选择,为指南性标准。

该系列标准的第2单元是口腔医疗器械具体生物试验方法。共分为如下几部分:

1. YY/T 0127.1—93 口腔材料生物试验方法 溶血试验
2. YY/T 0127.2—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 急性全身毒性试验:静脉途径
3. 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
4. YY/T 0127.4—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 骨埋植试验
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. YY/T 0127.9—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 细胞毒性试验:琼脂扩散法及滤膜扩散法
10. YY/T 0127.10—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames 试验)
11. 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
12. 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
13. YY/T 0127.13—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 口腔黏膜刺激试验
14. 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
15. YY/T 0127.14—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 急性经口全身毒性试验
16. YY/T 0127.15—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 亚急性和亚慢性全身毒性试验:经口途径
17. YY/T 0127.16—2009 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 哺乳动物细胞体外染色体畸变试验

本标准为 YY/T 0127 系列标准的第16部分。

本标准为非等效采用 OECD guideline for the testing of chemicals“*In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test” 473-1997 方法。

本标准主要参照 GB/T 16886. 3-2008(ISO 10993. 3-2003)“医疗器械生物学评价试验 第 3 部分 遗传毒性、致癌性和生殖发育毒性试验”中推荐的 OECD guideline for the testing of chemicals“*In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test” 473-1997 方法制定。

本标准给出了具体的染色体畸变观察指标和判断标准。

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标准化技术委员会(SAC/TC 99)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(四川大学)。

本标准参与起草单位:北京大学口腔医学院口腔医疗器械检验中心、上海生物材料研究测试中心。

本标准主要起草人:梁洁、谭言飞、袁墩、邹文、詹杨、朱蔚精、郝鹏、张金、孙姣、陆华。

口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法

哺乳动物细胞体外染色体畸变试验

1 范围

本标准规定了口腔医疗器械哺乳动物细胞体外染色体畸变试验方法的技术要求。

本标准适用于测定口腔医疗器械可能造成的遗传学危害。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注明日期的引用文件,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标准。然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究确定是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

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 16886.3—2008,ISO 10993-3:2003,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)

YY/T 0127.10 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames 试验)

GB 15193.6 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验

OECD guideline for the testing of chemicals 473-1997 “*In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test”

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

染色单体型畸变 **chromatid-type aberration**

染色体结构损伤,表现为一条染色单体断裂或染色单体间的结合。

3.2

染色体型畸变 **chromosome-type aberration**

染色体结构损伤,表现为断裂或重接或两条染色单体在同一位置的损伤和重接。

3.3

核内复制 **endoreduplication**

DNA 复制一个 S 期后的过程,核没有进入有丝分裂,直接开始另一个 S 期。

3.4

有丝分裂指数 **mitotic index**

观察到的发生有丝分裂的细胞数除以观察的细胞总数。

3.5

染色体结构畸变 structural aberration

显微镜下观察到的中期分裂细胞中可识别的结构改变,如缺失、断片、内交换或移位等。

3.6

染色体数畸变 numerical aberration

染色体数目的改变。

3.7

多倍体 polyploidy

单倍体染色体数目(n)的倍数,但不包括二倍体(即 $3n, 4n$ 等等)。

3.8

裂隙 gap

染色单体损伤的长度小于染色单体的宽度。

4 仪器及试剂

4.1 实验室常用设备:洁净工作台, CO_2 恒温培养箱, 恒温水浴箱, 低温高速离心机, 低温冰箱(-80°C 以上)或液氮罐等。

4.2 培养基和试剂

4.2.1 DMEM、RPMI 1640 培养基或其他合适的培养基。

4.2.2 0.1%秋水仙素:置于棕色瓶中,冰箱保存。

4.2.3 pH 7.2 磷酸盐缓冲液:称取 NaCl 8.5g; KCl 0.2g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.85g(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.13g); KH_2PO_4 0.27g;溶于 1000mL 蒸馏水中,用 pH 计测定并调节至 7.2。高压灭菌,冷却后冰箱保存。

4.2.4 D'-Hanks 液:称取 NaCl 8.0g; KCl 0.4g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.06g; KH_2PO_4 0.06g; NaHCO_3 0.35g;酚红 0.02g;溶于 1000mL 蒸馏水中,高压灭菌,冷却后冰箱保存。

4.2.5 0.075mol/L KCl 溶液:称取 KCl 2.795g,加蒸馏水 500mL,灭菌后冰箱保存。

4.2.6 固定液:取甲醇 3 份,冰醋酸 1 份,混匀,临用时配制。

4.2.7 Giemsa 储备液:称取 Giemsa 染料 1g,逐渐加入少许甘油在研钵中研细溶解,共加入甘油 66mL 混匀。于 60°C 温箱中保温 90min。冷却后加入 66mL 甲醇混匀。于室温中静置 1~2 周,过滤,用棕色瓶储存备用。

4.2.8 Giemsa 应用液:取 Giemsa 储备液 1 份,加 pH7.2 磷酸盐缓冲液 9 份,混匀,临用时配制。

5 试样制备

5.1 按产品说明书制备样品,根据 GB/T 16886.12 中的 10.3.2 的原则,制备试样。

5.2 按 5.1 制备的试样不能用于试验系统时应按 GB/T 16886.12 的原则制备浸提液。

注:固化类材料应考虑固化后放置时间对试验结果的影响。

5.3 浸提介质可选用水、生理盐水、无血清培养基等。

5.4 适当时,应使用两种适宜的浸提介质,一种是极性溶剂,另一种是非极性溶剂或适合于医疗器械性质和使用的液体,两种溶剂均应与试验系统相容。

注:常用的非极性溶剂,如 DMSO 等。

6 试验方法

6.1 细胞系

本标准推荐使用 V79 细胞(中国仓鼠肺细胞)、CHO 细胞(中国仓鼠卵巢细胞)和 CHL 细胞(中国仓鼠肺细胞)。这三种细胞均为已建株的细胞,具有能在体外条件下生长形成单层、核型稳定、染色体数目少(V79 细胞 $2n=22\pm1$; CHO 细胞 $2n=22$; CHL 细胞 $2n=25\pm1$)、细胞倍增时间短等特点。也可采用原代细胞或其他已建株的细胞。

6.2 体外代谢活化系统

体外染色体畸变试验应在有和无代谢活化系统的条件下,使细胞与试验物质接触。本标准使用的代谢活化系统为 S9 辅助因子(S9 辅助因子的制备见 YY/T 0127. 10 Ames 试验)。

6.3 染毒剂量(细胞与被检物接触)

在细胞与被检物接触时,应考虑被检物对细胞毒性的影响。至少应设 3 个剂量组,当出现细胞毒性时,所采用的剂量组应包括细胞毒性从大到小或无细胞毒性 3 个剂量组。组距可选择之间的一个值,按等比级数分为 3 个组。但在收获细胞时,最高剂量组应有细胞融合程度的降低,或细胞数和有丝分裂指数的明显降低。低剂量组应无细胞毒性或略有细胞毒性。对于无细胞毒性的被检物,建议按浸提原液的 100%、50%、25% 的浓度分别设置三个剂量组。

6.4 对照

6.4.1 阴性对照:阴性对照可采用被检器械的溶剂或介质。

6.4.2 阳性对照:阳性对照物的浓度应进行选择。对于无外源性代谢活化系统的试验,阳性对照物可采用丝裂霉素(Mitomycin C);4-硝基奎宁氮氧化物(4-Nitroquinoline-N-Oxide);甲基磺酸甲酯(Methyl methanesulphonate);甲基磺酸乙酯(Ethyl methanesulphonate);乙基亚硝基脲(Ethyl nitrosourea)等。对有外源性代谢活化系统的试验,阳性对照可用苯并(a)芘(Benzo(a)prene);环磷酰胺(Cyclophosphamide)等。

6.4.3 阴性和阳性对照都应在有或无代谢活化系统的条件下进行。

6.4.4 必要时还应设置未处理的阴性对照。

6.5 试验步骤

6.5.1 细胞培养

取冻存的细胞,接种于含有 10% 血清、双抗的 RPMI 1640 或 DMEM 生长培养液内或其他适宜的培养液内,使细胞贴壁生长。在 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养至对数生长末期,细胞趋近融合时,去培养液。加 0.25% 胰蛋白酶处理,去胰蛋白酶液,用 D'-Hanks 液洗涤细胞,加新鲜培养液,用滴管轻轻吹打,使成细胞悬液,传代使其贴壁生长。

6.5.2 染毒(被试物与细胞接触)

去培养液,分别加入含有不同剂量被试物或其浸提液的新鲜培养液,在有或无代谢活化系统条件下,置 37℃ 5% CO₂ 温箱继续培养 3~6h。去培养液,用 D'-Hanks 液洗涤细胞。加入新鲜培养液继续培养,大约等于 1.5 个细胞周期。每一剂量组应设 2~3 个平行样。若有或无代谢活化系统的条件下得出阴性结果,则应进行无代谢活化系统条件下继续处理直至样品接触的时间等于大约 1.5 个正常细胞周期。在有代谢活化系统条件下试验结果为阴性,必须视具体情况进行判断。在某些情况下阴性结

果的确认不是必要的,但应提供正当的理由。

6.5.3 细胞分裂中期阻断剂处理

在收获被试物处理的细胞前 1~3h,加入秋水仙素处理细胞,其终浓度不高于 $2.5\mu\text{g/mL}$ 。

6.5.4 培养细胞的收获

分别收获各剂量组的细胞。加入 0.25%胰蛋白酶液处理,使细胞脱壁,并将细胞转移至离心管内,以 $300\sim 500\text{g}$,离心 $8\sim 10\text{min}$,轻轻吸去上清液。

6.5.5 低渗

在离心管中加入预温至 37°C 的 0.075mol/L KCl 5mL,用滴管轻轻吹打。然后在 37°C 温箱中保温 $10\sim 20\text{min}$ 。离心,去上清液。

6.5.6 固定

在离心管中加入新鲜配制的甲醇-冰醋酸固定液 5mL。用细口滴管混匀,置 37°C 温箱中固定 20min 。以 300g ,离心 10min ,去上清液。重复固定 2~3 次。

6.5.7 制片

于上述离心管内,加 0.5mL 固定液,用细口滴管轻轻混匀。在洁净湿冷的玻片上滴 2~3 滴细胞悬液。将玻片自然干燥或风干。每一剂量制备 2~3 张玻片。

6.5.8 染色

配制新鲜的 Giemsa 染色液,即取 Giemsa 储备液 1mL,加磷酸盐缓冲液 9mL,染色 $15\sim 20\text{min}$,取出玻片用水冲洗,空气中自然干燥。

7 观察

7.1 观察要求

7.1.1 在染色体观察前,试验各剂量组、阴性和阳性对照组的玻片应独立编号。

7.1.2 制片过程中,固定操作常常导致部分中期分裂相细胞破裂使染色体丢失。所以,用于分析的细胞分裂相,其染色体数目应为典型的染色体数目 ± 2 。

7.1.3 先在低倍镜下检查制片质量,制片应为全部染色体较集中,而各个染色体分散良好,长短收缩适中,两条单体分开,清楚显示着丝点的位置,染色体呈红紫色。在油镜下进行染色体分析,每一剂量组应分析 200 个分散良好的中期分裂相细胞(有、无代谢活化条件下各计数 100 个细胞)。

7.1.4 本试验是以细胞为单位,因此,应记录和评价带有着丝点染色体结构畸变的细胞百分率。

7.2 观察项目

7.2.1 染色体数目的改变

7.2.1.1 非整倍体:亚二倍体和超二倍体。

7.2.1.2 多倍体:染色体成倍增加。

7.2.1.3 核内复制:每四条染色单体并排的特殊多倍体现象。

7.2.2 染色体结构的改变

7.2.2.1 断裂:损伤长度大于染色体的宽度。

7.2.2.2 微小体:较断片小而成圆形,且比染色单体的宽度小。

7.2.2.3 有着丝点环:带有着丝点部分,两端形成环状结构并有一对无着丝点断片。

7.2.2.4 无着丝点环:成环状结构。

7.2.2.5 断片:一个染色体的两条单体在臂上相同位点发生一次或多次断裂而又未发生重接,产生一个或多个无着丝点断片和一个异常的带着丝点的染色体。

7.2.2.6 双微小体:成对的染色质小体。

7.2.2.7 单体互换:形成三辐体、四辐体或形成多种形状的图像。

7.2.2.8 非特定型变化:如核粉碎化、着丝点细长化、粘着等。

7.2.2.9 裂隙:损伤长度小于染色体的宽度。分别记录和报告裂隙,但一般不包括在总畸变率中。

7.2.2.10 缺失:染色体断裂后,未发生重接,保留下来的带着丝点的节段。

8 结果分析与评价

8.1 数据处理:将各试验组与对照组比较,可采用 X^2 检验。应列表记录各剂量组和对照组染色体畸变的类型及其数目。

8.2 结果判断

8.2.1 阳性结果:试验组与对照组比较,试验结果染色体畸变的细胞率有明显的剂量反应关系,并有统计学意义时,即可判定为阳性结果,若统计学上有显著性差异,但无剂量反应关系,则应进行重复试验。

8.2.2 阴性结果:阳性对照组细胞畸变率显著高于阴性对照组,且任一剂量组与阴性对照组差异均不显著,即可判定为阴性结果。

8.3 结果评价:试验结果为阴性时,即可认为在此试验系统中被试器械为非诱变剂。

参 考 文 献

- [1] GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分:评价与试验(GB/T 16886.1—2001,ISO 10993-1:1997,IDT)
- [2] GB/T 16886.3—2008 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 16886.3—2008,ISO 10993-3:1997,IDT)
- [3] 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)
- [4] YY/T 0127.10 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法:鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames 试验)
- [5] GB 15193.6 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验
- [6] OECD guideline for the testing of chemicals “*In Vitro* mammalian chromosome aberration test”1997
- [7] 李寿祺. 毒理学原理与方法. 第二版. 四川大学出版社,2003

中华人民共和国医药
行 业 标 准
口腔医疗器械生物学评价
第2单元：试验方法
哺乳动物细胞体外染色体畸变试验
YY/T 0127.16—2009

*

中国医药科技出版社出版发行
北京市海淀区文慧园北路甲22号
邮政编码：100082

网址 www.cmstp.com

电话：发行：010—62227427 邮购：010—62236938

三河市腾飞印务有限公司印刷

各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 18 千字

2011年5月第一版 2011年5月第一次印刷

*

书号：145067·58 定价 15.00 元

如有印装差错 由本社发行部调换

版权专有 侵权必究

举报电话：(010)62214756