



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0870.5—2014

医疗器械遗传毒性试验 第 5 部分：哺乳动物 骨髓染色体畸变试验

Test for genotoxicity of medical devices—
Part 5: Mammalian bone marrow chromosome aberration test

2014-06-17 发布

2015-07-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

YY/T 0870 的总标题是《医疗器械遗传毒性试验》，包括以下部分：

- 第 1 部分：细菌回复突变试验；
- 第 2 部分：体外哺乳动物染色体畸变试验；
- 第 3 部分：用小鼠淋巴瘤细胞进行的体外哺乳动物细胞基因突变试验；
- 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。

.....

本部分为 YY/T 0870 的第 5 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分是参考 OECD 475:1997《哺乳动物骨髓染色体畸变试验》并结合医疗器械/材料自身特点制定的。

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。

本部分主要起草单位：国家食品药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心。

本部分参加起草单位：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、四川医疗器械生物材料和制品检验中心。

本部分主要起草人：尹玉霞、黄经春、李春令、韩建民、梁洁。

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 的本部分参照 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 475:1997 方法,用细胞中期分裂相阻断剂(如秋水仙素和秋水仙胺)对实验动物进行处理,通过对处于有丝分裂中期的动物骨髓细胞的染色体畸变情况进行分析,以评价试验样品潜在的致突变性。

YY/T 0870 的本部分用于检测受试物诱发的动物(通常为啮齿类动物)骨髓细胞的染色体畸变。染色体畸变可分为结构畸变和数目畸变两种。其中,结构畸变可分为染色体型和染色单体型。大多数化学致突变物诱导染色单体型突变,但染色体型突变也可发生。YY/T 0870 的本部分不适用于检测数目畸变。

YY/T 0870 的本部分常规使用啮齿类动物。骨髓是靶组织,因为它富含血管,且有大量易于分离和处理的快速循环的细胞。如果有证据表明受试物或其活性代谢产物不能到达靶组织,则 YY/T 0870 的本部分不适用。

医疗器械遗传毒性试验

第 5 部分:哺乳动物 骨髓染色体畸变试验

1 范围

YY/T 0870 的本部分规定了医疗器械/材料哺乳动物骨髓染色体畸变试验方法。

注:口腔材料的哺乳动物细胞染色体畸变试验不包括在 YY/T 0870 本部分范围内。

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 16886.2 医疗器械生物学评价 第 2 部分:动物福利要求

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 16886.11 医疗器械生物学评价 第 11 部分:全身毒性试验

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第 12 部分:样品制备与参照样品

YY/T 0870.2—2013 医疗器械遗传毒性试验 第 2 部分:体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

3 术语和定义

GB/T 16886.1、GB/T 16886.3、GB/T 16886.12 和 YY/T 0870.2—2013 界定的术语和定义适用于本文件。

4 主要设备

压力蒸汽灭菌器、光学显微镜、离心机、恒温水浴箱和解剖器械等。

5 试剂

试剂按 YY/T 0870.2—2013 附录 B 中规定的方法制备或购买市售商品。

6 实验动物

6.1 总则

所有的动物试验应在经国家认可机构批准并符合全部适用实验室动物福利法规的实验室内进行,并且还应符合 GB/T 16886.2 的要求。

YY/T 0870.5—2014

6.2 动物选择

推荐使用健康、初成年的中国仓鼠、大鼠或小鼠。如果已经证实某品系动物对引起染色体结构或数目畸变的供试物检测有足够的敏感性,则此种动物可以选用。每组实验动物数量至少为 10 只,雌雄各半。试验开始时,每种性别实验动物间体重差异宜最小且不超过平均体重的±20%。

注:宜根据器械的预期用途,调整实验动物的性别比例。

7 样品制备

宜根据 GB/T 16886.12 的原则制备试验液,使用适宜的极性和/或非极性溶剂作为浸提介质。若使用未知的浸提介质,应提供其相容性资料。如怀疑试验样品可能对实验动物产生毒性体征或导致有丝分裂指数降低时,应进行预试验。

注 1: ISO10993-3 正在修订,当新的样品制备方法在未来标准中得到确认后即可采用。

注 2: 与经典的化学物全身毒性试验不同,医用材料一般得不到 LD₅₀ 的剂量值。若采用浸提液进行试验,可考虑单剂量组试验(即试验样品原液或 100% 的浸提原液),但宜对试验所采用的剂量范围提供相应的支持性数据。

8 对照样品制备

8.1 阴性对照:同批号试验样品的浸提介质,不加试验样品同条件制备。

8.2 阳性对照:阳性对照组预期在体内产生的畸变应高于本底值。应选择适宜的阳性对照剂量以得到阳性结果。如可能,宜考虑利用与受试物化学结构相关的阳性对照(见表 1)。

表 1 阳性对照物示例

化学物名称	CAS 号
三亚乙基密胺(triethylenemelamine)	[51-18-3]
甲磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate)	[62-50-0]
乙基亚硝基脲(ethyl nitrosourea)	[759-73-9]
丝裂霉素 C(mitomycin C)	[50-07-7]
环磷酰胺一水合物(cyclophosphamide, monohydrate)	[59-18-0 (6055-19-2)]

9 试验步骤

9.1 预试验

如怀疑试验样品可能对实验动物产生毒性时,应进行预试验。宜至少设置 3 个剂量水平,覆盖毒性从最大到小或无毒性。高剂量组应达到不产生动物死亡的最高剂量。最高剂量是指产生毒性体征的剂量,高于该剂量即有可能引起动物死亡。最高剂量也可规定为引起骨髓毒性指标的剂量(如有丝分裂指数降低 50% 以上)。用于确定剂量范围的预试验,步骤应与正式试验相同。

9.2 动物处理

宜根据实验动物的大小来确定一次性最大给液量。推荐按 GB/T 16886.11 中给出的剂量分别对各组实验动物进行腹腔注射或尾静脉注射。对照组采用相同的处理方式,推荐阳性对照组环磷酰胺的

注射剂量为 50 mg/kg。由于供试物的吸收、代谢时间及其对细胞周期动力学的作用都可能影响染色体畸变的最佳检测时间,因此,宜根据细胞周期和不同物质的作用特点,可先做预试,确定取样时间。通常采用两个时间点采样法,第一次采样在末次注射后 12 h~18 h,即相当于 1.5 倍细胞周期的时间。第二次采样时间在第一次采样后 24 h。

动物在处死前,腹腔注射适量的细胞中期分裂相阻断剂(如秋水仙素),然后间隔适宜时间采集骨髓细胞并分析染色体畸变情况。

注:秋水仙素推荐剂量为 4 mg/kg 体重,试验时可视具体情况做适当调整。

9.3 骨髓细胞制备

9.3.1 低渗

以人道方式处死实验动物后,立即从股骨或胸骨采集骨髓细胞,分散细胞并用适当生理溶液(如 2.2% 柠檬酸钠溶液等)清洗,1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,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 °C 水浴中低渗处理 10 min~20 min,加入 1 mL~2 mL 固定液(甲醇:冰醋酸,3:1)混匀。以 1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液。

9.3.2 固定

加入 5 mL~7 mL 固定液,混匀后固定 10 min~20 min,以 1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液。同法再固定 1~2 次,弃去上清液。

9.3.3 滴片

在骨髓细胞中加入数滴新鲜固定液,混匀。将混悬液滴于冰冻的载玻片上,自然干燥。

9.3.4 染色

将滴片用吉姆萨(Giemsa)应用液染色,晾干备用。

9.3.5 阅片

先在低倍镜下选择染色体分散良好的中期分裂相细胞,然后在油镜下观察并记录染色体畸变情况。

10 结果观察

各剂量组(包括阳性对照组和阴性对照组)的每只动物至少分析 1 000 个细胞测定有丝分裂指数,以确定细胞毒性。有丝分裂指数应在各试验室历史数据范围之内。

每只动物应至少分析 100 个分散良好的中期分裂相细胞(染色体数为 $2n \pm 2$),如畸变率很高,观察的细胞数可减少。应记录每一观察细胞的染色体数目,对于畸变细胞还应记录畸变类型。所有的标本片包括阳性对照和阴性对照,在显微镜分析之前应独立编号。

11 推荐的观察项目

11.1 染色体数目的改变

11.1.1 非整倍体:亚二倍体或超二倍体。

11.1.2 多倍体:染色体成倍增加。

11.1.3 核内复制:核膜内的特殊形式的多倍化现象。

YY/T 0870.5—2014

11.2 染色体结构的改变

- 11.2.1 断裂:损伤长度大于染色体的宽度。
- 11.2.2 微小体:较断片小而呈圆形。
- 11.2.3 有着丝点环:带有着丝点部分,两端形成环状结构并伴有一双无着丝点断片。
- 11.2.4 无着丝点环:成环状结构。
- 11.2.5 单体互换:形成三辐体、四辐体或多种形状的图像。
- 11.2.6 双微小体:成对的染色质小体。
- 11.2.7 裂隙:损伤的长度小于染色单体的宽度。
- 11.2.8 非特定性型变化:如粉碎化、着丝点细长化、粘着等。

12 数据处理

每一实验动物作为一个观察单位,每组动物按性别分别计算染色体结构畸变细胞百分率。若雌、雄动物之间无明显的性别感受差异时可合并计算结果。结果数据宜包括有丝分裂指数、畸变细胞数、染色体畸变细胞的百分率、各剂量组及对照组不同类型染色体畸变数与频率等。应分别记录裂隙,但报告时,一般不包括在总畸变频率中。通常用卡方检验进行统计学分析。

13 结果判定

阴性对照组染色体畸变率在正常范围内(通常小于 4.9%),否则应重新试验。

以下两种情况之一即可判定试验样品在本试验条件下具有致染色体畸变性:

- a) 试验样品引起染色体结构畸变数的增加具有统计学意义,并有与剂量相关的增加。
- b) 试验样品在任何一个剂量条件下引起具有统计学意义并有可重复性的阳性反应。

阴性结果表明,在本试验条件下,试验样品不具有致染色体畸变性。

14 结果评价

评价宜从生物学意义和统计学意义两个方面进行。受试样品组染色体畸变率与阴性对照组相比,染色体结构畸变数增加或异常中期分裂相增加,统计学意义上有显著性差异,并呈剂量-反应关系或在一个受试样品组出现染色体细胞畸变数明显增高时,并经重复试验证实,即可认为染色体畸变试验阳性。若统计学上差异有显著性,但无剂量-反应关系,则须进行重复试验,结果能重复者可确定为染色体畸变试验阳性。

多倍体的增加提示受试样品具有潜在的诱导染色体数目畸变的作用。内复制的增加提示受试样品具有潜在的抑制细胞发育的作用。裂隙应分别记录和报告,但一般不计入总的畸变率。

阳性结果提示受试样品可诱导骨髓细胞染色体畸变。阴性结果提示在该试验条件下,供试样品不会引起骨髓细胞染色体畸变。

宜考虑供试样品或其代谢物到达血液循环或靶组织的可能性。

15 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) 实验动物的品系、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。
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
医疗器械遗传毒性试验
第 5 部分：哺乳动物
骨髓染色体畸变试验
YY/T 0870.5—2014

*

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)64275323 发行中心：(010)51780235
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 10 千字
2014 年 11 月第一版 2014 年 11 月第一次印刷

*

书号：155066·2-27561 定价 18.00 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 0870.5-2014