



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0127.9—2001
neq ISO 7405:1997

口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 细胞毒性试验:琼脂覆盖法及分子滤过法

Biological evaluation of dental materials—
Part 2: Biological evaluation test method of dental materials
—Cytotoxicity tests: Agar diffusion test and filter diffusion test

2001-03-12 发布

2001-08-01 实施



国家药品监督管理局 发布

前 言

本标准非等效采用国际标准化组织 ISO 7405—1997《牙科学——用于牙科的医疗器械生物相容性临床前评价——牙科材料试验方法》。

本标准主要依据 ISO 7405:1997《牙科学——用于牙科的医疗器械生物相容性临床前评价——牙科材料试验方法》第 6.1 条“琼脂覆盖试验”及第 6.2 条“分子滤过试验”。为了便于操作,本标准在试验操作中作了一些具体规定及编辑性修改。

本标准废除并替代 YY 91042—1999《牙科复合树脂充填材料》附录 A 中 A2 细胞毒性试验。本标准较前版标准增加了琼脂覆盖法,且在试样制备及评价指标上有所不同。

本标准为 YY 0268—1995《口腔材料生物学评价 第 1 单元:口腔材料生物性能评价导则》提供了具体的方法。

本标准从实施之日起,同时代替 YY 91042—1999《牙科复合树脂充填材料》附录 A 中 A2 细胞毒性试验。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准由全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会归口。

本标准由国家药品监督管理局北医医疗器械质量监督检验中心负责起草。

本标准主要起草人:林红、刘文一、李盛琳。

ISO 前言

本国际标准由 ISO/TC 106 牙科技术委员会与世界牙科联盟(FDI)共同起草,它取代了 ISO/TR 7405:1984,在技术上进行了修改,并转化成本国际标准。

此国际标准是有关用于牙科医疗器械的牙科材料的临床前试验。它是从 ISO/TR 7405:1984《牙科材料生物学评价》及其附件发展而来,并取代 ISO/TR 7405。使用时应与 ISO 10993《医疗器械生物学评价》系列标准结合使用。

此标准在许多重要方面与 ISO/TR 7405 不同。首先它含有一些只针对牙科材料的具体的试验方法。以前在 ISO/TR 7405 中的许多试验方法现在已包含在 ISO 10993 系列标准中,故在此标准中不包含这些方法的细则。其次,仅仅是委员会成员国认为已有足够发表的资料的试验方法才包含在本标准中。第三,推荐试验方法时,首先要考虑尽可能地减少使用动物的原则。

中华人民共和国医药行业标准

口腔材料生物学评价

第2单元:口腔材料生物试验方法 细胞毒性试验:琼脂覆盖法及分子滤过法

YY/T 0127.9—2001
neq ISO 7405:1997

代替 YY 91042—1999 附录 A A2

Biological evaluation of dental materials—

Part 2: Biological evaluation test method of dental materials

—Cytotoxicity tests: Agar diffusion test and filter diffusion test

1 范围

本标准规定了牙科材料细胞毒性试验方法——琼脂覆盖法及分子滤过法。

本标准用于检测牙科材料在通过琼脂或琼脂糖扩散后或通过乙酸钠纤维素滤膜扩散后的非特异性细胞毒性。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 16886.5—1997 医疗器械生物学评价 第5部分:细胞毒性试验:体外法

ISO 7405:1997 牙科学——用于牙科的医疗器械生物相容性临床前评价——牙科材料试验方法

3 细胞系

ATCC CCL1(NCTC clone 929)[小鼠成纤维细胞]或 ATCC CCL2(Hela)[人上皮细胞系]。如能证明反应的重复性和精确性,也可选用其他细胞系。

注:其他替代细胞系见附录 A。

4 培养基及染色液

4.1 培养基

4.1.1 生长培养液

符合选定细胞系生长要求的含血清或无血清培养液。培养液中含对试验无影响的抗生素,pH7.2~7.4。用过滤法灭菌培养液。

[如:制备1×培养基,将90 mL Eagle's MEM(不含L-谷氨酰胺)的pH调至7.2,使用前加10 mL小牛血清,1 mL 100×非必要氨基酸(L-谷氨酰胺)和1 mL抗菌素。]

4.1.2 琼脂培养基

4.1.2.1 制备2×生长培养液

配制双倍浓度的基础培养液(2×)。过滤法灭菌。[例如:将2倍量的Eagle's MEM(不含L-谷氨酰胺)溶于双蒸馏水中,加2 mL L-谷氨酰胺(29.2 mg/mL),调pH至7.2~7.4,加水至80 mL,过滤灭菌,加20 mL小牛血清。]

4.1.2.2 3%琼脂或琼脂糖:用双蒸馏水配制3%琼脂或琼脂糖。高压蒸汽灭菌。

4.1.2.3 琼脂培养基的制备:将3%琼脂或琼脂糖在水浴中加热至100℃,至琼脂或琼脂糖完全溶化为止,然后冷却至48℃。将1份琼脂或琼脂糖与1份新配制的预热至48℃的2×生长培养液混合,使培养基的最终浓度为1×生长培养基。

4.2 制备染色液

4.2.1 用于琼脂覆盖法的活体染色液的制备

4.2.1.1 1%中性红存贮液制备

称取中性红1g,用PBS液100mL溶解。置棕色瓶内,4℃冰箱贮存。

4.2.1.2 活体染色液的制备

临用前制备活体染色液,用0.01mol/L磷酸盐缓冲溶液将1%水溶性中性红存贮液稀释成0.01%。中性红溶液应避光保存。

4.2.2 用于分子滤过法的染色液的制备

4.2.2.1 琥珀酸脱氢酶染色液

可选择以下两种方法制备琥珀酸脱氢酶染色液:

4.2.2.1.1 用1mL琥珀酸盐液,9mL氯化氮蓝四唑溶液及1mL甲基硫酸吩嗪液混合制备染色液。

各存贮液的制备如下:

a) 琥珀酸盐液:琥珀酸钠13.6g,pH7.6的磷酸盐缓冲液100mL;

b) 氯化氮蓝四唑溶液:氯化氮蓝四唑溶液100mg,pH7.6的磷酸盐缓冲液100mL;

c) 甲基硫酸吩嗪液:甲基硫酸吩嗪4g,新配制的去离子水10mL。

4.2.2.1.2 琥珀酸钠	0.06 mol/L	4.0 mL;
磷酸缓冲液	0.2 mol/L	4.0 mL;
林格氏液		2.0 mL;
氯化氮蓝四唑(Nitro BT)	0.2%	10 mL。

注:磷酸盐缓冲液(pH=7.2±2):

磷酸二氢钠 0.2 mol/L 28 mL;

磷酸氢二钠 0.2 mol/L 72 mL。

4.2.2.2 非特异性水解酶染色液

用非特异性水解酶染色时,制备双醋酸盐荧光素存贮液,即在1mL丙酮液中加入5mg双醋酸盐荧光素。使用时取20μL存贮液加入到100mL磷酸盐缓冲液中。

5 设备

5.1 培养皿:直径90mm的组织培养皿(琼脂覆盖法);直径50~60mm的培养皿(分子滤过法)。

5.2 二氧化碳恒温培养箱。

5.3 超净工作台。

5.4 恒温水浴箱(100℃)。

5.5 倒置光显微镜(琼脂覆盖法用)。

5.6 直径47mm,孔径0.45μm的乙酸纤维素滤膜(分子滤过法用)。

6 样本制备

6.1 试样

6.1.1 按厂家要求制备试样。按照GB 16886.5第4章的规定对材料浸提液或试样进行试验。

在分子滤过法试验中,所有试样包括固体,均应放在滤膜上,试样的重量不大于3.5g。

6.1.2 固体材料:制成直径约5mm,厚约2mm的圆片。一面光滑以保证与覆盖的琼脂(琼脂覆盖法)

或滤膜(分子滤过法)紧密接触。

6.1.3 固化类的材料:将刚调和的材料填入内径 5 mm、高 5 mm 的玻璃或聚四氟乙烯环中。

6.1.4 液体试样或浸提液:吸取 0.1 mL 液体于直径为 5 mm 的圆形硼硅酸盐微孔玻璃滤片、医用明胶海绵或其他载体上(浸提液制备见 GB 16886.5—1997 4.2 条)。

6.2 对照样本

对照样本应符合 GB 16886.5—1997 第 3 章的规定。

6.2.1 阴性对照:直径约 5 mm、厚约 2 mm 的氧化铝陶瓷或高密度聚乙烯圆片;或已证明无细胞毒性的其他材料。样本表面光滑。所选阴性对照材料的细胞毒性为 0 级。

6.2.2 阳性对照:含有机锡添加剂的聚氯乙烯或 20% 苯酚溶液浸湿的医用明胶海绵(琼脂覆盖法)。含有机锡添加剂的聚氯乙烯或 20% 苯酚溶液浸湿的直径约为 5 mm 的滤膜或涂有邻苯二甲酸酯的涤纶薄膜(分子滤过法)。所选阳性对照材料的细胞毒性为 ≥ 2 级。

6.2.3 空白对照(分子滤过法用):

6.2.3.1 含单层细胞但无试验材料的滤膜。

6.2.3.2 不含细胞但接触试验材料的滤膜。

7 试验步骤

7.1 琼脂覆盖法

7.1.1 培养细胞直至达到其对数生长期末细胞趋于融合。用胰蛋白酶和/或 EDTA 消化分散细胞。用生长培养液配制成 2.5×10^5 细胞/mL 细胞悬液。

7.1.2 吸取 10 mL 细胞悬液于培养皿中,在 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 含 5% (V/V) CO_2 饱和水蒸气环境下孵育 24 h。

7.1.3 吸出每一培养皿中的生长培养液,用 Hank's 液淋洗单层细胞后,加 10 mL 新制备的琼脂培养基。

7.1.4 待琼脂培养基在室温下凝固(约 30 min)后,加入 10 mL 中性红活体染色液并在暗处保存 15~20 min(有中性红时,培养基应避光保存,否则将损害细胞)。吸除多余的中性红溶液。

7.1.5 在每一培养皿中至少放置两个试样。若使用了浸提介质,还应放一个浸提介质对照。每个样本尽量彼此远离,并远离培养皿壁。将培养皿于 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 含 5% (V/V) CO_2 的饱和水蒸气环境中孵育 24 h。每一试验材料至少应检查四个平行样(如:每一试验材料至少检查两个培养皿)。

7.2 分子滤过法

7.2.1 培养细胞同 7.1.1。活细胞达 90% 以上。

7.2.2 培养皿底部放置灭菌的醋酸纤维素滤膜。

7.2.3 吸取细胞悬液,于每一培养皿(7.2.2)中放置 6 mL。另取一皿,加不含细胞的培养液 6 mL (6.2.3.2)。在 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 含 5% (V/V) CO_2 饱和水蒸气培养箱中培养 24 h。

7.2.4 吸取保存在 48°C 的新制备的琼脂培养基(4.1.2.3) 5 mL 于新的空培养皿中,并在室温下使其凝固。

7.2.5 从经过 24 h 培养含醋酸纤维素滤膜的平皿中(7.2.3)吸除多余的生长培养液。用 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 的磷酸盐缓冲液清洗滤膜,取出滤膜,放于琼脂培养基(7.2.4)表面,细胞面朝下。

7.2.6 在每一平皿的滤膜上放 3~5 个试样。阳性与阴性对照各一个。在含 5% (V/V) CO_2 饱和水蒸气培养箱中于 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 继续孵育 2 h。应保证试样与滤膜表面紧密接触。若 2 h 孵育后试验材料未显示毒性,则重复试验并孵育 24 h 后观察结果。

使用浸提液时,应有浸提介质作空白对照。每一试样至少有四个平行样(每一试验材料至少检查两个培养皿)。

7.2.7 孵育后,去除试样,轻轻将滤膜与琼脂分开,取出滤膜。

8 评价指标

8.1 琼脂覆盖法

8.1.1 用有显微标尺的倒置显微镜观察试验材料和对照的周围褪色区域,并按下列指标计算每一试样的褪色指数和溶解指数,见表1、表2。

a) 褪色指数

表1

褪色指数	观 察
0	未发现褪色
1	只在试样下方有褪色
2	褪色区边缘距试样边缘小于 5.0 mm
3	褪色区边缘距试样边缘在 5.0~10.0 mm 范围内
4	褪色区边缘距试样边缘大于 10.0 mm
5	整个培养区褪色

b) 溶解指数

表2

溶解指数	观 察
0	未发现细胞溶解;
1	细胞溶解小于 20%
2	细胞溶解在 20%~40%
3	细胞溶解大于 40%,小于 60%
4	细胞溶解在 60%~80%
5	细胞溶解大于 80%

8.1.2 计算每一试验材料的平均褪色指数和溶解指数,并按下式表示细胞的反应:

$$\text{细胞反应} = \frac{\text{褪色指数}}{\text{溶解指数}}$$

8.1.3 若试样的四个平行样的指数值在 0~3 范围内相差 2 个单位,应重复试验,但指数为 4 或 5,则不需重复试验。检测浸提液时,应从含试样的浸提介质的平均指数中减去浸提介质的平均指数作为试样的平均指数。若浸提介质的平均指数大于 1,则应选用其他浸提介质重复试验。

注:阴性对照中细胞层完整,为有效的试验。

8.2 分子滤过法

8.2.1 细胞酶活性评价

可选用下面 a)或 b)细胞化学方法评价细胞酶活性减少的面积。

a) 按 Barka 和 Anderson(1963 年)的方法显示琥珀酸脱氢酶活性(酶分类 1.3.99.1)。用琥珀酸脱氢酶染色液浸泡滤膜,继续在 37℃±2℃培养箱中孵育 3 h。测量前用去离子水冲洗滤膜,空气干燥。

b) 用非特异性水解酶染色液浸泡滤膜,继续在 4℃下孵育 30 min,显示非特异性水解酶。在紫外光下检查滤膜。

8.2.2 细胞损害评价

可选用下面 a)或 b)法评价细胞的损害:

a) 测量褪色区面积(如通过图像分析系统);

b) 目测分级。

表 3

分级	观 察	褪色面积
0	整个滤膜染色密度无变化	无
1	染色密度减少区或未染色区的直径小于试样(5 mm)	<20 mm ²
2	未染色区直径为 5~7 mm	20~40 mm ²
3	未染色区直径>7 mm	>40 mm ²

注：阴性对照样本下方的滤膜及对照滤膜经琥珀酸脱氢酶染色后应呈均匀的黑蓝色，经非特异性水解酶染色呈浅绿色。无细胞的对照滤膜可评价试样对滤膜可能产生的影响。

9 结果评价

在结果评价时，应考虑试验中收集的所有信息，尤其是试验与对照组间结果的任何差异。

9.1 琼脂覆盖法

细胞反应是依据至少 4 个平行试验的平均褪色指数和溶解指数。因而细胞反应不必是一整数，用于解释细胞反应的分级应是连续的。

试验材料分级，见表 4：

表 4

分级	细胞反应	说 明
0	0/0	无细胞毒性
1	1/1	轻度细胞毒性
2	2/2~3/3	中度细胞毒性
3	4/4~5/5	重度细胞毒性

9.2 分子滤过法

材料分级，见表 5：

表 5

分级	说 明
0	无细胞毒性
1	轻度细胞毒性
2	中度细胞毒性
3	重度细胞毒性

10 试验报告

试验报告中应包括结果评价。还应包括全部操作的记录，所得结果以及必要的其他数据。也包括试验材料制备及使用方法的详细情况以及材料的批号。

中华人民共和国医药
行 业 标 准
口腔材料生物学评价
第2单元:口腔材料生物试验方法
细胞毒性试验:琼脂覆盖法及分子滤过法
YY/T 0127.9—2001

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

开本 880×1230 1/16 印张 3/4 字数 12 千字
2001年8月第一版 2001年8月第一次印刷
印数 1—800

*

网址 www.bzcbs.com

*

科 目 577—615

版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



YY/T 0127.9—2001