

《组织工程医疗产品 评价基质及支架免疫反应的 试验方法：淋巴细胞增殖试验》（征求意见稿）

编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

根据国家药监局综合司《关于印发 2021 年医疗器械行业标准制修订计划项目的通知》（药监综械注〔2021〕69 号，械注〔2021〕230 号）的有关规定和要求，标准计划项目《组织工程医疗产品 评价基质及支架免疫反应的试验方法：淋巴细胞增殖试验》（项目编号：N2021005-T-zjy）由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会归口，标准起草单位为中国食品药品检定研究院、北京市医疗器械检验所。

（二）工作过程

本标准的编制工作从2020年8月开始，经标准复审后，在原标准（YY/T 0606.15-2014 组织工程医疗产品 第15部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：淋巴细胞增殖试验）的基础上对部分技术内容提出修订计划，并获得2021年行业标准立项。2021年3月，秘书处组织召开标准修订工作启动会（网络会），标准起草小组成员逐条讨论修订内容，形成了标准草案（工作组讨论稿），确定了验证方案，并初步确定标准完成修订的整体工作进度安排。2021年4~7月，起草小组对主要修订技术内容开展验证工作。2021年7月起草小组根据部

分修订技术内容的验证结果，进一步修改和完善标准草案，形成了征求意见稿，于2021年8月9日开始向全体委员和全社会进行广泛征求意见，同时向相关监管部门（国家药品监督管理局医疗器械注册司和监管司、医疗器械技术审评中心、食品药品审核查验中心、药品评价中心）定向征求意见。截止时间为2021年10月8日。

二、标准修订主要依据

（一）本标准编制原则

本标准按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。坚持适用性和有效性为准则，并结合当前行业发展现状与特点，提高标准贯彻实施的实用性和可操作性。

（二）本标准修订的主要依据

原标准 YY/T 0606.15-2014 中制定的采用 ^3H -胸腺嘧啶核苷、MTT 进行的淋巴细胞增殖试验受限于放射性试验条件的限制，或试验终点时不能获取活细胞，无法进一步对其免疫效应进行分析，不能获得受试物引起的特异性增殖的淋巴细胞亚群等信息，因此对该标准进行修订。标准修订的主要技术内容简介如下：

——在“5.3.2 体内抗原刺激方式”亚条款增加注释，“对于可降解组织工程支架材料，宜考虑在不同的降解时间点获取动物标本进行淋巴细胞增殖试验。对于表现出影响淋巴细胞增殖的试验材料，宜考虑其效应的剂量关系，例如进行体内多剂量组试验材料的淋巴细胞增殖试验”。

——在“推荐操作步骤 5.4.5”亚条款中，增加 CCK-8、CFSE 作为淋巴细胞增殖检测方式。

——在“6 数据分析”条款中，增加“CCK-8 检测的光密度值，CFSE 检测的细胞分裂比率、细胞增殖比率、细胞增殖指数和细胞分裂指数”作为分析指标。

——增加资料性附录 A “CFSE 淋巴细胞增殖试验”（见附件）其他编辑性修改详见标准草案。

三. 主要试验验证情况

（一）体外抗原刺激淋巴细胞增殖试验

分离获取 Balb/C 小鼠脾细胞，用含 0.1%BSA 的 PBS 重悬调整细胞浓度为 2×10^7 /mL。细胞悬液分为两份，一份作为无 CFSE 染色的细胞，直接离心沉淀后用含 10% FBS 的培养液重悬并调整细胞浓度为 2×10^6 /mL 后接种 24 孔板，每孔 1 mL，分组设置为细胞对照组、阳性对照组（ConA）、试验材料浸提液组。另一份细胞悬液加入 CFSE（最终浓度为 2 μ M）室温避光染色 7 min，加入含 10% FBS 的预冷培养液终止染色后离心洗涤 2 次。用含 10% FBS 的培养液重悬并调整细胞浓度为 2×10^6 /mL 后加入 24 孔板，每孔 1 mL，分组设置同前。

然后 CFSE 标记和无 CFSE 标记的细胞对照组、阳性对照组和试验材料浸提液组分别加入细胞培养液、含 ConA 的细胞培养液（ConA 终浓度为 2.5 μ g/mL）、试验材料浸提液组。细胞培养板在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳条件下孵育 3 天。

将各组细胞收集在流式管中，离心清洗后，加入 CD45 荧光抗体

染色。然后加入 1 mL 洗涤缓冲液，涡旋，离心清洗，加入 250 μ L PBS 重悬，添加 1 μ M 碘化丙二钠 (PI)，将试管避光 4 $^{\circ}$ C 保存，直到准备好在流式细胞仪上检测。

流式的圈门策略如下：用 FSC-A/SSC-A 圈定淋巴细胞 (R1)，用 PI 染料圈定活细胞 (R2)，用 CD45+ 圈定淋巴细胞 (R3)，用 FSC-A/FSC-H 去除粘连细胞 (R4)，然后获取各组细胞 CFSE 荧光强度为 X 轴，细胞数量为 Y 轴的直方图。用 ModFit 软件分析流式数据，拟合图形并获取细胞增殖比率 (precursor frequency, PF)、细胞分裂比率 (Division percent, D)，通过公式计算细胞增殖指数 (Proliferation index, PI)、细胞分裂指数 (Division index, DI)。

(二) 体内抗原刺激淋巴细胞增殖试验

将 Balb/C 小鼠分为空白对照组、BSA 免疫组、试验材料组。空白对照组进行假手术，BSA 组使用 BSA 加佐剂进行皮下注射免疫，试验材料组在皮下植入试验材料。在设定的时间点，获取各组 Balb/C 小鼠脾脏并分离制备脾细胞。用含 0.1 % BSA 的 PBS 重悬调整细胞浓度为 2×10^7 /mL。各组小鼠细胞悬液分为两份，一份作为无 CFSE 染色的细胞，另一份细胞悬液加入 CFSE (最终浓度为 2 μ M) 染色 (方法同前)。然后均用含 10 % FBS 的培养液重悬并调整细胞浓度为 2×10^6 /mL 后加入 24 孔板，每孔 1 mL。细胞培养板在 37 $^{\circ}$ C、5 % 二氧化碳条件下孵育 3 天、5 天、7 天时，取样制备流式细胞检测样品，进行流式细胞检测和分析 (方法同前)。

(三) 淋巴细胞增殖试验结果

1、流式细胞检测的圈门策略示意图见图 1。

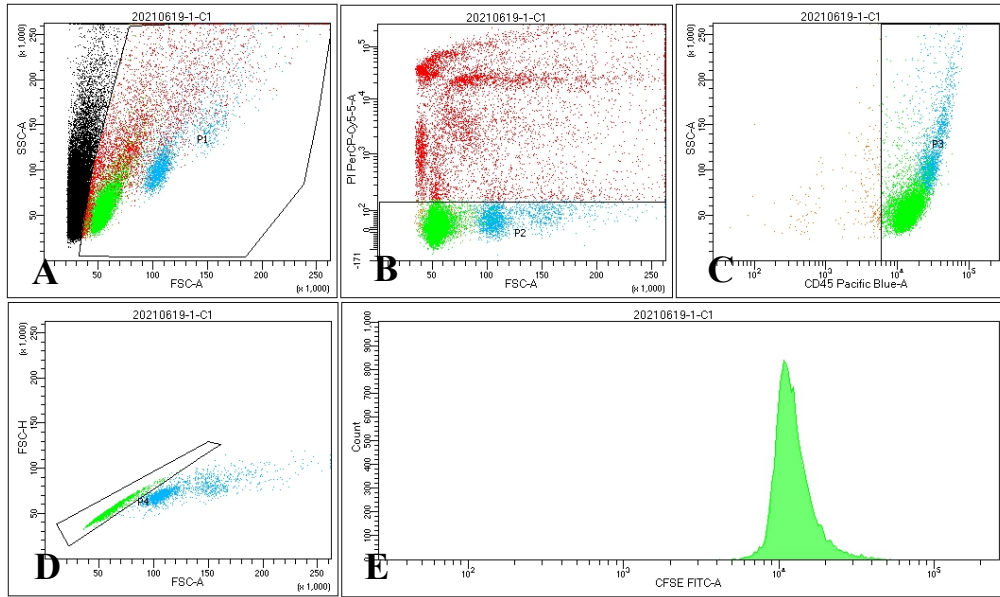


图 1 CFSE 检测淋巴细胞增殖的流式圈门策略

注：A 为 FSC-A/SSC-A 圈定淋巴细胞 (R1)，B 为 PI 染料圈定活细胞 (R2)，C 为 CD45+圈定淋巴细胞 (R3)，D 为 FSC-A/FSC-H 去除粘连细胞 (R4)，E 为细胞 CFSE 荧光强度为 X 轴，细胞数量为 Y 轴的直方图。

2、体外抗原刺激淋巴细胞增殖试验培养 3 天后，各组流式细胞检测结果的示意图见图 2，灰色峰显示无 CFSE 染色的细胞对照组背景荧光信号，绿色峰为 CFSE 染色的未增殖的细胞对照组，红色峰为 CFSE 染色的发生增殖的 ConA 阳性对照组。试验材料浸提液组 CFSE 染色细胞未发生增殖，与细胞对照组的峰重叠（图中未显示）。

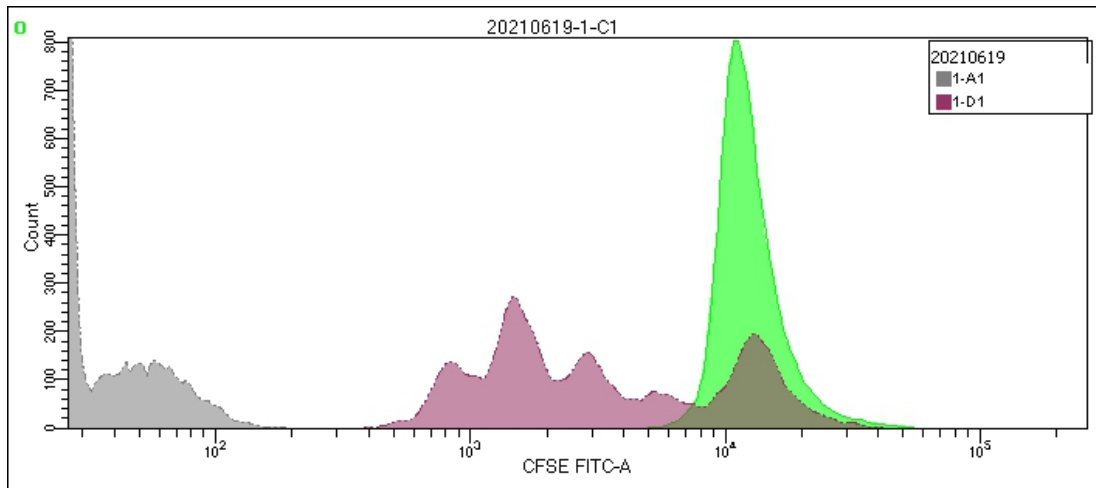


图 2 体外抗原刺激淋巴细胞增殖试验的 CFSE 直方图

体外抗原刺激淋巴细胞增殖试验的流式检测数据用 ModFit 软件进行拟合分析，获得的数据如表 1 所示。3 天时，ConA 组接种的淋巴细胞中有 18.21% 发生了增殖，增殖后产生的淋巴细胞占比为 67.15%，淋巴细胞数量有 2.49 倍的增长，而这是发生增殖的 18.21% 的接种淋巴细胞平均增殖产生 9.18 个细胞的结果。ConA 组的这些指标与细胞对照组相比有明显差异，表明试验中淋巴细胞对有丝分裂原有预期的刺激反应结果，试验体系成立。而材料浸提液组的细胞增殖比率、细胞分裂比率、细胞增殖指数与细胞对照组相比无明显差异，而细胞分裂指数由于细胞增殖比率微小的变化产生了差异，并无明显生物学意义。

表 1 体外抗原刺激淋巴细胞增殖试验数据分析结果

分组 指标	细胞对照组	ConA 组	材料浸提液组 1	材料浸提液组 2
细胞增殖比率 PF	0.03%	18.21%	0.03%	0.07%
细胞分裂比率 D	0.76%	67.15%	0.66%	0.92%
细胞增殖指数	1.01	2.49	1.01	1.01

PI				
细胞分裂指数 DI	22.49	9.18	21.57	13.56

3、体内抗原刺激淋巴细胞增殖试验不同时间点的流式细胞检测结果的示意图见图 3。

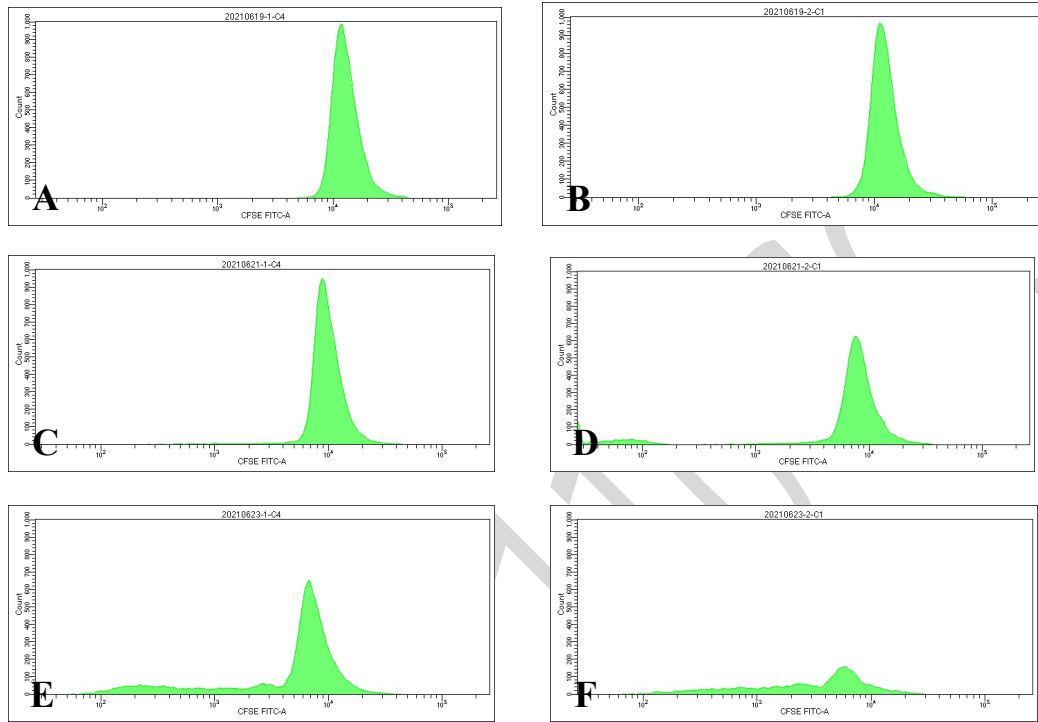


图 3 体内抗原刺激淋巴细胞增殖试验的 CFSE 直方图

注：A、C、E 和 B、D、F 分别是空白对照组与 BSA 组淋巴细胞培养 3 天、5 天、7 天的流式 CFSE 直方图

体内抗原刺激淋巴细胞增殖试验的流式检测数据用 ModFit 软件进行拟合分析，获得的数据如表 2 所示。3 天时，BSA 免疫组小鼠脾淋巴细胞增殖指数、细胞分裂比率等与空白对照组相比无明显差异，而细胞增殖比率、细胞分裂指数的差异由于绝对值很低而无实际生物学意义，表明 3 天时 BSA 免疫组尚未发生阳性刺激反应结果。当培养时间延长至 5 天或更长时，BSA 免疫组小鼠脾淋巴细胞分裂比率、细胞增殖指数、细胞增殖比率等与空白对照组相比出现明显差异，表明体内抗原刺激淋巴细胞增殖试验宜进行 5 天以上的培养，BSA 免疫组

才会出现预期的阳性刺激反应结果，满足试验成立的条件。

表 2 体内抗原刺激淋巴细胞增殖试验数据分析结果

时间	指标	细胞增殖比 率 PF	细胞分裂比 率 D	细胞增殖指 数 PI	细胞分裂指 数 DI
	分组				
3 天	空白对照组	0.11%	1.03%	1.01	9.40
	BSA 组	0.06%	1.22%	1.01	21.36
5 天	空白对照组	0.54%	5.31%	1.05	10.17
	BSA 组	1.17%	15.64%	1.17	15.36
7 天	空白对照组	3.83%	29.71%	1.37	10.16
	BSA 组	9.89%	49.60%	1.79	7.98

四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比的情况。

目前有 ISO 10993.20 及对应的 GB/T 16886.20 等关于医疗器械免疫毒理学试验原则和方法的通用标准，但未涉及淋巴细胞增殖试验的具体试验方法。美国 ASTM 制定了 ASTM F1906-98 (2003) 《在生物相容性试验中使用 ELISA 试验、淋巴细胞增殖和细胞迁移试验进行免疫反应评价的规范》，该标准一直未更新，未包括用 CFSE 进行淋巴细胞增殖试验的方法。YY/T 1465.1-2016 《医疗器械免疫原性评价方法 第 1 部分：体外 T 淋巴细胞转化试验》是在拟修订标准 YY/T 0606.15-2014 《组织工程医疗产品 第 15 部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：淋巴细胞增殖试验》发布后制定的，该标准只提供了体外抗原刺激条件下的医疗器械淋巴细胞增殖试验，且限于对 T 淋巴细胞增殖的分析，所规定的 CFSE 方法中未给出具体全面的数据分析指标，使采用 CFSE 这一新淋巴细胞增殖试验数据无法与采用 ^3H -胸腺嘧啶核苷、MTT 进行试验的历史数据比较，为解释 CFSE 试验结

果的生物学意义带来了困难。本标准在修订时补充了这些方面的技术内容。

五、与有关的现行法令、法规和强制性国家标准、行业标准的关系。

本标准与现有的强制性国家标准、行业标准不冲突。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在起草过程中无重大分歧。

七、作为强制性行业标准或推荐性行业标准的建议。

本标准是评价组织工程医疗产品基质或支架所致细胞免疫反应的淋巴细胞增殖试验方法标准，建议本标准按推荐性标准实施。

八、贯彻行业标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）

标准发布后 6 个月内，将根据各方反馈意见择期召开标准宣贯会议。向监管部门、技术审评部门、检验机构、生产企业等使用单位发放标准宣贯资料，并解答标准中相关技术难点和疑点。建议本标准在发布之日起 6 个月后实施。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

无。

全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会

组织工程医疗器械产品分技术委员会

2021 年 07 月