

《纳米医疗器械生物学评价 遗传毒性试验 体外哺乳动物细胞微核试验》 行业标准编制说明

一、工作简况

(一) 任务来源

根据国家药监局综合司《关于印发 2022 年医疗器械行业标准制修订计划项目的通知》(药监综械注〔2022〕47 号)的规定和要求,标准项目《纳米医疗器械生物学评价 遗传毒性试验 体外哺乳动物细胞微核试验》(项目编号: N2022105-T-zjy)由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会纳米医疗器械生物学评价分技术委员会归口,主要起草单位为中国食品药品检定研究院、四川大学(四川医疗器械生物材料和制品检验中心有限公司)和国家纳米科学中心。

(二) 工作过程

本标准的编制工作从2021年6月开始,秘书处组织成立标准预立项工作小组,提出《纳米医疗器械生物学评价 遗传毒性试验 体外哺乳动物细胞微核试验》的标准立项建议,获得2022年医疗器械行业标准立项。2022年2月11日,秘书处组织标准起草工作组召开标准制定启动会(网络会),经过会议讨论后完善标准工作组讨论稿,并确定标准验证方案。2022年6月30日,秘书处组织标准起草工作组召开标准讨论会(网络会),结合已进行的标准验证工作结果,对标准草案进行修改和完善,形成征求意见稿。

于2022年7月14日~2022年9月14日向全体委员和全社会进行广泛征求意见（中检院网站）。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。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

（一）本标准制定背景

纳米材料医疗器械对人体的潜在风险已受到广泛关注。遗传毒性试验主要用于预测受试物的潜在致癌性风险，是纳米材料医疗器械临床前安全性评价的重要内容。

然而，由于纳米材料自身具有的特殊性质，目前一般的遗传毒性试验用于评价纳米材料的遗传毒性风险时存在局限，即现行的遗传毒性评价方法无法有效而可靠地对其进行评价。经合组织（Organization for Economic Co-operation and Development, OECD）纳米材料产品工作组在2014年发布了《纳米材料产品遗传毒性：OECD专家专题研讨会报告 纳米材料产品安全性系列文件 N0.43》中指出，开展纳米材料的遗传毒性评价时，应在现有针对非纳米材料的评价方法指南性文件的基础上进行一定调整。中检院已经完成国家标准《纳米技术 纳米材料遗传毒性评价试验方法指南》（立项号：20212952-Z-491）的报批，该指南为遗传毒性评价方法选择的总则，为纳米材料医疗器械的研发、安全性评价及监管参考。

作为总则的延续，本文件拟以针对染色损伤的遗传毒性评价方法为切入点，结合纳米材料的遗传毒性特征可能主要表现为致断裂性

(即 DNA 和染色体断裂), 提出适合纳米材料的哺乳动物细胞体外微核试验方法标准。从而为合理地开展纳米材料医疗器械的遗传毒性风险评价提供技术支持。

(二) 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。

(三) 本标准制定参考的主要依据

本标准制定参考的主要依据: 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 16886.12《医疗器械生物学评价 第 12 部分: 样品制备与参照材料》、YY/T 0870.6-2019《医疗器械遗传毒性试验 第 6 部分: 体外哺乳动物细胞微核试验》、《OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG 487: In vitro mammalian cell micronucleus test》、《OECD ENV/JM/MONO (2014)34. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 43. Genotoxicity of Manufactured Nanomaterials: Report of the OECD expert meeting》等。

三、主要试验验证情况

1、TK6 细胞对纳米银摄取情况

验证目的: 考察不同处理条件对 TK6 细胞摄取球状纳米银(Ag40, 粒径约 40nm)能力的影响, 确定适宜的体外微核试验条件。

验证方案：分别使用高光谱显微镜和 ICP-MS 测定不同条件下细胞对 Ag40 的内吞情况。Ag40 浓度范围为 2.5~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，分别设置 4 h/无 S9/无细胞松弛素 C (CytoB)、4 h/无 S9/含 Cyto B、4 h/含 S9/含 Cyto B、24 h/无 S9/含 Cyto B、48 h/无 S9/含 Cyto B 和 72 h/无 S9/含 Cyto B 组。CytoB 使用后处理法，即受试物与细胞处理结束后，更换含 CytoB (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的培养基与细胞共同作用 2 个倍增时间 (24 h) 后收获细胞。

验证结果：Ag40 处理浓度介于 5~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内，在 TK6 细胞内均可定性或定量地检测到银元素 (图 1~2)，提示在上述条件下其可经 TK6 摄取。银元素摄取量与处理浓度成正相关，CytoB 的添加可导致摄取量减少。此外，浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ag40 存在较大细胞毒性。

结论：选择浓度为 5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ag40 开展 CytoB (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 后处理法的体外微核试验。无 S9 条件下细胞与受试物作用约 4 h、24h 和 72h；含 S9 条件下仅作用 4 h。

2、含银纳米材料的体外微核试验方法验证

验证目的：考察含银纳米材料作为体外微核试验中纳米级阳性对照的可行性，探索适宜的体外微核试验条件。

验证方案：人肝 HepaRG 细胞经银包金纳米棒 (Au@Ag NR, 0.8~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，宽 $26.2 \pm 3.0 \text{ nm}$ ，长 $72.7 \pm 8.9 \text{ nm}$ ，厚度约 5 nm) 处理 24h 或 72 后，更换含 CytoB 的培养基继续处理 40 h (1.5~2 倍细胞倍增周期)，考察 Au@Ag NR 对 HepaRG 细胞微核形成率的影响。

验证结果:浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Au@Ag NR 与 HepaRG 细胞作用 24 h 和 72 h 均可导致微核率明显升高（与溶媒对照组比较存在显著性差异， $p < 0.05$ ），结果存在剂量效应相关性，且具有一定的时间依赖性。

结论: Au@Ag NR 可作为基于 HepaRG 细胞的胞质分裂阻断法微核试验中的阳性对照。

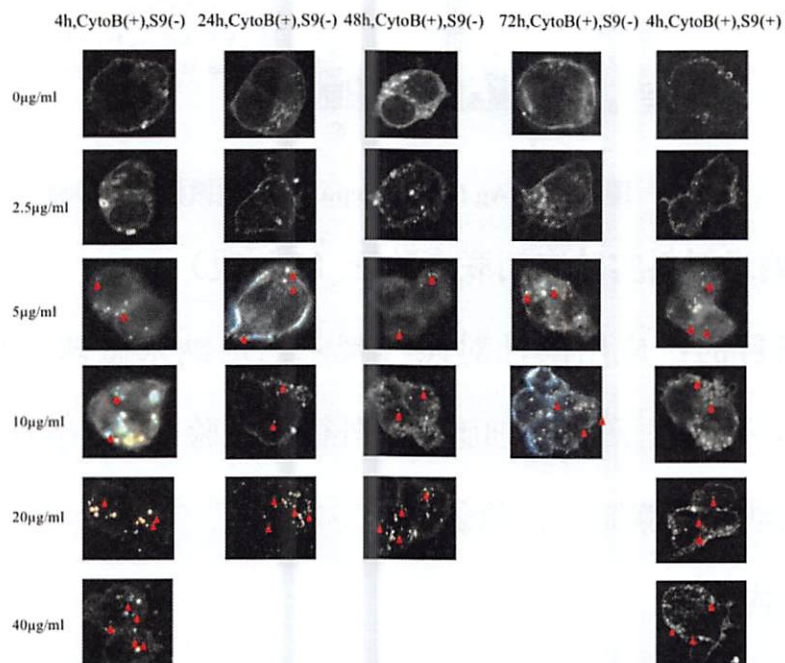


图 1. 高光谱显微镜测定 TK6 细胞中纳米银摄取情况

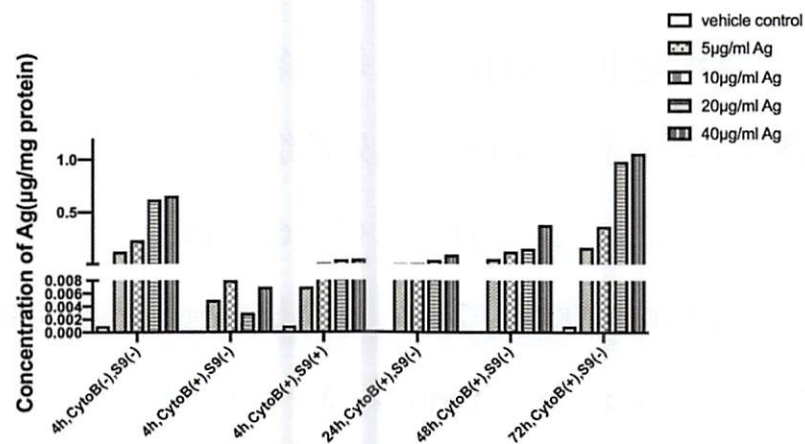


图 2. ICP-MS 法测定不同条件下 TK6 细胞中银元素含量

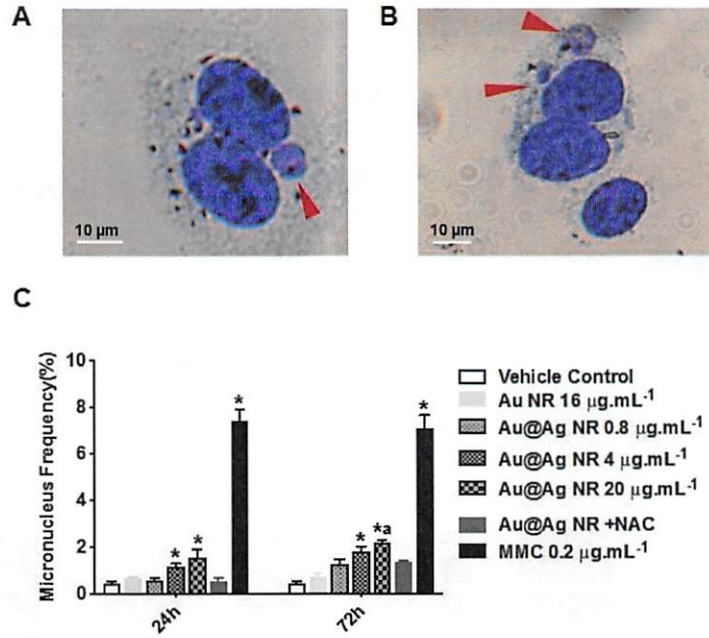


图 3. Au@Ag NR 对 HepaRG 细胞微核率的影响

3、对照纳米材料实验室间联合验证 (I 阶段)

验证目的：应用阴性对照（聚苯乙烯纳米微球）和阳性对照（Ag40），开展基于 TK6 细胞的体外微核试验，确定适宜纳米材料的体外哺乳动物细胞微核试验条件。

验证内容：

1)细胞生长抑制试验：参考前期 Ag40 的细胞毒性及细胞对 Ag40 摄取能力研究数据，选择适宜的浓度范围（5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）开展细胞生长抑制试验，每个条件均设置 3 个浓度组。非代谢活化条件下，短时处理组和连续处理组中细胞与受试物作用约 4 h、24 h 和 72 h，之后更换含 Cyto B（3~6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的培养液继续培养 2 个细胞倍增时间（TK6 为 24 h）后收获细胞。代谢活化条件下，受试物与细胞作用 4 h，并与 Cyto B（3~6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）作用 2 个细胞倍增时间（24 h）后收获细胞。所有处理条件下，均包括溶媒对照组。每

个浓度组设置 2 个平行样。聚苯乙烯纳米微球作为纳米级阴性对照，浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据细胞计数结果，计算 CBPI 或 RI 等来判断细胞毒性，从而设定正式试验给予受试物浓度范围。

2) 胞质分裂阻滞法微核试验：根据细胞生长抑制试验结果设置略高于细胞生长抑制率 50% 的浓度为最高浓度，并等比向下稀释 2 个浓度，确定中、低浓度组。最低浓度条件下细胞应可摄取一定纳米材料。同时设溶媒对照组及阳性对照组，每组设置 2 个平行样。

试验分组情况如下所示：

组 别	-S ₉ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			+S ₉ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	4 h	24 h	72 h	4 h
溶媒对照组/S	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
聚苯乙烯微球 纳米阴性对照/N	20	20	20	20
Ag40 低剂量组/L	5	5	5	5
Ag40 中剂量组/M	10	10	10	10
Ag40 高剂量组/H	20	20	20	20
阳性对照组/P	0.1 (MMC)	0.05 (MMC)	0.02 (MMC)	10 (CP)

细胞处理后收获，经低渗、固定后制片。在 20~40 \times 物镜下对细胞进行观察。每个浓度应至少观察 2000 个双核细胞，分析微核率。

计划 7 月份开展试验。

4、纳米材料医疗器械实验室间联合验证（II 阶段）

验证目的：应用优化后的体外微核试验方法检测纳米材料医疗器械产品的潜在染色体损伤作用。

验证内容：

1) 细胞生长抑制试验: 参考受试物 (纳米银烧烫伤贴) 前期毒性试验结果 (图 4) 设置适宜的浓度范围。以 DMSO 或 H₂O 为浸提介质时, 纳米银烧烫伤贴浸提液体稀释范围为原液至 1:3 稀释情况下与 TK6 细胞共同处理 4 h、24 h 或 72 h, 所有条件下 TK6 的细胞存活率与空白对照组相比均不低于 70 %。正式试验每个条件设置 3 个不同浓度组 (浸提液原液、与浸提介质 1:1 稀释组和 1:3 稀释组)。非代谢活化条件下, 短时处理组和连续处理组中细胞与受试物作用约 4 h、24 h 和 72 h, 之后更换含 Cyto B, 3~6 μg/mL 的培养液继续培养 2 个细胞倍增时间 (24 h) 后收获细胞。代谢活化条件下, 受试物与细胞作用 4 h, 并与 Cyto B (3-6 μg/mL) 作用 24 h 后收获细胞。所有处理条件下, 均设置溶媒对照组。每个浓度组设置 2 个平行样。聚苯乙烯纳米微球和 Ag40 分别作为纳米级阴性对照和阳性对照, 浓度为 20 μg/mL。各组通过细胞计数计算 CBPI 或 RI 等来判断细胞毒性。

2) 胞质分裂阻滞法微核试验: 根据细胞生长抑制试验结果设置略高于细胞生长抑制率 50 % 的浓度为最高浓度, 并等比例向下稀释 2 个浓度, 确定中、低浓度组。最低浓度条件下细胞应可摄取一定纳米材料。

试验分组情况如下所示:

组 别	-S ₉ (μg/mL)			+S ₉ (μg/mL)
	4 h	24 h	72 h	4 h
溶媒对照组/S	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
聚苯乙烯微球 纳米阴性对照/N	20	20	20	20
低剂量组/L	1:3 稀释	1:3 稀释	1:3 稀释	1:3 稀释
中剂量组/M	1:1 稀释	1:1 稀释	1:1 稀释	1:1 稀释

高剂量组/H	原液	原液	原液	原液
AgNP	20	20	20	20
纳米阳性对照组/Ag				
阳性对照组/P	0.1 (MMC)	0.05 (MMC)	0.02 (MMC)	10 (CP)

细胞处理后收获，经低渗、固定后制片。在 20~40×物镜下对细胞毒性进行观察。每个浓度应至少观察 2000 个双核细胞，分析微核率。

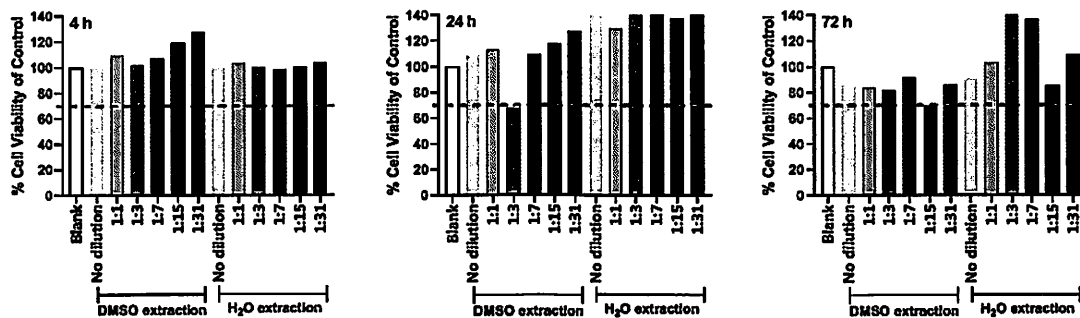


图 4. 纳米银烧烫伤贴浸提液对 TK6 细胞活力的影响

计划 7 月份开展试验。

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。

国内外目前没有针对纳米材料医疗器械的体外哺乳动物细胞微核试验方法标准。为规范纳米材料医疗器械的研发、生产及质量控制，制定本标准。

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。

本标准按照《中华人民共和国标准化法》和相关法规的要求进行编写，符合相关法律、法规。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。

本文件规定了评价纳米材料医疗器械或用于医疗器械的纳米材料的体外哺乳动物细胞微核试验方法，本文件适用于采用永生化细胞胞质分裂阻断法微核试验评价纳米材料医疗器械或用于医疗器械的纳米材料的遗传毒性。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）

建议标准发布后实施前由技委会组织对标准内容进行宣贯。为了标准使用者更好的理解和应用本标准，建议本标准自发布之日起 12 个月后将开始实施。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

无。

全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会
纳米医疗器械生物学评价分技术委员会秘书处

2022 年 7 月