

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

Biological evaluation of nanomaterial medical devices-Test for genotoxicity -In vitro
mammalian cell micronucleus test

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

2022年7月

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

建议标准发布12个月后将开始实施

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	4
2 规范性引用文件	4
3 术语和定义	4
4 细胞、试剂及主要设备	5
5 受试物及对照的准备	5
6 胞质分裂阻断法微核试验	6
7 结果判定、试验数据和报告	6
参考文献	8

TC248SC14143 医药行业标准

前 言

本文件按照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。

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专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件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（SAC/TC248/SC1）归口。

本文件起草单位：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）、国家纳米科学中心。

本文件主要起草人：

引 言

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，目前标准化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。与非纳米尺度的器械产品相比，器械产品中的纳米尺度材料进入细胞的方式有所不同。如，常规的哺乳动物细胞体外微核试验受试物与细胞接触时间较短，且细胞培养/加样处理体系中存在多种阻碍细胞摄取纳米材料的成分。因此，现行的遗传毒性评价方法无法有效而可靠地进行评价。经合组织（Organization for Economic Co-operation and Development, OECD）纳米材料产品工作组（Working Party on Manufactured Nanomaterials, WPMN）在2014年发布的《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。中国食品药品检定研究院（中检院）基于前期研究数据，并参考国际相关遗传毒性指导原则及共识文件，经全国纳米技术和遗传毒理研究领域专家、纳米材料及相关产品的研发机构代表讨论，提出纳米材料遗传毒性评价组合方法，并已完成国家标准《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）的特点，对试验条件进行充分验证后，提出适合纳米材料的哺乳动物细胞体外微核试验方法的标准，为合理地开展遗传毒性风险评价提供技术支持。

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

1 范围

本文件给出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，通过测定细胞暴露于纳米材料医疗器械或用于医疗器械的纳米材料供试液后的含微核细胞数，评价其是否具有潜在遗传毒性风险。

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。

注：其它，如人外周血原代细胞培养法等可参考本方法，但需进行方法学验证。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 16886.3 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 16886.12-2017 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照材料

GB/T 39261 纳米技术 纳米材料毒理学评价前理化性质表征指南

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

YY/T 0993-2015 医疗器械生物学评价 纳米材料 体外细胞毒性试验（MTT试验和LDH试验）

3 术语和定义

GB/T 16886.3及YY/T 0870.6界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

纳米材料医疗器械 nanomaterial medical devices

组合有或含有纳米材料的医疗器械。

[来源：YY/T 0993-2015, 3.1.2]。

3.2

阳性对照 positive control

经充分表征的材料和/或物质，包括阳性对照试剂和阳性对照材料。该物质和/或材料已证实用于体外微核试验时，可在试验系统中得出具有重复性的阳性结果。

[来源：GB/T 16886.12-2017, 3.12, 有修改]。

3.3

阴性对照 negative control

经充分表征的物质和/或材料，包括介质阴性对照和阴性对照材料。该物质和/或材料已证实用于体外微核试验时，可在试验系统中得出具有重复性的阴性结果。

注：受试物的浸提介质或释放介质可作为介质阴性对照；聚苯乙烯纳米微球可作为阴性对照材料。

[来源：GB/T 16886.12-2017, 3.11, 有修改]。

3.4

受试物 test sample

纳米材料医疗器械或用于医疗器械的纳米材料的供试液。

4 细胞、试剂及主要设备

4.1 细胞

中国仓鼠肺细胞系（CHL）、中国仓鼠卵巢细胞（CHO）和中国仓鼠肺细胞系（V79）核型稳定且已积累大量背景数据，是常规体外微核试验细胞系。但啮齿类动物细胞p53基因功能存在缺陷，DNA损伤后修复功能降低，导致基于CHL、CHO和V79开展的体外微核试验假阳性率较高^[1-2]。为避免假阳性结果，也可使用p53基因功能健全的人淋巴细胞系（TK6）开展。

细胞对纳米材料的内吞能力是考察纳米材料是否充分暴露于细胞试验体系的关键^[4]。应使用适宜的技术验证所使用的细胞系对受试物（所含纳米材料）在本试验条件下具有一定内吞能力。

注：CHL和TK6细胞已被证实具有内吞纳米银的能力。

宜定期检测所用细胞的倍增时间及是否存在支原体污染，保证所用细胞状态适宜用于试验。

4.2 试剂及其配制

4.2.1 活化系统

通常使用S9混合液作为活化系统。大鼠肝S9可使用市售产品或按YY/T 0870.6-2019附录A的方法制备，10% S9混合液成分及配制方法见YY/T 0870.6-2019中附录A。

4.2.2 细胞培养液

细胞培养液及组成如下：

- a) 根据采用的细胞系选择适宜的培养液；
- b) CHL细胞通常使用含10%胎牛血清、1%青链霉素的RPMI 1640培养液培养；
- c) TK6细胞通常使用含10%灭活马血清、2%丙酮酸钠和1%青链霉素的RPMI 1640培养液培养。

4.2.3 其他试剂

主要试剂如下：

- a) 磷酸盐缓冲液；
- b) Giemsa染液和固定液等。

配制方法见YY/T 0870.6-2019中附录B。

4.3 主要设备

主要设备如下：

- a) 超净工作台；
- b) CO₂培养箱；
- c) 恒温水浴箱；
- d) 光学显微镜；
- e) 高速离心机；
- f) 压力蒸汽灭菌器等。

5 受试物及对照的准备

受试物及对照的准备如下：

- a) 纳米材料医疗器械：参考YY/T 0870.6-2019，并结合纳米材料医疗器械中纳米材料释放特性及使用方式，进行受试物的制备；

注1：建议同时使用纳米材料原料进行评价，参照5 b)进行制备。

注2：为保证纳米材料在体外试验系统中生物和物理环境中的状态与体内应用时的状态有可比性，可使用现有的方法对受试物暴露于细胞前（浸提液）和暴露于细胞后的细胞培养基中的纳米材料进行表征^[3]，具体参考GB/T 39261等进行表征。表征数据可用于试验结果的解释。

- b) 用于医疗器械的纳米材料、阴性对照材料和阳性对照材料：试验所用的纳米材料浓度范围与其细胞毒性和被细胞内吞的情况有关，应结合纳米材料的特性及应用的生物环境选择适宜的介质，确保纳米材料在受试液中保持良好分散状态且稳定；
- c) 介质阴性对照使用配制受试物的介质；常用阳性试剂对照参见 YY/T 0870.6-2019 表 1；
- d) 空白细胞对照：试验用细胞。

6 胞质分裂阻断法微核试验

6.1 概述

在适宜的条件下，胞质分裂阻断法微核试验可检出纳米材料的遗传毒性风险^[5]。常规试验步骤包括：预试验、接触处理、收获细胞与制片、结果观察等，参照 YY/T 0870.6-2019。

6.2 适合纳米材料的特殊步骤

6.2.1 处理浓度

按以下要求进行处理浓度的设定：

- a) 应包含至少三个处理浓度，每浓度至少包括两个重复。
- b) 最高处理浓度应在培养基中无明显沉淀，且对培养液的 pH 值和渗透压无明显影响。
- c) 根据细胞毒性设置处理浓度范围。细胞毒性使用胞质分裂阻滞增殖指数（cytokinesis-block proliferation index, CBPI）或复制指数（replication index, RI）评估^[6]。
- d) 如浸提液原液或可以给予的最高浓度条件下未见明显细胞毒性（与空白细胞对照组比较相对细胞活力不低于 70%），通常以 2~3 倍设置浓度间隔；否则，可以 5~10 倍间距设置。所选择的浓度范围应包括无细胞毒性浓度至产生中度细胞毒性的浓度，以获得较好的量效关系。如浓度效应曲线较为陡峭，可减小浓度间隔，并使用 3 个以上浓度开展。

6.2.2 培养体系

细胞培养液中多种成分可影响细胞对纳米材料的内吞能力^[4]，如含牛血清的培养液和人白蛋白可增加纳米颗粒的尺寸、减少其电位，并改变 CHL 和 TK6 细胞摄入纳米材料的能力。因此，不建议使用经人血清白蛋白包被的纳米材料进行试验。使用 CHL 细胞开展试验时，受试物处理期间建议使用不含血清的培养液。然而，TK6 细胞需在含血清的培养液中维持生长，受试物处理期间可使用含血清的培养液。

胞质分裂阻断法微核试验添加细胞松弛素 B（CytoB）可干扰细胞骨架的形成，从而影响细胞对纳米材料的内吞作用^[7]。CytoB 的给药方法可采用后处理（细胞与受试物共培养后，更换含 CytoB 的培养液继续作用约 2 个细胞倍增时间）或延迟的共同处理（细胞与受试物共培养后，更换同时含受试物与 CytoB 的培养液继续作用约 2 个细胞倍增时间）的方法，从而保证纳米材料与细胞培养系统在无 CytoB 的情况下充分暴露。CytoB 的给药浓度可参考 YY/T 0870.6-2019。

6.2.3 处理时间

处理时间可能对纳米材料微核检出率有一定影响。为保证纳米材料经细胞充分摄取，需设置 3 h~6 h 处理组（无和有代谢活化）、24 h 处理组（无代谢活化）和 48 h 处理组（无代谢活化），开展体外微核试验。如纳米材料需更长内吞时间（结合内吞能力检测结果进行判定），可设置 72 h 处理组（无代谢活化）。

7 结果判定、试验数据和报告

7.1 结果判定

7.1.1 按照 YY/T 0870.6-2019 进行结果判定。同时应结合细胞对纳米材料的内吞能力对结果进行综合评估。

7.1.2 如试验中设定的所有条件下的所有浓度范围内，细胞可内吞纳米材料，认为基于上述条件的微核试验结果可用于评估纳米材料的染色体损伤风险。

7.1.3 如试验中所设定的所有浓度范围内细胞对纳米材料内吞量均低于检测限且结果为阴性，则认为细胞的遗传物质未能充分暴露于纳米材料，当前结果为假阴性。此种情况下应改变试验条件，或处理浓度，或选择其他适宜的方法评价纳米材料的致染色体损伤风险。

7.1.4 如在纳米材料医疗器械的受试液中的纳米材料含量极低，导致细胞对纳米材料内吞量低于检测限且结果为阴性，应结合其它遗传毒性试验结果和毒理学数据，以及预期临床用途进行综合评价。

7.2 试验数据和报告

试验数据的分析及处理按照 YY/T 0870.6-2019 进行。

试验报告中宜包含以下信息：

- a) 试验样品：
 - 来源、批号；
 - 纳米材料的表征结果；
 - 有效期及受试物在介质中稳定性数据；
 - 受试物在培养基中的 pH、渗透压、沉淀情况等（如果有）。
- b) 介质：
 - 介质选择的合理性说明；
 - 介质占最终细胞培养液体积的百分比。
- c) 细胞：
 - 所用细胞类型、来源、代数；
 - 定期支原体污染及细胞倍增时间检查结果；
 - 细胞培养条件及方法；
 - 当前处理条件下内吞能力检测数据（如使用 CHL 和 TK6 评价纳米银时可不提供）。
- d) 试验条件：
 - 细胞培养液的组分；
 - 细胞培养温度、CO₂ 体积分数、湿度、培养时间；
 - 接种/加样处理时细胞密度；
 - 试验体系中的受试物/阴性对照/阳性对照的最终浓度范围；
 - 受试物/阴性对照/阳性对照处理时间；
 - 是否使用胞质分裂阻断剂，所用试剂信息、浓度、处理时间、与受试物同时添加或分别添加；
 - 代谢活化系统类型和组成（S9 来源、S9 混合物制备方法、S9 混合物的终体积等）
 - 制片方法；
 - 染色方法；
 - 细胞毒性检测方法及分析细胞数量；
 - 含微核细胞计数标准及分析细胞数量；
 - 结果判定标准。
- e) 结果：
 - 试验体系中是否有沉淀、析出等异常情况；
 - 细胞毒性检测结果，如 CBPI 或 RI 计数结果等；
 - 各组含微核细胞计数结果；
 - 是否存在剂量——效应关系；
 - 组间统计结果；
 - 实验室阴性对照和阳性对照的历史背景数据；
 - 结果讨论与分析。
- f) 结论。

参 考 文 献

- [1] Kirkland D, Pfuhler S, Tweats D, *et al.* How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop[J]. *Mutation Research/genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis*, 2007, 628(1):31-55.
- [2] Müller L. In-vitro genotoxicity tests to detect carcinogenicity: a systematic review[J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2009, 28(2-3):131-133.
- [3] 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 [EB/OL]. 2014, [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2014\)34&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2014)34&doclanguage=en), 2014.12.3/2018.1.10.
- [4] Drewes C, Ojea Jimenez I, Méhn D, *et al.* Physicochemical characterisation of gold, silica and silver nanoparticles in water and in serum-containing cell culture media [EB/OL].2018, <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC110379>.
- [5] Gonzalez L, Sanderson B J S, Kirsch-Volders M. Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials [J].*Mutagenesis*, 2011, 26(1):185-91.
- [6] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG 487: In vitro mammalian cell micronucleus test [EB/OL] , 2016. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264861-en.pdf?expires=1604676802&id=id&accname=guest&checksum=2038D3E32814FFBCFBB61E0BDB0C96D3>, 2016-7-29/2020-10-26.
- [7] Willmann W, Dringen R. Monitoring of the Cytoskeleton-Dependent Intracellular Trafficking of Fluorescent Iron Oxide Nanoparticles by Nanoparticle Pulse-Chase Experiments in C6 Glioma Cells[J]. *Neurochemical Research*, 2018, 43:2055-2071.
-