



中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX

眼科光学 接触镜和接触镜护理产品 基于 接触镜结合接触镜护理液评价其相互作用的 细胞毒性试验

Ophthalmic optics — Contact lenses and contact lens care products — Cytotoxicity testing of contact lenses in combination with lens care solution to evaluate lens/solution interactions

(ISO 18189:2016, IDT)

征求意见稿

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。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 接触镜结合接触镜护理液的直接接触细胞毒性试验	1
6 结果评估	5
7 试验报告	5
附录 A（规范性） 接触镜结合接触镜护理液的直接接触细胞毒性试验中的细胞裂解区域测量	6
参考文献	8

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。

本文件等同采用ISO 18189:2016《眼科光学 接触镜和接触镜护理产品 基于接触镜结合接触镜护理液评价其相互作用的细胞毒性试验》。

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。

本文件由全国光学和光子学标准化技术委员会医用光学和仪器分技术委员会（SAC/TC 103/SC 1）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

眼科光学 接触镜和接触镜护理产品 基于接触镜结合接触镜护理液 评价其相互作用的细胞毒性试验

1 范围

本文件规定了用于评价接触镜与接触镜护理液相互作用可产生的潜在细胞毒性作用的一种体外试验方法。

本文件适用于接触镜与接触镜护理液产品。

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。

ISO 18369-1 眼科光学 接触镜 第1部分：词汇、分类系统和推荐的标识规范（Ophthalmic optics—Contact lenses—Part 1: Vocabulary, classification system and recommendations for labelling specifications）

注：GB/T 11417.1-2012 眼科光学 接触镜 第1部分：词汇、分类和推荐的标识规范（ISO 18369-1:2006，MOD）

3 术语和定义

ISO 18369-1界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

室温 room temperature

室温定义为18℃~25℃。

4 原理

接触镜护理液中的化学物质可能通过直接接触或通过接触镜间接接触眼部组织而引起细胞毒性反应。接触镜对护理产品防腐剂或其他溶液成分的吸收以及这些化学物质随后在眼部环境中的释放可能损害眼部的生物相容性。在设计试验时宜考虑接触镜护理产品和各种接触镜材料之间的潜在相互作用，以全面评价某种新型接触镜或接触镜护理产品的潜在细胞毒性。

5 接触镜结合接触镜护理液的直接接触细胞毒性试验

5.1 通则

以下方案描述了评价浸泡在接触镜护理液中的接触镜潜在细胞毒性的试验方法。细胞毒性可能来自接触镜和接触镜护理液的相互作用。

除日抛型接触镜外,应评价新型接触镜与市售代表性多功能护理液的潜在相互作用产生细胞毒性的可能性。

为了评价新型接触镜护理液,应评价新型接触镜护理液与代表性接触镜的潜在相互作用产生细胞毒性的可能性。

5.2 试验步骤

5.2.1 基本步骤

将测试的接触镜置于装有约10mL接触镜护理液的无菌相容容器中,在室温下孵育 $24\text{h}\pm 2\text{h}$ 。同样,在室温下,在相同类型的容器中,将接触镜在约10mL的杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)中孵育 $24\text{h}\pm 2\text{h}$,以制备用含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的DPBS处理过的对照接触镜(“接触镜对照”)。

本文件中,相容容器是指几乎不吸收消毒剂和/或防腐剂的容器。用接触镜护理产品润洗容器可减少容器的吸收。

浸泡 $24\text{h}\pm 2\text{h}$ 后,可以风车方式切割接触镜(大约在接触镜的 $1/3\sim 1/2$ 处切3~4刀)并立即用于细胞毒性试验。如果不切开接触镜,应以凹入的方式置于细胞上。将每片接触镜置于直径为60mm的组织培养板中细胞表面的中心,该培养板中含有近汇合单层L-929细胞,培养于含5%胎牛血清(FBS)的1.6mL最低限量基本培养基(MEM)中。

同样,将阴性和阳性对照置于含有近汇合单层L-929细胞的直径为60mm的组织培养板中,培养于含5% FBS的1.6mL MEM中。

将组织培养板在 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $5\%\pm 1\%$ 二氧化碳(CO_2)培养 $24\text{h}\pm 2\text{h}$ 。

培养结束后,将接触镜和对照组从每个培养板中取出,用台盼蓝对细胞进行染色,以方便观察死亡或受损细胞。细胞毒性的评估是通过评价测试材料和对照材料周围细胞在肉眼和显微镜下(100倍)是否有任何异常的细胞形态以及裂解,并确定裂解区(若有)。

5.2.2 材料

5.2.2.1 细胞系

L-929 细胞【NCTC 克隆 929: CCL 1, 美国典型培养物保藏中心(ATCC), 美国弗吉尼亚州马纳萨斯; ECACC No. 88102702 或等同物, 欧洲认证细胞培养物保藏中心, 英国威尔特郡索尔兹伯里, 邮编 SP4 0JG】。细胞培养物应不含支原体。

用于试验的细胞的传代数宜在 10~30 代以内。

5.2.2.2 技术设备

5.2.2.2.1 培养箱, $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿化, $5\%\pm 1\%$ 二氧化碳(CO_2)/空气。

5.2.2.2.2 层流柜: 生物安全标准。

5.2.2.2.3 水浴, 37°C 。

5.2.2.2.4 倒置相差显微镜。

5.2.2.2.5 实验室喷灯。

5.2.2.2.6 离心机。

5.2.2.2.7 实验室天平。

5.2.2.2.8 细胞计数仪或血细胞计数器。

5.2.2.2.9 组织培养瓶和直径 60mm 的组织培养板。

5.2.2.2.10 移液器。

5.2.2.2.11 移液管。

5.2.2.3 化学物、培养基和血清

- 5.2.2.3.1 依格尔最低限量基本培养基（MEM）。
- 5.2.2.3.2 胎牛血清（FBS）。
- 5.2.2.3.3 胰蛋白酶/乙二胺四乙酸（EDTA）溶液。
- 5.2.2.3.4 含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的杜氏磷酸盐缓冲液（DPBS）。
- 5.2.2.3.5 青霉素/链霉素溶液。
- 5.2.2.3.6 台盼蓝。

5.2.3 测试样品的制备

接触镜宜用镊子无菌拿取。在室温下，将每个接触镜单独浸泡于装有约10mL适当的接触镜护理液的无菌相容容器中 $24\text{h}\pm 2\text{h}$ ，并轻轻搅拌（在振荡器上以约50r/min的速度持续搅拌）。宜遵循无菌操作流程。

每个接触镜在浸泡 24h 后可立即以风车方式切割（在接触镜的 $1/3\sim 1/2$ 处切 3~4 刀）。以垂直方式取接触镜，并将其边缘轻敲在无菌纱布上去除多余的液体并立即用于细胞毒性试验。如果接触镜没有被切割，应以凹入的方式置于细胞上。细胞毒性试验方法见 5.2.4.3。

5.2.4 方法

5.2.4.1 通则

细胞宜使用常规细胞培养方法进行维持和培养。

5.2.4.2 试验质量检查：阳性对照、阴性对照和接触镜对照

5.2.4.2.1 通用要求

每组试验都应包括阳性对照、阴性对照和接触镜对照。

5.2.4.2.2 阳性对照

推荐使用乳胶手套作为阳性对照。应在每个阳性对照组织培养板中的细胞上放置一块 $1\text{cm}\times 1\text{cm}$ 的阳性对照进行试验。也可以使用其他经过验证的阳性对照。

5.2.4.2.3 阴性对照

推荐使用高密度聚乙烯（HDPE）（厚度 0.5mm）作为阴性对照。应在每个阴性对照组织培养板中的细胞上放置一块 $1\text{cm}\times 1\text{cm}$ 的阴性对照进行试验。也可以使用其他经过验证的阴性对照。

5.2.4.2.4 接触镜对照

应将浸泡在 DPBS 中的被测接触镜作为接触镜对照。接触镜宜用镊子无菌拿取。在室温下，将每个接触镜单独浸泡在装有约 10 mL DPBS 溶液的无菌相容容器中 $24\text{h}\pm 2\text{h}$ ，并轻轻搅拌（在振荡器上以约 50r/min 的速度持续搅拌）。宜遵循无菌操作程序。

每个接触镜在浸泡 $24\text{h}\pm 2\text{h}$ 后可立即以风车方式切割（在接触镜的 $1/3\sim 1/2$ 处切 3~4 刀）。以垂直方式取接触镜，并将其边缘轻敲在无菌纱布上去除多余的液体并立即用于细胞毒性试验。如果镜片没有被切割，它应以凹入的方式置于细胞上。细胞毒性试验方法见 5.2.4.3。

5.2.4.2.5 试验可接受标准

应满足以下试验可接受标准，则试验有效：

- a) 阴性对照在所有四个孔板中的等级应 ≤ 1 。
- b) 接触镜对照在所有四个孔板中的等级应 ≤ 1 。
- c) 阳性对照在所有四个孔板中的等级应 ≥ 3 。

对反应等级的描述见表 1。

5.2.4.3 试验步骤

5.2.4.3.1 将 L-929 细胞以每板约 6×10^5 个细胞的密度接种到直径 60mm 的组织培养板中，置于 6mL 含 5%FBS 的 MEM 培养基中，在 $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$ 环境下培养约 24h，以在使用前获得近汇合单层细胞。如果 MEM 培养基中使用了抗生素，宜记录在工作表中。

5.2.4.3.2 开始试验前，在显微镜下（100 倍）验证培养物的近汇合（约 80%）和形态。每个测试材料和对照材料都应在四份培养物中培养（即带有细胞的 4 个 60mm 培养板）。每个板中应只放置一个测试材料/对照材料。

5.2.4.3.3 将每个板中的培养基丢弃并用 1.6mL MEM 代替。

5.2.4.3.4 将测试材料/对照材料放在指定培养板中细胞表面的中心。

将已在 10mL 接触镜护理液中浸泡 $24\text{h} \pm 2\text{h}$ 并可按照 5.2.3 中所述以风车方式切割的接触镜，放置在四个 60mm “待测样品” 组织培养板上的细胞表面中心。

将 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 的乳胶（阳性对照）放置在四个 60mm “阳性对照” 组织培养板的细胞表面中心。

将 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 的 HDPE（阴性对照）放置在四个 60mm “阴性对照” 组织培养板的细胞表面中心。

将已在 10mL DPBS 溶液中浸泡 $24\text{h} \pm 2\text{h}$ 并可按照 5.2.4.2.4 中所述以风车方式切割的接触镜，放置在四个 60mm “接触镜对照” 组织培养板的细胞表面中心。

为了帮助评估测试材料/对照材料的移动情况，宜在每个板的底部在测试材料/对照材料的大致中心位置用一个点来标记。

5.2.4.3.5 培养板在 $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ， $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$ 条件下培养 $24\text{h} \pm 2\text{h}$ 。

在处理过程中宜格外小心，尽量减少接触镜的移动，因为可能会对细胞造成物理损伤。此外，如果接触镜没有留在原位，则难以准确测量接触镜周围的反应区。

5.2.4.3.6 培养结束后，从每个板中取出接触镜和对照材料，并用 1.6mL 含 0.4% 台盼蓝的 DPBS 替换每个板中的培养基以染色死细胞。

为了便于测量样品以外的裂解区域，在从板中取出测试材料和对照材料之前，宜在板底部标记测试材料和对照材料边缘的位置。

5.2.4.3.7 在室温下将细胞暴露在台盼蓝溶液中约 2min。

5.2.4.3.8 去除台盼蓝溶液并用 1.6mL DPBS 冲洗细胞。

5.2.4.3.9 用肉眼和显微镜（100 倍）检查细胞是否有异常的细胞形态及测试材料和对照材料周围的裂解情况，并确定裂解区域（若有）。台盼蓝有助于观察死亡或受损细胞；膜损伤和死细胞会吸收台盼蓝，因为它是一种排斥染料。与阴性对照和接触镜对照板上的细胞相比，死亡或膜受损的细胞会呈现蓝色。

5.2.4.3.10 使用表 1 中描述的标准评估细胞毒性。如果观察结果大于 2 级，则被认为是具有细胞毒性作用。附录 A 用于指导如何测量细胞裂解区。

表 1 反应性等级

等级	反应性	所有细胞培养物的情况
0	无	试样周围或下方未检测到反应的区域
1	轻微	试样下方有一些畸形或退化细胞

2	轻度	反应区域仅限于试样下方区域
3	中度	试样以外的反应区域，可超出试样至多 10mm

表1 反应性等级（续）

等级	反应性	所有细胞培养物的情况
4	严重	反应区域超出试样以外 10mm

6 结果评估

应由有能力根据试验数据作出判定的人员进行结果的总体评估。任何细胞毒性作用都可能引起关注。然而，该结果主要是表明潜在的体内毒性，不能仅根据细胞毒性数据确定该器械不适于特定的临床应用。细胞毒性数据应根据其他生物相容性数据和产品的预期用途进行评估。

7 试验报告

试验报告应至少包括以下信息：

- a) 试验机构名称和地址；
- b) 试验操作者姓名；
- c) 试验开始和结束日期；
- d) 遵守适用的良好实验室规范的声明；
- e) 测试材料和所有对照材料的名称和完整描述；
- f) 细胞系、传代数 and 细胞来源；
- g) 培养基、血清和抗生素（如添加）的公司名称和批号；
- h) 试验方法；
- i) 细胞反应和其他观察结果；
- j) 结果评估所需的任何其他相关数据。

附录 A (规范性)

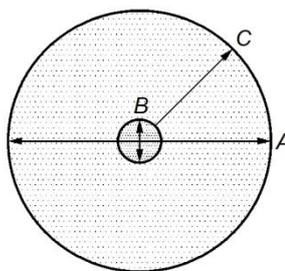
接触镜结合接触镜护理液的直接接触细胞毒性试验中的细胞裂解区域测量

A.1 培养板布局

图 A.1 描述了培养板的布局。其中较大的圆圈描绘了直径为 60mm 的孔板。例如，假设置于孔板上的样品的直径约为 10mm (图 A.1 中的小圆圈)，这使得从样品的边缘到孔板的边缘在任何方向都有约 25mm 的长度。

裂解区域定义为超出样品 (小圆圈) 区域外的细胞裂解，如图 A.1 中的对角线 C 所示。因此，裂解区域不宜超过 25mm。可以从样品边缘到裂解边缘进行多次测量，以确保用于评价的裂解区域是准确的。

如果裂解似乎仅在一个方向上超出接触镜之外 (例如，如果接触镜在培养过程中移位或培养板略微倾斜)，宜在四个方向上分别进行测量，并宜使用这些测量值的平均值来确定等级。



标引序号说明：

A——60mm 直径孔板的水平线；

B——置于孔板的约 10mm 举例样品的垂直线；

C——显示从 10mm 样品边缘到 60mm 直径孔板边缘距离为约 25mm 的对角线。

图 A.1 培养板布局

A.2 0~2 级

—— 0 级：无反应性。孔板中没有细胞裂解或毒性的证据。

—— 1 级：轻微反应性。在放置样品的区域 (图 A.1 中的小圆圈) 下方有一些 (部分) 细胞裂解或毒性的证据。

—— 2 级：轻度反应性。在放置样品的区域 (图 A.1 中的小圆圈) 下方有全部 (完全) 细胞裂解或毒性的证据。

在确定 1 级或 2 级时，该毒性应仅出现在样品 (图 A.1 中的小圆圈) 下方。这也表明没有裂解区 (0 mm)。

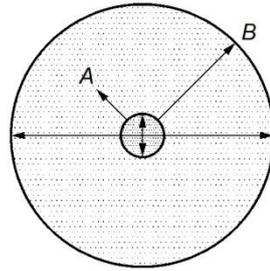
A.3 3 级和 4 级

一旦裂解超出了样品放置在孔板中的区域 (超出图 A.1 和图 A.2 中的小圆圈进入大圆圈区域)，就会存在一个裂解区域。

不超过 10mm 的裂解区域为 3 级 (图 A.2 中左上角的对角线 A 代表 10mm)。

大于 10mm 的裂解区域为 4 级 (超出图 A.2 中左上角的对角线 A)。

可能的最大裂解区域约为 25mm (图 A.2 中右上角的对角线 B)。



标引序号说明：

A——10 mm裂解区域的对角线；

B——最大可能裂解区域约为 25 mm 的对角线。

图 A. 2 3 级和 4 级的示意图

参 考 文 献

- [1] ISO 10993-1 Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process
 - [2] ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
 - [3] ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
 - [4] OECD 1997 OECD Principles of Good Laboratory Practice, No.1
-