



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0870.9—202X

医疗器械遗传毒性试验 第9部分：哺乳动物红细胞 Pig-a 基因突变试验

Test for genotoxicity of medical devices—Part 9: Mammalian erythrocyte Pig-a gene mutation assay

征求意见稿

(2025.6)

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

国家药品监督管理局 发布

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。

本文件是YY/T 0870《医疗器械遗传毒性试验》的第9部分。YY/T 0870已经发布了以下部分：

- 第1部分：细菌回复突变试验；
- 第2部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验；
- 第3部分：用小鼠淋巴瘤细胞进行的 TK 基因突变试验；
- 第4部分：哺乳动物骨髓红细胞微核试验；
- 第5部分：哺乳动物骨髓染色体畸变试验；
- 第6部分：体外哺乳动物细胞微核试验；
- 第7部分：哺乳动物体内碱性彗星试验；
- 第8部分：体内哺乳动物肝细胞程序外 DNA 合成试验；
- 第9部分：哺乳动物红细胞 Pig-a 基因突变试验。

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。

本文件由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会（SAC/TC 248）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

GB/T 16886.3中给出的检测潜在遗传毒性物质的试验方法，未给出详细的试验步骤，因此不适宜直接用于医疗器械/材料的检测。YY/T 0870根据医疗器械的特性给出了主要的试验步骤，可作为GB/T 16886.3中遗传毒性试验的补充方法标准。

本文件提供了一种评价医疗器械产生的哺乳动物体内遗传毒性效应的方法，以确定医疗器械可能产生的DNA损伤及修复情况。

YY/T 0870旨在建立医疗器械遗传毒性的具体试验方法，拟由9个部分构成。

- 第1部分：细菌回复突变试验。目的在于给出医疗器械/材料细菌回复突变试验的详细试验方法。
- 第2部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验。目的在于给出医疗器械/材料体外哺乳动物细胞染色体畸变试验的详细试验方法。
- 第3部分：用小鼠淋巴瘤细胞进行的TK基因突变试验。目的在于给出医疗器械/材料用小鼠淋巴瘤细胞进行的TK基因突变试验的详细试验方法。
- 第4部分：哺乳动物骨髓红细胞微核试验。目的在于给出医疗器械/材料哺乳动物骨髓红细胞微核试验的详细试验方法。
- 第5部分：哺乳动物骨髓染色体畸变试验。目的在于给出医疗器械/材料哺乳动物骨髓染色体畸变试验的详细试验方法。
- 第6部分：体外哺乳动物细胞微核试验。目的在于给出医疗器械/材料体外哺乳动物细胞微核试验的详细试验方法。
- 第7部分：哺乳动物体内碱性彗星试验。目的在于给出医疗器械/材料哺乳动物体内碱性彗星试验的详细试验方法。
- 第8部分：体内哺乳动物肝细胞程序外DNA合成试验。目的在于给出医疗器械体内哺乳动物肝细胞程序外DNA合成试验的详细试验方法。
- 第9部分：哺乳动物红细胞Pig-a基因突变试验。目的在于给出医疗器械哺乳动物红细胞Pig-a基因突变试验的详细试验方法。

医疗器械遗传毒性试验 第9部分：哺乳动物红细胞Pig-a基因突变试验

1 范围

本文件规定了医疗器械/材料遗传毒性试验中的哺乳动物红细胞Pig-a基因突变试验方法。

本文件适用于通过测定医疗器械/材料引起的哺乳动物体内红细胞膜蛋白缺失的细胞频率，筛选医疗器械/材料是否具有潜在的遗传毒性作用。

注：纳米材料的体内哺乳动物肝细胞程序外DNA合成试验可能需要对本文件中的方法进行特定的修订，但本文件未给予描述。

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 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分：动物福利要求

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

3 术语和定义

GB/T 16886.3和GB/T 16886.12界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

4 试验原理

大鼠体内红细胞磷脂酰肌醇聚糖 A 类（Pig-a）基因突变可导致附着在细胞外表面的糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚定蛋白缺失，使用荧光素标记抗体（如抗 CD59 抗体）标记 GPI 锚定蛋白表型，通过流式细胞仪检测细胞表面的荧光强度，区分 GPI 锚定蛋白表达正常与缺失的细胞群体，即可量化 Pig-a 突变表型细胞的频率。

5 主要设备

流式细胞仪、离心机等。

6 试剂

阳性对照（如 N-乙基-N-亚硝基脲）、抗凝剂、荧光素标记抗体（如抗 CD59 抗体）、核酸染料、磷酸盐缓冲液、淋巴细胞分离液等。

注：推荐使用市售的Pig-a基因突变试验试剂盒，试剂盒中一般包括抗凝剂、抗体、核酸染料、磷酸盐缓冲液。

7 实验动物

7.1 总体要求

所有的动物试验均应在经国家认可机构认可的实验室内进行，并应遵守与实验动物福利有关的全部适用法规，以符合GB/T 16886.2的要求。这些研究应在良好实验室质量管理规范或其他经批准的质量保证体系的控制下进行。

7.2 动物选择

选用SPF级健康初成年啮齿类动物，推荐使用大鼠（6周龄～12周龄）。如果试验样品在两种性别动物的全身毒性、代谢、生物利用度等方面没有明显差异，则可使用单一性别动物进行试验，否则使用两种性别动物进行试验。每组可用于分析的动物数量不少于6只。试验开始时，动物体重差异应不超过同种性别平均体重的±20%。

8 样品制备

宜根据GB/T 16886.12的原则制备试验液。宜使用适宜的极性和/或非极性溶剂作为浸提介质。若使用未经充分确认的浸提介质，应提供相应的数据支持资料来表明它们与试验样品和试验系统之间的相容性并排除浸提介质自身的遗传毒性。

9 对照样品制备

9.1 阴性对照

阴性对照选用不加试验样品的同批号浸提介质，在相同条件下制备。

9.2 阳性对照

应选择适宜的阳性对照剂量以得到阳性结果，阳性对照物举例见表1。如有充分理由时也可采用其他适宜的阳性对照物。

表 1 阳性对照物举例

化学物	化学物质登记号	大鼠推荐最高剂量 (mg/kg/day)	接触途径
N-乙基-N-亚硝基脲	759-73-9	20	灌胃
苯并芘	50-32-8	125	灌胃
7,12-二甲基苯[a]蒽	57-97-6	30	灌胃

注：当采用大鼠推荐最高剂量接触时，首次接触记为第1d，于第1d，第2d和第3d分别接触，累计接触3次可产生较大的致突变性。

9.3 未处理对照

如不能证实所用浸提介质不具有致突变性，还应设未处理对照。

10 试验步骤

10.1 预试验

如怀疑试验样品可能对实验动物产生毒性时，应进行预试验。宜设置3个剂量水平，覆盖从最大到小或无毒性的剂量范围。高剂量组应是产生明显毒性的剂量，高于该剂量即有可能引起动物死亡。

10.2 实验动物处理

根据试验样品预期的人体接触途径设计合适的接触途径以确保与靶器官/组织充分接触，如尾静脉注射、腹腔注射、皮下注射等。宜根据实验动物的体重来确定样品接触最大单剂量体积。样品接触最大单剂量体积的选择见GB/T 16886.11—2021中表B.1。

注：推荐通过尾静脉注射连续接触试验样品28 d，为突变基因表达提供足够的时间。当采用更长的接触时间时，建议不少于28 d采血。

10.3 红细胞纯化

在预定的时间点每只大鼠采血（如尾静脉针刺采血）80 μL~120 μL至EP管（内含等体积的抗凝剂），混匀。将稀释后的大鼠外周血沿管壁轻轻加入到含有1.5 mL~2 mL淋巴细胞分离液的试管内，使稀释血液标本叠加在分离液表层，室温下离心，弃血浆层、淋巴细胞层和分离液层以纯化红细胞。加入150 μL磷酸盐缓冲液，重悬，转移到磷酸盐缓冲液中，室温下离心以清洗红细胞，弃上清液，重复离心清洗一次。加入100 μL磷酸盐缓冲液，重悬细胞。

注：红细胞纯化后，从阴性对照组的一个样本中预留部分细胞来制备10.5中的突变模拟样本。

10.4 抗体标记

取10.3得到的细胞加入到100 μL抗体溶液中，混匀后置于2℃~8℃避光染色30 min。孵育结束后，转移到磷酸盐缓冲液中。使用移液器混合，室温下离心以清洗红细胞，弃上清液，重复离心清洗一次。

注：抗体溶液的稀释比例参考相应的试剂盒说明书，例如anti-CD59-PE和磷酸盐缓冲液的体积比采用1:2的比例。

10.5 核酸染色

收集底层细胞，加入1 mL~1.5 mL核酸染料，混匀后37℃避光染色30 min。孵育后将样本转移至流式细胞管中，2℃~8℃避光保存待检。

注：核酸染料的稀释比例参考相应的试剂盒说明书，例如核酸染料和磷酸盐缓冲液的体积比采用1:30的比例。

10.6 流式细胞仪检测

每次检测应制备突变模拟样本，用于设置仪器和软件分析参数（如调整电压或补偿等）。突变模拟样本通过处理来自阴性对照动物的血液来制备，共分为两部分，一部分进行抗体孵育，用以模拟野生型细胞；一部分未进行抗体孵育，用以模拟突变细胞，两部分样本经核酸染料染色后等量混合，进行流式分析。附录A给出了突变模拟样本进行流式细胞术分析的示例。

使用流式细胞仪获取信号，每只动物每个时间点的细胞突变频率应不为零，同时应检测网织红细胞（RET）所占红细胞（RBC）的比例，以判断红细胞毒性。

注：因RET突变频率不为零比较困难，推荐使用免疫磁性分离技术以富集突变细胞。

11 数据处理与结果评价

11.1 数据处理

按照公式（1）、公式（2）、公式（3）分别计算RBC突变频率、RET突变频率以及RET占RBC的百分比。

$$v = \frac{a+c}{d} \times 10^6 \dots\dots\dots (1)$$

$$w = \frac{a}{b} \times 10^6 \dots\dots\dots (2)$$

$$p = \frac{b}{d} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

- 式中：
- v——RBC突变频率；
 - w——RET突变频率；
 - p——RET占RBC的百分比；
 - a——突变RET数目；
 - b——总RET数目；
 - c——突变成熟RBC数目；

d——总RBC数目。

11.2 结果评价与解释

评价阳性和阴性反应的标准如下：

- a) 阳性反应：与阴性对照组相比，v、w有统计学意义的显著增加或超过历史阴性对照数据范围且有明显的剂量—反应关系（若有剂量组）；
- b) 阴性反应：与阴性对照组相比，v、w无统计学意义的显著增加或结果在历史阴性对照数据范围内且无明显的剂量—反应关系（若有剂量组）。

阳性反应则认为在本试验体系中试验样品试验液能够诱导哺乳动物红细胞Pig-a基因突变；阴性反应则认为在本试验体系中试验样品试验液不能够诱导哺乳动物红细胞Pig-a基因突变。与阴性对照组相比，试验组中RET占RBC的百分比有统计学意义的显著减少表明试验样品产生了细胞毒性。在少数的情况下，所得到的资料不能判断试验样品是否诱导哺乳动物红细胞Pig-a基因突变时，可使用优化试验条件（例如，剂量间隔、其他接触途径、其他采样时间等）进行重复试验。

12 试验报告

试验报告中宜包含下列信息：

- a) 试验样品：
 - 来源、批号、有效日期（适用时）；
- b) 介质：
- c) 实验动物：
 - 实验动物的种属、品系、级别、数量、体重、性别、来源；
 - 实验动物饲养环境；
 - 实验动物设施使用许可证号；
- d) 试验条件：
 - 剂量和组别；
 - 接触途径、试验周期、观察指标；
 - 孵育温度和时间；
 - 阳性和阴性对照物的最终浓度；
 - 分析细胞的数目；
- e) 结果：
 - 阴性（溶剂/介质）和阳性对照资料（浓度/剂量和溶剂）；
 - 统计学分析；
- f) 结果的讨论；
- g) 结论。

附 录 A
(资料性)
流式细胞术分析

在流式细胞仪上开启流式细胞仪分析软件，设置数据存储位置，可参考试剂盒操作说明设定仪器条件。按照10.5的要求制备突变模拟样本后，将模拟突变物放置在流式细胞仪上进行数据收集。在前向散射光（FSC）上设定阈值，排除样本中的血小板和其他细胞碎片后通过设门圈出单细胞群体，进一步通过将较高核酸染料荧光强度的白细胞排出后设门圈出红细胞，调整光电倍增管（PMT）电压和荧光补偿，使得突变RBC位于左下象限（LL区域），突变RET位于左上象限（UL区域），野生RBC位于右下象限（LR区域），野生RET位于右上象限（UR区域），如图A.1所示。

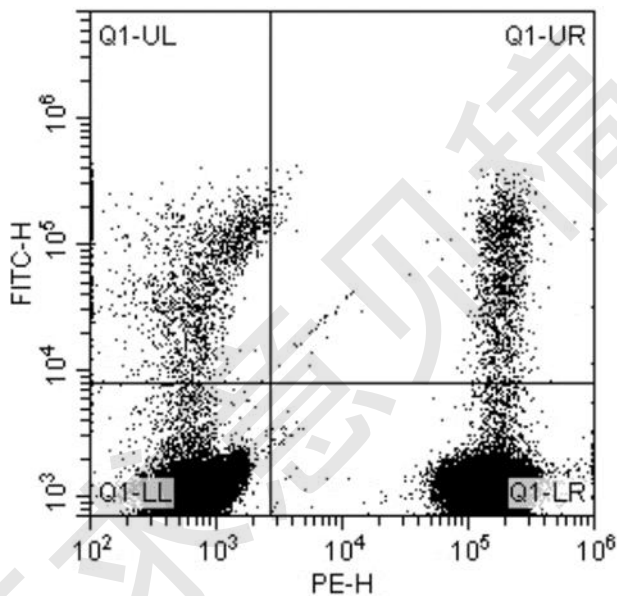


图 A.1 通过突变模拟样本完成仪器设置后的四象限图示例

参 考 文 献

- [1] GB/T 16886.12-2023 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照样品
- [2] GB/T 16886.11—2021 医疗器械生物学评价 第11部分：全身毒性试验
- [2] OECD 470(2022) 哺乳动物红细胞Pig-a基因突变试验
- [3] Dertinger D S ,Bryce M S ,Phonethepswath S , et al.When pigs fly: Immunomagnetic separation facilitates rapid determination of Pig-a mutant frequency by flow cytometric analysis[J].Mut.Res.-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,2011,721(2):163-170.

征求意见稿