

中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXX.1—XXXX

医疗器械致癌性试验 第1部分：体外细胞
转化试验

Test for carcinogenicity of medical devices—Part 1:
In vitro cell transformation assay

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

2024.06.26

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 XXXX《医疗器械致癌性试验》的第1部分。YY/T XXXX已经发布了以下部分：

——第1部分：体外细胞转化试验。

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这些专利的责任。

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/TC248）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

GB/T 16886.1中提到关于新材料的致癌性评价的必要性，随着新材料的层出不穷，目前对新材料的致癌性评估有迫切的需求。为保证医疗器械的安全使用，减少其对人体潜在的危害性，有效的致癌性检测体系是非常重要的。

GB/T 16886.3附录D中给出用以预测化学物质致癌潜能的体外细胞转化试验，未给出详细的试验步骤，因此不适宜直接用于医疗器械的检测。本文件在GB/T 16886.3给出的体外细胞转化的基础上，根据医疗器械/材料的特性规定了详细的试验步骤，可作为长期致癌性试验的补充手段用于帮助获得其他有关致癌性信息。

YY/T XXXX旨在建立医疗器械/材料致癌试验的具体试验方法，拟由4个部分构成。

——第1部分：体外细胞转化试验。目的在于给出医疗器械/材料体外细胞转化试验的详细试验方法。

——第2部分：体内长期大鼠致癌试验。目的在于给出医疗器械/材料体内长期大鼠致癌试验的详细试验方法。

——第3部分：体内转基因动物模型小鼠致癌试验。目的在于给出医疗器械/材料转基因动物模型小鼠致癌试验的详细试验方法。

——第4部分：慢毒合并致癌试验。目的在于给出医疗器械/材料转基因动物模型小鼠致癌试验的详细试验方法。

医疗器械致癌性试验 第 1 部分：体外细胞转化试验

1 范围

本文件规定了医疗器械细胞体外细胞转化试验方法。

本文件适用于通过测定细胞体外细胞转化试验，评价医疗器械是否具有潜在的遗传毒性和非遗传毒性致癌物。

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

3 术语和定义

GB/T 16886.3界定的术语和定义适用于本文件。

4 试验原理

体外细胞转化试验是一种模拟体内细胞恶性转化的体外检测系统，其原理是利用细胞在体外受到致癌物后产生的由正常细胞转变为恶性细胞的可检测到的表型，对各类致癌物进行有效检测和筛选的技术。

5 主要设备

细胞培养箱（37℃，5% CO₂）、倒置显微镜、离心机、移液枪等。

6 试剂

二甲基亚砜（DMSO）、3-甲基胆蒽（MCA）、12-O-十四酰佛波醇-13-乙酸酯（TPA）、结晶紫（CV）溶液、5%吉姆萨溶液、磷酸盐缓冲液（不含 Ca²⁺、Mg²⁺）、5% DMEM/F12 培养基（DF5F）、固定液（如甲醇，3.7%甲醛）、洗涤液（如 1×PBS）、染料提取液（0.02mol/L HCl 和 50%乙醇混合溶液）。

7 细胞系

可选用的细胞系为叙利亚仓鼠胚胎细胞、Balb/c 3T3 细胞等。宜选用合适的培养液和培养条件（培养容器、湿化的5%CO₂，培养温度37℃）来维持所培养细胞的生长。在使用细胞时推荐使用Bhas42细胞，该细胞系由BALB/c 3T3 A31-1-1通过转染v-Ha-ras癌基因而建立的，以下步骤为Bhas42细胞的操作步骤，若使用其他细胞进行试验，需要经过验证。

8 样品制备

宜根据GB/T 16886.12的原则制备试验液，使用适宜的含血清培养基作为浸提介质。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致癌性。

当最高浓度的试验液（即试验样品原液或100 %的浸提原液）试验结果为阴性时，可考虑单剂量组试验。采用其他多剂量试验或剂量反应试验时，宜对试验所采用的剂量范围提供相应的支持性数据。

8.1 阴性对照

用于测试化学物质的溶剂/载体作为阴性对照。用于启动试验和促癌试验的阳性对照MCA和TPA溶于DMSO中。当测试化学物质的溶剂/载体不是DMSO时，仍然需要DMSO作为MCA或TPA的阴性对照。

8.2 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

阳性试剂	化学物	终浓度
MCA	3-甲基胆蒎 (3-Methylcholanthrene)	1µg/ml
TPA	12-O-十四酰佛波醇-13-乙酸酯 (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)	50ng/ml
注：MCA和TPA推荐溶解介质为DMSO，分别用于启动试验和促癌试验的阳性对照。		

8.3 未处理对照

如不能证实所用浸提介质不具有致癌性，还需设未处理对照。

9 试验步骤

9.1 生长试验

在进行细胞转化试验之前，需进行细胞生长试验，用于确定适当的测试浓度，并与转化测定同时进行，以确认浸提液处理的毒性效应。

9.1.1 启动试验

在DF5F中，少于或等于70%的细胞密度的情况下，用胰酶处理细胞。

- a) 在 6 孔板中，每个孔接种 4000 个细胞，用 2 mL 的 DF5F 培养。为每种处理条件准备三个孔
- b) 在 96 孔板中，每个孔接种 200 个细胞，用 0.05 mL 的 DF5F 培养。为每种处理条件准备八个孔。

用于光度计的空白对照也要准备在孔中只含有培养基(如果它们同时被用于不同浸提液的不同测试，则空白对照可以共用)。在细胞铺板后20-24小时，将各种浓度的浸提液或仅溶剂/载体加入到每个孔中，而不更换培养基。

- c) 在 6 孔板中，如果溶剂是水，每孔加入 100µl（以获得最终浓度 5%）。如果溶剂是 DMSO，每

孔加入 2 μ l（以获得最终浓度 0.1%）。

- d) 在 96 孔板中，通过向每个孔中加入含有测试品溶液或仅溶剂/载体的 0.05 mL 培养基，使每孔的最终浓度增加两倍，从而培养基的最终体积为 0.1 mL。

第 4 天用新鲜培养基更换培养基。

第 7 天，用甲醇或 3.7% 甲醛固定培养物 30 分钟，冲洗并干燥。细胞用 1.5 mL/孔或 0.1 mL/孔的结晶紫（CV）溶液染色 15 分钟，在 6 或 96 孔板中，分别用水充分冲洗并干燥。

CV 从 6 孔板的细胞中用 2 mL/孔的染料提取溶液中提取出来，从 96 孔板中用 0.1 mL/孔的染料提取液中提取出来，并且在 540-570 nm 波长范围内测量吸光度（OD）。计算测试品处理的培养物的相对细胞生长如下：

$$\text{相对细胞生长率} = [(At - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100$$

式中：

At——测试品处理细胞的 CV 提取物的吸光度；

Ac——溶剂/载体处理细胞的 CV 提取物的吸光度；

Ab——仅含培养基的孔的 CV 提取物的吸光度。

9.1.2 促癌试验

在 DF5F 培养基中，细胞在达到不高于 70% 的密度时，用胰蛋白酶消化。

- a) 对于 6 孔板，每个孔接种 14000 个细胞，加入 2 mL 培养基（第 0 天）。每种处理条件准备三个孔。
- b) 对于 96 孔板，每个孔接种 400 个细胞，加入 0.1 mL DF5F（第 0 天）。每种处理条件准备八个孔。

为了光度计空白对照，还准备了只含培养基的孔（这个空白对照可以与同时进行的起始测定相关的细胞生长测定共用）。

第 4 天，去除培养基，替换为含有试验测试物质溶液或单独溶剂/载体的新鲜培养基。

第 7 天，用甲醇或 3.7% 甲醛固定培养物 30 分钟，洗涤并干燥。

细胞用 1.5 mL/孔或 0.1 mL/孔的结晶紫溶液染色，分别在 6 孔板或 96 孔板上染色 15 分钟，彻底冲洗并干燥。接下来的步骤与生长试验中的启动试验相同。

9.2 转化试验

9.2.1 启动试验

在 DF5F 培养基中，细胞在达到不高于 70% 的密度时被用胰蛋白酶消化。

- a) 对于 6 孔板，每个孔内接种 4,000 个细胞，使用 2 mL DF5F 进行转化试验和同时进行的细胞生长测定（第 0 天）。每个剂量条件准备 9 个孔（一板 6 孔用于转化试验，3 孔用于同时进行的细胞生长测定）。细胞接种后 20-24 小时，在每个孔中添加测试溶液而不更换培养基。若使用水作为溶剂，每孔添加 0.1 mL（使最终浓度达到 5%）。若使用 DMSO 作为溶剂，每孔添加 2 μ L（使最终浓度达到 0.1%）。
- b) 对于 96 孔板，每个孔内接种 200 个细胞，使用 0.05 mL DF5F（第 0 天）。每种处理条件准备一板 96 孔用于转化试验，同时准备 8 个孔用于细胞生长测定。接种后 20-24 小时，在每个孔中加入 0.05 mL 含有测试溶液或仅溶剂/载体的培养基，浓度为每孔添加的最终浓度的两倍，以使最终培养基体积为 0.1 mL。

无论板的类型如何，细胞都会在接下来的三天（第 1-4 天）暴露于测试物质中。

第 4 天、第 7 天、第 10（或 11）天和第 14 天更换为新鲜的 DF5F 培养基。

第 21 天，用甲醇固定细胞，并用 5% Giemsa 溶液染色（见图 4）。

注：对于每种测试物质的转化试验，包括阳性对照（1 μ g/mL MCA）和阴性对照。如果测试物的溶剂/载体不是DMSO，则仍需要DMSO作为MCA的阴性对照。

9.2.2 促癌试验

与生长试验中促癌试验的操作方式相同，除了以下几点：

- a) 将细胞悬浮在适当浓度的培养基中，分别在每个孔内接种 14000 个细胞和 2 mL 培养基（6 孔板），或者 400 个细胞和 0.1 mL DF5F（96 孔板）（第 0 天）。对于 96 孔板，每种处理条件准备一板用于转化试验，同时准备 8 个孔用于细胞生长试验。
- b) 细胞从第 4 天到第 14 天接受测试物的处理，共持续 10 天。
- c) 测试处理分别在第 4 天、第 7 天和第 10（或 11）天，通过更换现有培养基为含有测试物溶液或仅溶剂/载体的新鲜培养基进行。
- d) 第 14 天，将培养基更换为正常培养基，不含溶剂/载体或测试物。
- e) TPA（50 ng/mL）作为阳性对照，代替 MCA。

10 试验结果

10.1 记录细胞灶转化频率

使用光学显微镜对转化细胞灶进行评分。转化细胞灶具有以下形态特征：

- a) 超过 100 个细胞
- b) 形态不同于接触抑制的单层细胞的梭形细胞
- c) 深度嗜碱染色
- d) 灶边缘细胞的随机取向（交错）
- e) 细胞的密集多层排列（堆积）
- f) 侵袭性生长进入周围的接触抑制细胞单层。

需要注意的是，并非所有转化细胞灶都具备上述所有特征，但通常观察到其中一些明显的形态特征就足以将其分类为转化细胞灶。

转化频率：

- a) 在 6 孔板方法中，记录每个浓度下每个孔中的转化细胞灶数。
- b) 在 96 孔板方法中，记录每个浓度下出现转化细胞灶的孔数与观察到的总孔数：每个具有一个细胞灶的孔计为一个，每个具有两个或更多细胞灶的孔也计为一个。

10.2 统计分析

在 6 孔板方法中，针对测试品引起的转化细胞灶数增加，使用单侧 Dunnett 检验进行多重比较的统计分析（ $p < 0.05$ ）。对于阳性对照，根据同方差性的 F 检验结果，使用单侧 t 检验或 Aspin-Welch 检验评估统计显著性（ $p < 0.05$ ）。在 96 孔板方法中，针对测试品处理后出现具有转化细胞灶的孔的比例增加，使用带有 Bonferroni 校正的卡方检验进行统计分析（ p 值 < 0.05 ，上侧临界值）。对于多重性，考虑满足测定接受标准的浓度数（至少 4 个）。对于阳性对照，使用单侧卡方检验评估统计显著性（ $p < 0.05$ ，上侧临界值）。

11 试验报告

试验报告中应包含下列信息：

——试验样品名称、规格型号和批号；

- 试验和对照样品制备方法；
 - 试验细胞的详细信息；
 - 试验结果；
 - 结果评价；
 - 结论。
-