



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0870—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

草案稿

(2024.6)

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。

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/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的检测。YY/T 0870根据医疗器械的特性给出了详细的试验步骤，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8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。

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 14925 实验动物 环境及设施

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

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照样品

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。

3.1

Pig-a基因 phosphatidylinositol glycan, class A gene

磷脂酰肌醇聚糖A类基因。

4 试验原理

大鼠体内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(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定蛋白表型缺失,使用荧光素标记抗体标记GPI锚定蛋白表型有无缺陷,通过流式细胞仪检测细胞表面的荧光强度,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、高速冷冻离心机等。

6 试剂

N-乙基-N-亚硝基脲、抗体、核酸染料、磷酸盐缓冲液、胎牛血清等。

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5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	CAS RN
N-乙基-N-亚硝基脲 (N-Ethyl-N-Nitrosourea)	759-73-9
苯并芘 (Benzo[a]pyrene)	50-32-8
7,12-二甲基苯[a]蒽 (7,12-Dimethylbenz[a]-Anthracene)	57-97-6

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，还需设未处理对照。

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 试验动物处理

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，如静脉注射、腹腔注射、皮下注射等。通常采用单次接触，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。

10.3 红细胞富集

推荐连续接触 28 天后采血（如尾静脉针刺采血、眼眶静脉丛采血等）至 EP 管（内含抗凝剂），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，离心吸弃血浆层、淋巴细胞层和分离液层以富集红细胞。吸取底层红细胞转至 15mL 离心管中（内含 8 mL PBS），离心清洗一次。

10.4 染色

收集底层细胞加入 100μL 染色体系（含抗体如 anti-CD59-APC、2μL 胎牛血清），混匀后置于 4℃避光染色 30min。染色结束后将细胞转移至 15 mL 离心管中（内含 10 mL PBS）离心清洗一次。弃上清液，收集底层细胞，加入核酸染料，混匀后 37℃避光孵育 30min。孵育后将样本转移至流式细胞管中，4℃避光保存待检。

10.5 流式细胞仪检测

使用流式细胞仪获取信号，每样本至少检测 1×10^6 个成熟红细胞（red blood cell, RBC）中 RBC^{CD59-} 的数量即 RBC^{CD59-} 率， 0.3×10^6 个网织红细胞（reticulocyte, RET）中 RET^{CD59-} 的数量即 RET^{CD59-} 率，同时需检测 RET 所占比例。

11 数据处理与结果评价

11.1 数据处理

按照公式计算 RET 占 RBC 百分比。

$$\text{RET}\% = \text{RET} / \text{RBC} \times 100\%$$

11.2 结果评价与解释

评价阳性和阴性反应的标准如下：

- 阳性反应：与阴性对照组相比，RBC^{CD59-} 率、RET^{CD59-} 率及 RET% 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）；
- 阴性反应：与阴性对照组相比，RBC^{CD59-} 率、RET^{CD59-} 率及 RET% 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。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、其他给药途径、其他采样时间等）进行重复试验或者对额外的肝细胞进行评价以建立生物学相关性。

12 试验报告

试验报告中宜包含下列信息：

- 试验样品：
——来源、批号、有效日期（适用时）；
- 介质；
- 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；
 - 肝细胞制备和培养方法；
 - 培养温度和时间；
 - 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。

参 考 文 献

- [1]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