



中华人民共和国国家标准

GB/T 16886.5—2003/ISO 10993-5:1999
代替 GB/T 16886.5—1997

医疗器械生物学评价 第5部分:体外细胞毒性试验

**Biological evaluation of medical devices—
Part 5: Test for in vitro cytotoxicity**

(ISO 10993-5:1999, IDT)

2003-03-05 发布

2003-08-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

GB/T 16886 的本部分等同采用国际标准 ISO 10993-5:1999《医疗器械生物学评价——第 5 部分：体外细胞毒性试验》。

本部分第二版经技术修订取代第一版(GB/T 16886.5—1997),其主要修订内容除了试验方法中有一些细微改动外,样品制备按 GB/T 16886.12—2000《医疗器械生物学评价 第 12 部分:样品制备与参照材料》(idt ISO 10993-12:1996)。

GB/T 16886 的总题目是医疗器械生物学评价,由下列部分组成:

- 第 1 部分:评价与试验;
- 第 2 部分:动物保护要求;
- 第 3 部分:遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验;
- 第 4 部分:与血液相互作用试验选择;
- 第 5 部分:细胞毒性试验:体外法;
- 第 6 部分:植入后局部反应试验;
- 第 7 部分:环氧乙烷灭菌残留量;
- 第 8 部分:生物学试验参照材料的选择与定量指南(待出版);
- 第 9 部分:潜在降解产物的定性定量框架;
- 第 10 部分:刺激与致敏试验;
- 第 11 部分:全身毒性试验;
- 第 12 部分:样品制备与参照样品;
- 第 13 部分:聚合物降解产物的定性定量;
- 第 14 部分:陶瓷降解产物的定性定量;
- 第 15 部分:金属与合金降解产物的定性定量;
- 第 16 部分:降解产物与可沥滤物毒性动力学研究设计。

有关其他方面的生物试验将有其他部分的标准。

本部分由国家药品监督管理局提出。

本部分由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会归口。

本部分起草单位:国家药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心。

本部分主要起草人:由少华、王昕、黄经春、钱承玉、郝树彬。

引 言

体外细胞毒性试验具有通用性,广泛适用于各种医疗器械和材料的评价。因此,本标准的目的,不是规定一个单一的试验方法,而是规定一个试验方案,需要在一系列试验步骤中判断,以选出最合适的试验。

试验分成三类:浸提液试验、直接接触试验、间接接触试验。

根据被评价样品的性质、使用部位和使用特性选择这些试验中的一类或几类。

试验的选择决定了供试样品的制备方法、培养细胞的制备以及细胞与样品或其浸提液接触的方法。

接触试验结束时,对细胞毒性作用和程度进行评价。本部分放开了对评价方式的选择。这一指导思想引出多种通用试验,反映了许多提倡体外生物学试验团体的观点。

细胞毒性测定中所使用的大量方法和终点测量方法可分成以下评价类型:

- a) 按形态学方法评价细胞破坏;
- b) 细胞损伤的测定;
- c) 细胞生长的测定;
- d) 细胞代谢特性的测定。

在这四种类型中,每一类都有几种可供选择的方法,研究者应了解试验的分类及其相应的专项技术,以便与其他类似器械或材料的结果具有可比性,以使各实验室间的试验具有可比性。

医疗器械生物学评价 第5部分:体外细胞毒性试验

1 范围

GB/T 16886 的本部分阐述了评价医疗器械体外细胞毒性的试验方法。

这些方法规定了下列供试品以直接或通过扩散的方式与培养细胞接触和进行孵育:

- a) 用器械的浸提液,和/或
- b) 与器械接触。

这些方法是用相应的生物参数测定哺乳动物细胞的体外生物学反应。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 16886 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分:评价与试验(GB/T 16886.1—2001, idt ISO 10993-1:1997)

GB/T 16886.12—2000 医疗器械生物学评价 第12部分:样品制备和参照材料(idt ISO 10993-12:1996)

3 术语与定义

GB/T 16886.1/ISO 1993-1 中确立的以及下列术语和定义适用于本部分。

3.1

阴性对照材料 **negative control material**

按照本部分试验时不产生细胞毒性反应的材料。

注:阴性对照的目的是验证背景反应,例如高密度聚乙烯¹⁾已作为合成聚合物的阴性对照材料,氧化铝陶瓷棒则用作牙科材料的阴性对照物。

3.2

阳性对照材料 **positive control material**

按照本部分试验时可重现细胞毒性反应的材料。

注:阳性对照的目的是验证相应试验系统的反应,例如用有机锡作稳定剂的聚氯乙烯²⁾已用作固体材料和浸提液的阳性对照,酚的稀释液用于浸提液的阳性对照。

1) 高密度聚乙烯可从美国药典委员会(Rockville, Maryland, USA)和 Hatano 研究所食品和药品安全中心(Ochiai 729-5, Hanagawa257-Japan)获得。提供这一信息是为本部分的使用者提供方便,但 ISO 对使用该产品不提供担保。

2) 有机锡聚氯乙烯阳性对照材料可从 SIMS Portex Ltd, Hythe, Kent, CT21 6JL, UK(产品号码 499-300-000)获得。ZDEC 和 ZDBC 聚氨基甲酸乙酯可从 Hatano 研究所食品和药品安全中心(Ochiai 729-5, Hanagawa257-Japan)获得。提供这一信息是为本部分的使用者提供方便,但 ISO 对使用该产品不提供担保。

3.3

试剂对照 reagent control

在不加试验材料的条件下,按浸提条件和试验步骤得到的浸提介质。

注:在本部分中,该定义取代 GB/T 16886.12/ISO 10993-12 中 3.1 给出的定义。

3.4

培养器皿 culture vessels

适用于细胞培养的器皿,包括玻璃培养皿、塑料培养瓶或塑料多孔培养板和微量滴定板等器皿。

注:在这些试验方法中,这些器皿只要符合组织培养级别的要求,并适用于哺乳动物细胞培养,可以互换使用。

3.5

近汇合 subconfluency

在对数生长期末,约 80% 的细胞汇合。

4 样品制备

4.1 总则

供试品可选用:

- a) 材料浸提液;和/或
- b) 材料本身。

样品制备应符合 GB/T 16886.12/ISO 10993-12。

4.2 材料浸提液的制备

4.2.1 浸提原则

为了测定潜在的毒理学危害,浸提条件应模拟或严于临床使用条件,但不应导致试验材料发生诸如熔化、溶解或化学结构改变等明显变化。

注:浸提液中任何内源性或外源性物质的浓度及其接触试验细胞的量取决于接触面积、浸提体积、pH、化学溶解度、扩散率、溶质度、搅拌、温度、时间和其他因素。

4.2.2 浸提介质

哺乳动物细胞检测中应使用下列一种或几种溶剂。对浸提介质的选择应进行验证:

- a) 含血清培养基;
- b) 无血清培养基;
- c) 生理盐水溶液;
- d) 其他适宜的溶剂。

注:溶剂的选择应反映出浸提的目的,并应考虑使用极性和非极性两种溶剂。适宜的溶剂包括纯水、植物油、二甲亚砜(DMSO)。在所选择的测试系统中,如 DMSO 浓度大于 0.5%(体积分数),则有细胞毒性。

4.2.3 浸提条件

4.2.3.1 浸提应使用无菌技术,在无菌、化学惰性的封闭容器中进行,应符合 GB/T 16886.12/ISO 10993-12 的基本要求。

4.2.3.2 推荐的浸提条件是:

- a) 37℃±2℃ 下不少于 24 h;
- b) 50℃±2℃ 下 72 h±2 h;
- c) 70℃±2℃ 下 24 h±2 h;
- d) 121℃±2℃ 下 1 h±0.2 h。

可根据器械特性和具体使用情况选择推荐的条件。

当浸提过程使用含血清培养基时,只能采用 4.2.3.2a) 规定的浸提条件。

4.2.3.3 浸提液用于细胞之前,如果进行过滤、离心或其他处置方法,最终报告(见第 9 章)中应予以说

明,对浸提液 pH 值的调整也应在报告中说明。对浸提液的处理,例如对 pH 值的调整会影响试验结果。

4.3 直接接触试验材料的制备

4.3.1 在细胞毒性检测中,多种形状、尺寸或物理状态(即液态或固态)的材料未经修整即可进行测试。

固体样品应至少有一个平面。

其他形状和物理状态的样品应进行调整。

4.3.2 应考虑试验样品的无菌性。

4.3.2.1 无菌器械试验材料的试验全过程应按无菌操作法进行。

4.3.2.2 试验材料如取自通常在使用前灭菌的器械,应按照制造商提供的方法灭菌,并且试验全过程应按无菌操作法进行。

用于试验系统之前,制备试验材料时应考虑灭菌方法或灭菌剂对器械的影响。

4.3.2.3 试验材料如取自使用中不需要灭菌的器械,则应在供应状态下使用,但在试验全过程中应按无菌操作法进行。

4.3.3 对液体进行试验应:

a) 直接附着;或

b) 附着到具有生物惰性和吸收性的基质上。

注:滤膜是适用的基质。

4.3.4 对高吸收性材料,如果可能,试验前应用培养基将其浸透,以防止吸收试验器皿中的培养基。

5 细胞系

5.1 优先采用已建立的细胞系并应从认可的贮源获取³⁾。

5.2 在需要特殊敏感性时,只能使用直接由活体组织获取的原代细胞、细胞系和器官型培养物,但需证明其反应的重现性和准确性。

5.3 细胞系原种培养贮存时,应放在相应培养基内,在 -80°C 或 -80°C 以下冻存,培养基内加有细胞保护剂,如二甲基亚砜或甘油等。长期贮存(几月至几年)只能在 -130°C 或 -130°C 以下冻存。

5.4 试验应使用无支原体污染细胞,使用前采用可靠方法检测是否存在支原体污染。

6 培养基

6.1 培养基应无菌。

6.2 含血清或无血清培养基应符合选定细胞系的生长要求。

注:培养基中允许含有对试验无不利影响的抗生素。

培养基的稳定性与其成分和贮存条件有关。含谷氨酰胺和血清的培养基在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存不超过一周,含谷氨酰胺的无血清培养基在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存不超过2周。

6.3 培养基的 pH 值应为 7.2~7.4。

7 细胞原种培养制备

7.1 用选定的细胞系和培养基制备试验所需足够的细胞。使用冻存细胞时,如加有细胞保护剂应除去,使用前至少传代培养一次。

7.2 取出细胞,用适宜的酶分散法和/或机械分散法制备成细胞悬浮液。

3) 推荐的细胞系如 CCL1(NCTC clone 929)、CCL 163(Balb/3T3 clone A31)、CCL 171(MRC-5)、CCL 75(WI-38)、CCL 81(Vero)、CCL 10[BHK-21(C-13)]和 V-79 379A。这一信息只是为本部分的使用者提供方便,但 ISO 对使用该产品不提供担保。也可使用其他能得出相同或更佳结果的细胞系。

8 试验步骤

8.1 平行样数

至少采用三个平行试验样品数和对照数。

8.2 浸提液试验

8.2.1 该试验用于细胞毒性定性和定量评价。

8.2.2 从持续搅拌的细胞悬浮液中吸取等量的悬浮液,注入与浸提液接触的每只培养器皿内,轻轻转动培养器皿使细胞均匀地分散在器皿的表面。

8.2.3 根据培养基选择含或不含5%(体积分数)二氧化碳的空气作为缓冲系统,在 $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 温度下进行培养。

试验应在近汇合单层细胞或新鲜悬浮细胞上进行。

如仅是检测克隆形成,应采用较低的细胞密度。

8.2.4 试验前用显微镜检查培养细胞的近汇合和形态情况。

8.2.5 试验可选用:

a) 浸提原液;和

b) 以培养基作稀释剂的系列浸提稀释液。

试验如采用单层细胞,应弃去培养器皿中的培养基,在每只器皿内加等量浸提液或上述稀释液。

如用悬浮细胞进行试验,细胞悬浮液制备好后立即将浸提液或上述稀释液加到每只平行器皿中。

8.2.6 采用水等非生理浸提液时,浸提液用培养基稀释后应在最高生理相容浓度下试验。

注:建议在稀释浸提液时使用浓缩的(如2倍、5倍)培养基。

8.2.7 加等量的空白试剂和阴性及阳性对照液至其他平行器皿中。

注:如需要,还可用新鲜培养基做对照试验。

8.2.8 器皿按8.2.3中所述同样条件进行培养,培养间期应符合选定方法的要求。

8.2.9 经过至少24 h的培养后,按8.5确定细胞毒性反应。

8.3 直接接触试验

8.3.1 该试验用于细胞毒性定性和定量评价。

8.3.2 从持续搅拌的细胞悬浮液中吸取等量的悬浮液,注入与试验样品直接接触的每只器皿内。轻轻水平转动器皿,使细胞均匀地分散在每只器皿的表面。

8.3.3 根据培养基选择含或不含5%(体积分数)二氧化碳的空气作为缓冲系统,在 $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 温度下进行培养,直至培养细胞生长至近汇合。

8.3.4 试验前用显微镜检查培养细胞的近汇合和形态情况。

8.3.5 弃去培养器皿中的培养基,加新鲜培养基至各器皿内。

8.3.6 在每只器皿中央部位的细胞层上各轻轻放置一个试验样品,应确保样品覆盖细胞层表面约十分之一。

操作时应注意防止样品不必要的移动,否则可能会导致细胞的物理性损伤,这可从被移动细胞的碎片来判断。

注:如可能,在细胞加入前将样品放入培养器皿内。

8.3.7 同法制备阴性和阳性对照材料平行器皿。

8.3.8 器皿按8.3.3中所述同样条件进行培养,培养间期(最少24 h)应符合选定方法的要求。

8.3.9 去除上层培养基,按8.5确定细胞毒性反应。

8.4 间接接触试验

8.4.1 琼脂扩散试验

8.4.1.1 该试验用于细胞毒性定性评价,该方法不适用于不能通过琼脂层扩散的可沥滤物或与琼脂反

应的物质。

8.4.1.2 从持续搅拌的细胞悬浮液中吸取等量的悬浮液,注入每只试验用平行器皿内。轻轻水平转动器皿,使细胞均匀地分散在每只器皿的表面。

8.4.1.3 根据培养基选择含或不含5%(体积分数)二氧化碳的空气作为缓冲系统,在 $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 温度下进行培养,直至对数生长期末细胞近汇合。

8.4.1.4 试验前用显微镜检查培养细胞的近汇合和形态情况。

8.4.1.5 弃去器皿中的培养基,然后将溶化琼脂与含血清的新鲜培养基混合,使琼脂最终质量浓度为0.5%~2%,每只器皿内加入等量的该混合液。只能使用适合于哺乳动物细胞生长的琼脂。该混合琼脂培养基应为液态,温度应适合于哺乳动物细胞。

注:各种不同分子量和纯度的琼脂可通用。

8.4.1.6 将试验样品轻轻放在每只器皿的固化琼脂层上,样品应覆盖细胞层表面约十分之一。

吸水性材料置于琼脂之前先用培养基进行湿化处理,以防止琼脂脱水。

8.4.1.7 同法制备阴性对照和阳性对照样品器皿。

8.4.1.8 按8.4.1.3中所述的同样条件培养24 h~72 h。

8.4.1.9 从琼脂上小心地取下样品之前、之后检测细胞毒性。

用活体染色剂如中性红可有助于检测细胞毒性。活体染色剂可在培养前或培养后与样品一起加入,如在培养前加,应在避光条件下进行细胞培养,以防因染色剂光活化作用而引起细胞损伤。

8.4.2 滤膜扩散试验

8.4.2.1 该试验用于细胞毒性定性评价。

8.4.2.2 在数只试验用培养皿内,各放置一枚孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ 、无表面活性剂的滤膜,并加入等量持续搅拌的细胞悬浮液,轻轻水平转动培养皿使细胞均匀地分散在每只滤膜的表面。

8.4.2.3 根据培养基选择含或不含5%(体积分数)二氧化碳的空气作为缓冲系统,在 $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 温度下进行培养,直至对数生长期末细胞近汇合。

8.4.2.4 试验前用显微镜检查培养细胞的近汇合和形态情况。

8.4.2.5 弃去培养器皿内的培养基,将滤膜细胞面向下,放在固化的琼脂层上(见8.4.1.6)。

8.4.2.6 轻轻将试验样品放到滤膜无细胞面的上面,滤膜上放置不产生反应的环,用以保留浸提液和新加入的成分。

8.4.2.7 同法制备阴性和阳性对照样品滤膜。

8.4.2.8 按8.4.2.3所述方法培养 $2\ \text{h}\pm 10\ \text{min}$ 。

8.4.2.9 轻轻从滤膜上取下样品,并从琼脂面上小心分离开滤膜。

8.4.2.10 采用合适的染色程序确定细胞毒性反应。

8.5 细胞毒性判定

8.5.1 可采用定性或定量方法检测细胞毒性。

- a) 定性评价:用显微镜检查细胞(如果需要,使用细胞化学染色)评价诸如一般形态、空泡形成、脱落、细胞溶解和膜完整性等方面的变化,一般形态的改变可描述性地在试验报告中记录或以数字记录,以下是给试验材料计分的有效方法。

细胞毒性计分	含义
0	无细胞毒性
1	轻微细胞毒性
2	中度细胞毒性
3	重度细胞毒性

试验报告中应包括评价方法和评价结果。

- b) 定量评价:测定细胞死亡、细胞生长抑制、细胞繁殖或细胞克隆形成。可以用客观的方法对细

胞数量、蛋白总量、酶的释放、活体染料的释放和还原或其他可测定参数进行定量测试,使用的方法和测试结果应在试验报告中记录。

注:有些检测细胞毒性的特殊方法,可能需要零点或基线细胞培养对照。

8.5.2 应慎重选择评价方法,试验样品如果释放对试验系统或对检测有影响的物质时,试验结果可能无效。

注:如评价细胞活力,释放甲醛的材料须经过可靠的试验验证。

8.5.3 各平行培养器皿的检测结果如有显著差异,则判定试验不当或无效。

8.5.4 阴性、阳性及任何其他对照物(参照、培养基、空白、试剂等)在试验系统中如无预期的反应,则应重新检测。

9 试验报告

试验报告应详细包括以下所有内容:

- a) 样品的描述;
- b) 细胞系并对选择进行论证;
- c) 培养基;
- d) 评价方法和原理;
- e) 浸提步骤(如必要),如可能报告沥出物质的性质和浓度;
- f) 阴性、阳性和其他对照物;
- g) 细胞反应和其他情况;
- h) 结果评价所需的其他有关资料。

10 结果评价

应由合格的专业人员根据试验数据对试验结果进行总体评价。结果如没有说服力或者无效,应重做试验。