

《纳米医疗器械生物学评价 遗传毒性试验 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验》 行业标准编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

根据国家药监局综合司《关于印发 2024 年医疗器械行业标准制修订计划项目的通知》(药监综械注〔2024〕27 号)的规定和要求，标准项目《纳米医疗器械生物学评价 遗传毒性试验 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验》(项目编号：N2024010-T-zjy)由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会纳米医疗器械生物学评价分技术委员会归口，主要起草单位为中国食品药品检定研究院、四川大学(四川医疗器械生物材料和制品检验中心有限公司)和国家纳米科学中心。

（二）工作过程

本标准的编制工作从2023年6月开始，秘书处组织成立标准预立项工作小组，提出《纳米医疗器械生物学评价 遗传毒性试验 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验》的标准立项建议，获得2024年医疗器械行业标准立项。2024年3月25日，秘书处组织标准起草工作组召开标准制定启动会，经过会议讨论后完善标准工作组讨论稿，并确定标准验证方案，开展标准验证。2024年8月，工作小组结合联合验证的结果对标准草案进行修改和完善，形成征求意见稿。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

（一）本标准制定背景

由于纳米材料自身具有的特殊性质，目前标准化遗传毒性试验用于评价纳米材料的遗传毒性风险时有其局限性。与非纳米尺度的医疗器械产品相比，医疗器械产品中的纳米尺度材料进入细胞的方式有所不同。如，常规的哺乳动物细胞体外染色体畸变试验中受试物与细胞接触时间较短，且细胞培养/加样处理体系中含有S9等多种阻碍细胞摄取纳米材料的成分。因此，现行的遗传毒性评价方法无法有效而可靠地评价医疗器械中纳米材料的遗传毒性。经济合作与发展组织（Organization for Economic Co-operation and Development, OECD）纳米材料产品工作组（Working Party on Manufactured Nanomaterials, WPMN）于2014年在《纳米材料产品遗传毒性：OECD专家专题研讨会报告》中指出，开展纳米材料的遗传毒性评价时，应在现有针对非纳米材料的评价方法指南性文件的基础上进行一定调整。中国食品药品检定研究院（中检院）基于前期研究数据，并参考国际相关遗传毒性指导原则及共识文件，经全国纳米技术和遗传毒理研究领域专家、纳米材料及相关产品的研发机构代表讨论，制定国家标准化指导性技术文件GB/Z 42246-2022《纳米技术纳米材料遗传毒性试验方法指南》，该指南为遗传毒性评价方法选择的总则，为含纳米医疗器械产品的研发、安全性评价及监管提供了参考。

体外哺乳动物细胞染色体畸变试验（chromosome aberration test）用于评价受试物的潜在致染色体断裂性风险，可直接对处于中期分裂

相的细胞内染色体结构和数目的细微变化进行观察，是最基本而重要的遗传毒性评价方法之一。参考GB/Z 42246-2022的原则，本文件在对试验条件进行充分验证的基础上，提出适合纳米材料/纳米医疗器械的哺乳动物细胞染色体畸变试验方法标准，为合理地开展遗传毒性风险评价提供技术支持。

（二）本标准编制原则

本标准按照 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。坚持适用性和有效性为准则，并结合当前行业发展现状与特点，提高标准贯彻实施的实用性和可操作性。

（三）本标准制定参考的主要依据

本标准参考 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：样品制备与参照材料》、YY/T 0870.2-2019《医疗器械遗传毒性试验 第 2 部分：体外哺乳动物细胞染色体畸变试验》、《OECD Guidelines for the Testing of Chemicals TG 473: *In vitro* mammalian chromosomal aberration test》、《OECD ENV/JM/MONO (2014)34. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 43. Genotoxicity of Manufactured Nanomaterials : Report of the OECD expert meeting》等资料制定。

三、主要试验验证情况

1、采用 TK6 细胞的可行性研究

因人淋巴母细胞（TK6 细胞）染色体条数较多，中期分裂相分散效果不佳，在存在一定细胞毒性时可获得的中期分裂相样本较少，不便于进行染色体结构损伤的观察分析。基于研究方法的可行性和推广性，不推荐采用 TK6 细胞开展纳米材料的染色体畸变试验。

2、CHL 细胞对纳米银摄取情况

验证目的：考察染色体畸变试验体系中（如存在 S9 和/或秋水仙素）不同处理条件对 CHL 细胞摄取球状纳米银（Ag40，粒径约 40 nm）能力的影响，确定适宜的体外染色体畸变试验条件。

验证方案：分别使用高光谱显微镜和 ICP-MS 测定不同条件下细胞对 Ag40 的内吞情况。Ag40 浓度范围为 5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，分别设置 4 h/无 S9/有秋水仙素（Co1）、4 h/无 S9/无秋水仙素（Co1）、4 h/有 S9/有秋水仙素（Co1）、24 h/无 S9/有秋水仙素（Co1）和 72 h/无 S9/有秋水仙素（Co1）组。S9 含量为 30%，秋水仙素在细胞收获前 2~4 h 添加。

验证结果：Ag40 处理浓度介于 5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内，在 CHL 细胞内均可定性或定量地检测到银元素，提示在上述条件下其可经 CHL 摄取。银元素摄取量与处理浓度成正相关，S9 的添加可导致摄取量增加，秋水仙素的添加可导致摄取量有所减少。

结论：选择浓度为 5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ag40 开展体外染色体畸变试验。无 S9 条件下细胞与受试物作用约 4 h、24h 和 72h；含 S9 条件下作用 4 h。

3、纳米标准物质实验室间联合验证（I 阶段）

验证目的：应用阴性对照（聚苯乙烯纳米微球）和阳性对照

(Ag40)，开展基于 CHL 细胞的体外染色体畸变试验，确定适宜纳米材料的体外哺乳动物细胞染色体畸变试验条件。

验证内容：

1) 细胞生长抑制试验：参考 Ag40 (40 nm 标准物质) 细胞毒性及细胞对 Ag40 摄取能力研究数据，选择适宜的浓度范围 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 开展。每条件设置 3 个浓度组。非代谢活化条件下，短时处理组和连续处理组中细胞与受试物作用约 4 h、24 h 和 72 h。代谢活化条件下，受试物与细胞作用 4 h。所有处理条件下，均包括溶媒对照组。每个浓度组 2 皿。聚苯乙烯纳米微球作为纳米级阴性对照，给予 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2) 染色体畸变试验：根据细胞生长抑制试验结果设置略高于细胞生长抑制率 50% 的浓度为最高浓度，并等比向下稀释 2 个浓度，确定中、低浓度组。最低浓度条件下细胞应可摄取一定纳米材料。同时设溶媒对照组及阳性对照组，每组设置 2 个平行样。

验证结果：

1) 纳米标准物质对 CHL 细胞生长抑制情况的影响

纳米阴性标准物质 (聚苯乙烯微球) 和不同浓度的阳性标准物质 (Ag40) 在所有条件下对 CHL 细胞的生长抑制情况 (RICC% 及 RPD%)：所有条件下 (有 S9 代谢活化条件下处理 4 h，和无 S9 代谢活化条件下处理 4 h、24 h 和 72 h)，与溶媒对照组 (H_2O) 比较，纳米阴性对照、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ag40、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ag40 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ag40 组的 RICC% 和相对 RPD% 均大于 45% \pm 5%。提示当前条件下，聚苯乙

烯微球（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）和 Ag40（浓度范围为 5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）对 CHL 细胞生长无严重抑制作用。

有丝分裂指数反应受试物对细胞周期及中期分裂相形成的影响，可作为细胞毒性评价及浓度设计参考。在 4 h（-S9）和 24（-S9）条件下阳性对照组的有丝分裂指数均明显低于溶媒对照组（ H_2O ），提示上述条件下阳性对照存在一定毒性。所有条件下，聚苯乙烯微球（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）和 Ag40（浓度范围为 5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）对 CHL 细胞的中期分裂相形成无明显抑制作用。

2) 纳米标准物质对 CHL 细胞染色体损伤的影响

不同处理条件下，纳米标准物质对 CHL 细胞染色体结构畸变率和数目畸变率的影响：所有处理条件下，CHL 细胞经溶媒对照（ H_2O ）处理后产生的结构畸变率与阳性对照组比较均有显著性升高（ $P < 0.001$ ），提示试验体系成立。此外，所有条件下聚苯乙烯微球（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的染色体结构畸变率与溶媒对照组比较未见差异，提示其可作为体外染色体畸变试验的纳米级阴性对照。4 h（+S9）、4 h（-S9）和 72 h（-S9）条件下，浓度范围为 5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ag40 与细胞作用后的结构畸变率与溶媒对照组（ H_2O ）相比均较高且存在显著性差异（ $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ ）；24 h（-S9）条件下，浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ag40 与细胞作用后的结构畸变率与溶媒对照组（ H_2O ）相比较较高且存在显著性差异（ $P < 0.001$ ）。以上结果提示 Ag40 可作为体外染色体畸变试验的纳米级阳性对照。

4、纳米标准物质实验室间联合验证（II 阶段）

验证目的：应用优化后的体外染色体畸变试验方法检测含纳米材料医疗器械产品的潜在染色体损伤作用。

验证内容：

1) 细胞生长抑制试验：参考受试物前期毒性试验结果设置浓度范围（浸提液原液，及其与浸提介质 1:1 稀释液和 1:3 稀释液）开展正式试验。每条件设置 3 个浓度组。非代谢活化条件下，短时处理组和连续处理组中细胞与受试物作用约 4 h、24 h 和 72 h。代谢活化条件下，受试物与细胞作用 4 h。所有处理条件下，均包括溶媒对照组。每个浓度组 2 皿。AgNP 作为纳米级阳性对照，给予 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2) 染色体畸变试验：根据细胞生长抑制试验结果设置略高于细胞生长抑制率 50% 的浓度为最高浓度，并等比向下稀释 2 个浓度，作为中、低浓度组。

验证结果：

1) 纳米银烧烫伤贴对 CHL 细胞生长抑制的影响

不同浸提条件下的纳米银烧烫伤贴对 CHL 细胞活力的影响：与空白对照组比较，所有条件下（有 S9 代谢活化条件下处理 4 h，和无 S9 代谢活化条件下处理 4 h、24 h 和 72 h），反应浓度为 100%~25% 的纳米银烧烫伤贴在不同浸提介质中的 RICC% 和相对 RPD% 均大于 $45\% \pm 5\%$ 。提示当前条件下，浸提浓度范围为 100%~25% 的纳米银烧烫伤贴对 CHL 细胞无严重抑制作用。

2) 纳米银烧烫伤贴对 CHL 细胞染色体损伤的影响

不同处理条件下，不同浸提介质中纳米银烧烫伤贴对 CHL 细胞

染色体结构畸变率和数目畸变率的影响：与空白对照组比较，所有条件下（有 S9 代谢活化条件下处理 4 h，和无 S9 代谢活化条件下处理 4、24 和 72 h），反应浓度为 100%~25% 的纳米银烧烫伤贴在不同浸提介质中的结构畸变率与数据畸变率均未见明显增加（ $P > 0.05$ ）。纳米银烧烫伤贴的体外染色体畸变试验结果为阴性。

考虑到各试验条件下 CHL 细胞中 Ag 含量均低于检测限值，认为阴性结果与受试物的 Ag 释放量较低有关。

结论：当前试验条件下，纳米级物质聚苯乙烯纳米微球和 Ag40（反应浓度为 5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）在基于 CHL 细胞的染色体畸变试验中可得到分别得到阴性和阳性结果。纳米银烧烫伤贴在基于 CHL 细胞的体外染色体畸变试验结果为阴性，未检出其存在潜在致染色体损伤作用。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比的情况。

国内外目前没有针对纳米材料/纳米医疗器械的体外哺乳动物细胞染色体畸变试验方法相关标准。为规范纳米材料医疗器械的研发、生产及质量控制，制定本标准。

五、与有关的现行法令、法规和强制性国家标准、行业标准的关系。

本标准按照《中华人民共和国标准化法》和相关法规的要求进行编写，符合相关法律、法规。与现有的强制性国家标准、行业标准不冲突。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在起草过程中无重大分歧。

七、作为强制性行业标准或推荐性行业标准的建议。

本文件规定了评价纳米材料/纳米医疗器械的体外哺乳动物细胞染色体畸变试验方法，建议本标准按推荐性标准实施。

八、贯彻行业标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）

标准发布后 12 个月内，将根据各方反馈意见择期召开标准宣贯会议。向监管部门、技术审评部门、检验机构、生产企业等使用单位发放标准宣贯资料，并解答标准中相关技术难点和疑点。建议本标准发布后 12 个月开始实施。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

无。

全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会
纳米医疗器械生物学评价分技术委员会秘书处

2024 年 8 月