

附件

细胞毒性检查法

本法系将供试品或供试品液接触细胞，通过对细胞形态、增殖和抑制影响的观察，评价供试品对体外细胞的毒性作用。

试验用细胞 推荐使用小鼠成纤维细胞 L-929。试验时采用传代 48~72h 生长旺盛的细胞。

试验前的准备 与样品及细胞接触的所有器具均需无菌。必要时可采用湿热灭菌如 115℃ 保持 30 分钟；干热灭菌如 250℃ 保持 30 分钟或用 180℃ 保持 2h。

供试品液的制备 提取介质的选择宜反映出提取的目的，优先选用含血清哺乳动物细胞培养基作为提取介质。除另有规定外，按品种项下规定的提取介质制成供试品液。将供试品切成 0.5cm×2cm 条状，用湿热灭菌或紫外线照射消毒后，置玻璃容器内。除另有规定外，按表 1 选择提取比例，使提取液浸没供试品，按表 2 选择提取条件（若采用含血清培养基，应用(37±1)℃ 的条件）。

表 1 供试品表面积或质量与提取介质体积的比例

供试品厚度/mm	提取比例（表面积或质量/体积）±10%
≤0.5	6cm ² /ml
>0.5~1.0	3cm ² /ml
>1.0	1.25cm ² /ml
不规则形状	0.2g/ml

表 2 提取条件

提取温度（℃）	提取时间（h）
37±1	24±2
37±1	72±2
50±2	72±2
70±2	24±2
121±2	1±0.1

1 相对增殖度法

阴性对照液制备 为不加供试品的细胞培养液。

阳性对照液制备 取生物毒性阳性参比物质，照供试品制备项下的规定进行，如 6.3% 苯酚的细胞培养液。

检查法 取 33 个培养瓶，分别加入 4×10^4 个/ml 浓度细胞悬液 1ml，细胞培养液 4ml，置 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ， $(5 \pm 1)\% \text{CO}_2$ 的条件下培养 24h。培养 24h 后弃去原培养液。

阴性对照组：取 13 个培养瓶加入 5ml 阴性对照液；阳性对照组 取 10 个培养瓶加入 5ml 阳性对照液；试验组：取 10 个培养瓶加入 5ml 含 50% 供试品液的细胞培养液，置 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ， $(5 \pm 1)\% \text{CO}_2$ 的条件下继续培养 7 天。

细胞形态学观察和计数：在更换细胞培养液的当天，取 3 瓶阴性对照组，并在更换后第 2、4、7 天，每组各取 3 瓶进行细胞形态观察和细胞计数。

毒性评定 细胞形态分析标准按表 3 规定。

表 3 细胞形态分析表

反应程度	细胞形态
无毒	细胞形态正常，贴壁生长良好，细胞呈棱形或不规则三角形
轻微毒	细胞贴壁生长好，但可见少数细胞圆缩，偶见悬浮死细胞
中度毒	细胞贴壁生长不佳，细胞圆缩较多，达 1/3 以上，见悬浮死细胞
重度毒	细胞基本不贴壁，90% 以上呈悬浮死细胞

细胞相对增殖度分级标准按表 4 规定。

表 4 细胞相对增殖度分级表

分级	相对增殖度
0	≥ 100
1	75~99
2	50~74
3	25~49
4	1~24
5	0

根据各组细胞浓度按下式计算细胞相对增殖度 (RGR)：

$$RGR = \frac{\text{供试品组（或阳性对照组）细胞浓度平均值}}{\text{阴性对照组细胞浓度平均值}} \times 100$$

结果评价 试验组相对增殖度（以第 7 天的细胞浓度计算）为 0 级或 1 级判为合格。试验组相对增殖度为 2 级，应结合形态综合评价，轻微毒或无毒的判为合格。试验组相对增殖度为 3 级～5 级判为不合格。

2 琼脂扩散法

供试品制备 将样品用纯化水冲洗干净（根据实际情况需要），用滤纸吸干。

若用供试品液进行试验，将制备的供试品液附着到生物惰性吸收性的基质（例如超细硼硅玻璃纤维滤纸）上，制成面积不少于 100mm² 的圆形供试品。

阴性对照制备 取无生物毒性阴性参比物质，例如高密度聚乙烯。按照供试品制备项下的规定进行。

阳性对照制备 取生物毒性阳性参比物质，例如含二乙基二硫代氨基甲酸锌的聚氨酯（ZDEC）。按照供试品制备项下的规定进行。可采用 10% 二甲基亚砜(DMSO)溶液，附着到生物惰性吸收性（例如超细硼硅玻璃纤维滤纸）的基质上。

检查法

取细胞悬浮液(1×10^5 个/ml)7ml，均匀分散至直径 60mm 的培养皿中。置于含(5±1)%CO₂ 气体的细胞培养箱中培养 24h 至近汇合单层细胞，弃去培养皿中培养基，将溶化琼脂冷却至 48℃ 左右与含 20% 血清的 2 倍新鲜哺乳动物细胞培养基混合，使琼脂最终质量浓度不大于 2%，在每只培养皿内加入新制备的含琼脂培养基（要足够薄以利于可沥滤物的扩散）。

含琼脂培养基凝固后，可用适当的染色方法染色。将供试品、阴性对照、阳性对照小心地放在培养皿的固化琼脂层表面。

每个供试品、阴性对照、阳性对照试样间尽量保持合适的距离并远离培养皿壁，每一培养皿中放置不超过 3 个试样，每个试样至少设置 2 个平行。置(37±1)℃ 含(5±1)% CO₂ 的细胞培养箱中至少培养(24±2)h。培养箱宜保持适当的湿度。用显微镜观察每个供试品、阴性对照、阳性对照试样反应区域。用活体染料如中性红可有助于检测细胞毒性。

结果评价

按表 5 进行细胞毒性评价和分级。如阴性对照为 0 级（无毒）、阳性对照不小于 3 级（中度毒），则细胞培养试验系统有效。

表 5 琼脂扩散试验的毒性分级

分级	毒性	毒性区域的描述
----	----	---------

0	无毒	试样周围和试样下面无可见的毒性区域
1	轻微毒	试样下面有一些退化或畸变的细胞
2	轻度毒	毒性区域不超出试样边缘 0.45cm
3	中度毒	毒性区域超出试样边缘 0.45-1.0cm
4	重度毒	毒性区域超出试样边缘大于 1.0cm

检测提取液时，供试品液的反应区域应减去介质对照的反应区域，再进行毒性分级。供试品和/或供试品液细胞毒性分级不大于 2 级（轻度毒）以上时，则判为合格。

3 直接接触法

供试品制备 采用供试品的平整部分，表面积不小于 100mm²。

阴性对照制备 取高密度聚乙烯参比物质，照供试品制备项下的规定进行。

阳性对照制备 取生物毒性阳性参比物质，照供试品制备项下的规定进行。

检查法 取生长旺盛的细胞悬浮液（ 1×10^5 个/ml）2ml，置直径 35mm 的平皿中培养单层细胞。置于细胞培养箱中培养 24h 至近汇合单层细胞，吸去培养基，替换为 0.8ml 的新鲜培养基。

在每个培养皿中单独放置 1 个供试品、阳性对照或阴性对照，每个试样至少设置 2 个平行。将所有的培养物置 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 含 $(5 \pm 1)\%$ CO₂ 的细胞培养箱中至少培养 24h，培养箱宜保持适当的湿度。显微镜下观察每个供试品、阴性对照、阳性对照周围，必要时应进行染色。

结果评价 按照琼脂扩散法结果评价项下的规定进行。若样品不超过 2 级（轻度毒），则样品判为合格。若试验系统无效需重复试验过程。

4 提取法

阴性对照制备 取高密度聚乙烯参比物质，照供试品溶液制备项下的规定进行。

阳性对照制备 取生物毒性阳性参比物质，照供试品溶液制备项下的规定进行。

检查法 取生长旺盛的细胞悬浮液（ 1×10^5 个/ml）2ml，置直径 35mm 的平皿中培养单层细胞。培养不少于 24h 细胞至少达到 80% 近汇合后，吸去培养基，替换为供试品液、阴性对照液或阳性对照液。含血清培养基提取液和不含血清培养基提取液无需稀释，平行试验 2 份。0.9%氯化钠注射液为介质的提取液用含血清的细胞培养基稀释至提取液浓度为 25%，平行试验 2 份。所有的培养物在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ，增湿且含 $(5 \pm 1)\%$ CO₂ 的培养箱中培养 48h。48h 后，在显微镜下观察培养物，如有必要，进行染色。

结果评价 按表 6 进行毒性评价和分级。若试验系统不成立，重复试验。供试品不超过 2 级（轻微毒），则判为合格。如需进行剂量-反应程度评价，可通过定量稀释供试品液，重复试验。

表 6 提取法毒性分级

分级	毒性	毒性区域的描述
0	无毒	胞内颗粒明显，无细胞溶解
1	轻微毒	圆缩、贴壁不佳及无胞内颗粒的细胞不超过 20%，偶见悬浮死细胞
2	轻度毒	圆缩细胞及胞内颗粒溶解的细胞不超过 50%，无严重的细胞溶解现象，细胞间无较大空隙
3	中度毒	圆缩或溶解的细胞不超过 70%
4	重度毒	几乎所有细胞坏死

起草单位：山东省医疗器械产品质量检验中心

复核单位：国家食品药品监督管理局药品包装材料科研检验中心、江西省药品检验检测研究院