



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

医疗器械体外皮肤刺激试验

In vitro skin irritation test for medical devices

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

征求意见稿

(本稿完成日期：2020-7-6)

在提交反馈意见时，请将你所知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

建议本标准自发布之日起 12 个月实施。

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：标准文件的结构和起草规则》的规定起草。

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

重建人表皮（RhE）模型是将从健康志愿者获取的正常角蛋白细胞在薄膜或滤纸上的气液交界面培养数日后形成的包括主基底、上层基底、棘突状及颗粒层和有功能的角质层在内的三维皮肤模型。此模型起初是为检测纯化学物体外皮肤刺激性而研发的（OECD TG439）。近年来，采用此模型进行的体外皮肤刺激方法也被用于检测医疗器械中的刺激性物质。

医疗器械体外皮肤刺激试验

1 范围

本文件规定了采用RhE模型进行医疗器械体外皮肤刺激试验的方法。

本文件适用于采用RhE模型的体外皮肤刺激方法评价医疗器械潜在的皮肤刺激性。

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 16886.10 医疗器械生物学评价 第10部分：刺激与皮肤致敏试验

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

OECD TG439 体外皮肤刺激：重建人表皮试验方法（*In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*）

3 术语和定义

GB/T 16886.10 及 GB/T 16886.12 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

体外试验 *in vitro test*

用体外培养的细胞或组织进行的试验。

3.2

重建人表皮模型 *reconstructed human epidermal (RhE) models*

将从健康志愿者获取的正常角蛋白细胞在薄膜或滤纸上的气液交界面培养数日后形成的包括主基底、上层基底、棘突状及颗粒层和有功能的角质层在内的三维皮肤模型。

4 试验原理

医疗器械极性（如0.9%氯化钠注射液）和非极性（如芝麻油）浸提液可直接接触RhE模型的上表面，不适合浸提的器械/材料（如液体、凝胶、糊剂和颗粒）也可直接暴露于模型表面。加样后孵育一定时间，然后冲洗除去表皮上的试验样品，再用四甲基偶氮唑盐（MTT）试验检测暴露后RhE组织活度，根据组织活度的变化可预测试验样品的刺激性。

5 材料

5.1 RhE 模型

使用商品化 RhE 模型进行医疗器械浸提液和/或医疗器械体外皮肤刺激试验，OECD TG439 中列出

的已验证的多个模型均可使用，如 SkinEthic™¹⁾ RHE 模型，也可使用其它商品化产品，但该商品化模型的制造商应能证明其模型与 OECD TG439 中已验证模型的等效性。

表皮细胞应取自 HIV1、2 抗体、丙型肝炎抗体、乙肝抗原均阴性的健康志愿者。尽管如此，宜按照下述生物材料的一般处理程序进行相关操作：戴手套并在生物安全柜内操作。用完丢弃前，宜将表皮及与其接触的材料及培养基进行消除污染处理（如使用 10% 漂白剂或其它适宜的试剂）。

5.2 仪器设备

- a) 超净工作台。
- b) 生物安全柜。
- c) 细胞培养箱。
- d) 天平。
- e) 酶标仪。
- f) 水平摇床。
- g) 涡旋振荡器。
- h) 移液器（200 μL、1 mL）、活塞排代式移液器（100 μL）、连续分液器（配套 25 mL 枪头）。
- i) 计时器。

5.3 试剂耗材

- a) 皮肤模型培养基（由皮肤模型生产商提供，与皮肤模型配套使用）。
 - b) 杜氏磷酸缓冲盐溶液（DPBS，1×）。
 - c) 氯化钠注射液（浓度 0.9 %）。
 - d) 植物油（如芝麻油）。
 - e) MTT（CAS 号：298-93-1）。
 - f) 十二烷基硫酸钠（SDS，CAS 号：102-79-4，浓度：20 %）。
 - g) 异丙醇（CAS 号：67-63-0）。
 - h) 6 孔培养板、24 孔培养板、96 孔培养板（平底）。
 - i) 无菌离心管。
 - j) 冲洗液收集瓶。
 - k) 弯头钝头大镊子。
 - l) 大漏斗。
 - m) 封口膜。
 - n) 锡箔纸。
 - o) 无菌棉棒。
- 注：所有试剂均为分析纯。

6 试验步骤

6.1 试验材料浸提液及对照液的制备

6.1.1 试验材料浸提液的制备

1) SkinEthic™ 是上海斯安肤诺生物科技有限公司提供的 RhE 模型商标。给出此信息是为方便文件的使用者提供方便，本文件不为其提供担保。

应按照GB/T 16886.12制备医疗器械和/或材料浸提液，宜在超净工作台内操作。宜使用0.9 %氯化钠注射液制备极性浸提液，使用植物油（如芝麻油）制备非极性浸提液。

宜基于GB/T 16886.12论证浸提时间和温度。

不适合浸提的材料（如液体、凝胶、糊剂和颗粒）可直接加样到RhE模型的上表面，并论证其适用性。

6.1.2 对照液的制备

6.1.2.1 阴性对照：阴性对照为无菌 DPBS。若 DPBS 从 10 倍浓度或粉末制备而来，将 pH 调至 7.0 并将溶液灭菌。

6.1.2.2 介质对照：宜将介质对照置于浸提容器中并进行与试验材料相同的浸提程序。

6.1.2.3 阳性对照（体积分数为 1 % 的 SDS 溶液）：取 500 μ L 20 % SDS 水溶液与 9.5 mL 相应浸提介质（如 0.9 % 氯化钠注射液或芝麻油）用漩涡振荡器充分混匀。

注：使用试验当天新鲜制备的阳性对照。推荐使用商品化 20 % SDS 溶液制备阳性对照。

6.2 RhE 模型的准备及预孵育

接收皮肤组织后，根据组织制造商的说明将组织放入大小合适的培养板（如 6 孔培养板）中用配套的培养基预孵育。根据组织制造商的说明将适量培养基加入培养板中。无菌条件下，打开盛有 RhE 组织的培养板盖子。用大镊子小心拿出盛有上皮组织的小室，在无菌纱布或滤纸上轻轻除去所有粘附在小室外侧缘的残留琼脂。检查确认无琼脂残留后转移组织至新鲜培养基，倾斜小室避免底部产生气泡。根据制造商说明书预孵育（如 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，5 % $\pm 1\%$ CO_2 ，95 % RH）皮肤组织。

注：可保存运送组织的 24 孔板室温下密封数日，以观察有无污染迹象。

6.3 加样和冲洗

6.3.1 总则

虽然采用不同模型进行的体外皮肤刺激试验都遵循相同原则，但不同模型的具体操作细节可能存在一些小差异。暴露时间等条件宜遵从制造商说明书的规定。

6.3.2 准备

室温预热维持培养基。加样前约 5 min 从培养箱中拿出预孵育的培养板。加样前准备大小合适的培养板（根据生产商要求选择）用于 RhE 模型与样品及对照的孵育。用代码标记培养板盖子，每个样品（如样品 1 的两种浸提液可记为 T1-1 和 T1-2）、阳性对照（可记为 PC1 和 PC2）、介质对照（可记为 VC1 和 VC2）和阴性对照（可记为 NC）分别使用 3 块组织。更换小室下的培养基或将小室移入含新鲜培养基的培养板中。检查培养板底部以确认转移过程中无气泡产生。

6.3.3 加样

吸取 100 μ L 未稀释的试验样品、VC、NC 或 PC 置于每个表皮表面（每个样品 3 个重复，注意使用活塞排代式移液器吸取粘稠液体）。用枪头轻轻的将样品试验液铺在皮肤上表面。所有组织加样完成后，转移培养板至培养箱（ $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，5 % $\pm 1\%$ CO_2 ，95 % RH）孵育至制造商规定时间。

注1：保持冲洗顺序与加样顺序一致。

注2：因模型表面是疏水的，所以要确保 100 μ L 溶液均匀涂布在表皮的整个表面。在表面张力作用下，有时极性溶剂微滴只能分布到表皮的外缘。这种情况下，可使用枪头铺开样品或使用镊子敲击小室使样品覆盖整个表皮。另外，对于油性浸提液或 1 % SDS 芝麻油乳液，可使用头端球状的玻璃器具或移液器吸头铺开液体以保证其与整个表皮完全接触。

6.3.4 冲洗

孵育后，使用连续分液器吸取灭菌DPBS彻底冲洗组织，推荐冲洗15~25次以去除残留试验材料。根据组织制造商提供的具体说明进行。冲洗不能太轻柔，否则试验样品不能完全清除，可使用大漏斗和塑料瓶收集冲洗液，注意防止飞溅和污染。冲洗后，在无菌吸水纸上反扣小室排干水分。使用棉签轻轻拭干表皮表面并用吸水纸或棉签拭干小室底部。转移小室至预先加有新鲜测试培养基（0.3 mL/孔）的24孔板中临时存储，准备进行MTT孵育。若发现皮肤表面仍有残存试验样品，使用无菌棉棒去除并记录。可在解剖镜下肉眼评估组织表面。

注：若评估组织活度前收集小室下培养基可额外进行细胞因子测定。存活组织会伴随IL-1 α 的释放。

6.4 RhE 模型 MTT 孵育及吸光度测定

6.4.1 MTT 孵育

6.4.1.1 MTT 母液配制：将 MTT 粉末溶解于 DPBS 中，浓度为 5 mg/mL。MTT 充分溶解后，使用 0.22 μ m 滤膜过滤，用锡箔纸包裹避光-20 $^{\circ}$ C保存，可保存 1 年。

6.4.1.2 MTT 工作液配制：用室温预热的培养基将 MTT 母液稀释至 1 mg/mL。

注：MTT工作液要现配现用。

6.4.1.3 从临时存储板中移出小室，使用无菌吸水纸或无菌棉签拭干小室底部，然后将其转移至预先加入 0.3 mL MTT 工作液的 24 孔板中，使用锡箔纸包裹避光。将培养板放入培养箱（37 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C，5% \pm 1% CO₂，95% RH）孵育 3 h \pm 5 min。

6.4.1.4 MTT 孵育完成后，拭干小室内外所有残留 MTT 溶液，根据组织制造商说明转移组织至合适的盛有适量异丙醇的组织培养板中。使用封口膜密封容器或培养板防止液体挥发。记录萃取开始时间，用培养板振荡器（120 r/min）室温轻轻振荡至少 2 h \pm 5 min。萃取后使用枪头或注射针刺破组织得到相应孔中的所有萃取液。转移萃取液至 96 孔板，转移前用加样器至少混匀 3 次至溶液均匀。

注：上述密封平板在不振荡条件下可在室温或冰箱内避光过夜萃取（18 h~24 h）。收集萃取液前使用振荡器振荡平板至少15 min。

6.4.2 吸光度测定

根据组织供应商说明从每个试验孔中转移3份200 μ L液体至平底96孔培养板中（适当标记）。使用酶标仪根据制造商说明选取合适的滤光片读取OD值，异丙醇溶液作为空白对照，设置6孔。通常使用570 nm波长滤光片。

注：及时测量，避免96孔板中异丙醇蒸发。

7 试验接受准则

7.1 阴性对照（NC）和介质对照（VC）接受准则

a) 3 块组织在 570 nm 的平均 OD 值 \geq 0.7， $<$ 3.0，则 NC 或 VC 的组织活度通常符合接受准则。

注：0.7 和 3.0 是 OECD TG439 中几种 RhE 模型 NC 和 VC 的最小和最大 OD 值，每种模型组织的范围可能有所差异。

b) 除了符合通常的接受准则外，每种模型 NC 和 VC 的 OD 值范围应符合各自的接受准则。

c) NC 或 VC 孵育后的 3 块组织的平均活度的标准差（SD） \leq 18 %。

d) VC 组织的平均活度应为 NC 的 80 % 到 120 %之间。

7.2 阳性对照（PC）接受准则

孵育后极性和非极性介质 PC 的平均活度为 NC 的 40 % 以下且 $SD \leq 18\%$ ，则 PC 数据符合接受准则。

7.3 试验样品数据接受准则

试验样品孵育后 3 块组织活度的 $SD \leq 18\%$ ，则认为数据有效。若不符合要求则应重复试验。

8 数据计算步骤

以下计算步骤适用与 MTT 试剂无相互作用、无色、基本不会将组织染色、非特异性测定色值 \leq 阴性对照的 5 % 的试验样品。

- a) 空白对照：计算 6 个空白对照孔的平均 OD 值作为空白对照 OD 值。
- b) NC：每块 NC 组织 3 个复孔的 OD 值均减去空白对照 OD 值后再相加求和，其和除以 3 得每块 NC 组织 OD 值，然后计算 3 块 NC 组织 OD 值的平均值作为 NC OD 值。设 NC 活度为 100%。
- c) PC：同法计算每块 PC 组织 OD 值。每块 PC 组织 OD 值除以 NC OD 值再乘以 100% 得每块 PC 组织活度。然后计算 3 块 PC 组织活度的平均值作为 PC 活度。
- d) 同法计算试验样品和 VC 组 3 块组织的活度，然后计算各组 3 块组织平均活度作为各组组织活度。
- e) 根据各组每块组织的活度计算各组 3 块组织活度的 SD。

9 数据解释-预测模型

根据暴露样品组织的平均活度预测试验样品潜在刺激性。平均活度 \leq 阴性对照的 50% 即表示出现刺激反应。试验组一种介质浸提液显示阳性结果（活度 $\leq 50\%$ 且 $SD \leq 18\%$ ）则认为此医疗器械/材料有刺激性，见表 1。

表1 刺激分级

| 试验结果 | 分级 |
|---|-----------|
| 至少一种浸提液平均组织活度 \leq 阴性对照的 50% | 刺激性 (I) |
| 两种浸提液平均组织活度均 $>$ 阴性对照的 50% | 非刺激性 (NI) |
| 注：RhE 模型识别的刺激反应分级对应 GB/T 16886.10-2017 中表 2 中的重度和极轻微反应。 | |

10 试验报告

试验报告应包括以下信息：

- 试验材料或器械的描述；
- RhE 模型的描述及其质控证书复制件；
- 试验方法，包括样品制备过程的详细描述；
- 试验结果；
- 试验结论。

参 考 文 献

- [1] De Jong W. H., Hoffmann S., Lee M., Kandárová H., Pellevoisin C., Haishima Y. Toxicol. Round robin study to evaluate the reconstructed human epidermis (RhE) model as an in vitro skin irritation test for detection of irritant activity in medical device extracts. In Vitro. 2018, 50 pp. 439 – 449.
- [2] Kandarova H., Willoughby J. A., De Jong W. H., Letasiova S., Milasova T., Bachelor M. A. Pre-validation of an in vitro skin irritation test for medical devices using the reconstructed human tissue model EpiDerm™. Toxicol. In Vitro. 2018, 50 pp. 407 – 417.
- [3] Olsen D. S., Lee M., Turley A. P. Toxicol. Assessment of test method variables for in vitro skin irritation testing of medical device extracts. In Vitro. 2018, 50 pp. 426 – 432.
- [4] Pellevoisin C., Videau C., Briotet D., Grégoire C., Tornier C., Alonso A. SkinEthic™RHE for in vitro evaluation of skin irritation of medical device extracts. Toxicol. In Vitro. 2018, 50 pp. 419 – 425.
- [5] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Guidelines for testing of chemicals. No. 439. In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. OECD Publications, 2017.
- [6] Alépée N., Tornier C., Robert C., Amsellem C., Roux M.-H., Doucet O. A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic™ RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test. Toxicol. In Vitro. 2010, 24 pp. 257 – 266.
- [7] Kandárová H., Hayden P., Klausner M., Kubilus J., Kearney P., Sheasgreen J. 2009): In Vitro Skin Irritation Test: Improving the Sensitivity of the EpiDerm Skin Irritation Test Protocol. ATLA 37, 671 – 669, 2009.
- [8] Coleman K. P., Grailer T. P., McNamara L. R., Rollins B. L., Christiano N. J., Kandárová H. Toxicol. Preparation of irritant polymer samples for an in vitro round robin study. In Vitro. 2018, 50 pp. 401 – 406.
- [9] Pellevoisin C., Tornier C., Bremond C., Rollins B., Briotet D., Turley A. Skin irritation of medical devices: In vitro assay with EPISKIN reconstructed human epidermis (RHE). Toxicol. Lett. 2016, 258 (S63) p. viii.
- [10] Kandárová H., Bendova H., Letasiova S., Coleman K. P., De Jong W. H., Jírova D. Toxicol. Evaluation of the medical devices benchmark materials in the controlled human patch testing and in the RhE in vitro skin irritation protocol. In Vitro. 2018, 50 pp. 433 – 438.
- [11] Faller C., Bracher M., Dami N., Roguet R. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. Toxicol. In Vitro. 2002, 16 pp. 557 – 572.
- [12] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to

proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 1983, 65 pp. 55 - 62.

征求意见稿