



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0127.15—2018
代替 YY/T 0127.15—2009

口腔医疗器械生物学评价 第 15 部分:亚急性和亚慢性全身毒性试验: 经口途径

Biological evaluation of medical devices used in dentistry—
Part 15:Subacute and subchronic systemic toxicity test;oral route

2018-04-11 发布

2019-05-01 实施

国家药品监督管理局 发布

前 言

YY/T 0127 是口腔医疗器械具体生物试验方法标准,分为以下几部分:

- YY/T 0127.1《口腔材料生物试验方法 溶血试验》;
- YY/T 0127.2《口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 急性全身毒性试验:静脉途径》;
- YY/T 0127.3《口腔医疗器械生物学评价 第3部分:根管内应用试验》;
- YY/T 0127.4《口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 骨埋植试验》;
- YY/T 0127.5《口腔医疗器械生物学评价 第5部分:吸入毒性试验》;
- YY/T 0127.6《口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 显性致死试验》;
- YY/T 0127.7《口腔医疗器械生物学评价 第7部分:牙髓牙本质应用试验》;
- YY/T 0127.8《口腔材料生物学评价 第2单元:口腔材料生物试验方法 皮下植入试验》;
- YY/T 0127.9《口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 细胞毒性试验:琼脂扩散法及滤膜扩散法》;
- YY/T 0127.10《口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验(Ames 试验)》;
- YY/T 0127.11《口腔医疗器械生物学评价 第11部分:盖髓试验》;
- YY/T 0127.12《牙科学 口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 微核试验》;
- YY/T 0127.13《口腔医疗器械生物学评价 第13部分:口腔黏膜刺激试验》;
- YY/T 0127.14《口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 急性经口全身毒性试验》;
- YY/T 0127.15《口腔医疗器械生物学评价 第15部分:亚急性和亚慢性全身毒性试验:经口途径》;
- YY/T 0127.16《口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 哺乳动物细胞体外染色体畸变试验》;
- YY/T 0127.17《口腔医疗器械生物学评价 第17部分:小鼠淋巴瘤细胞(TK)基因突变试验》;
- YY/T 0127.18《口腔医疗器械生物学评价 第18部分:牙本质屏障细胞毒性试验》;

本部分为 YY/T 0127 的第 15 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替了 YY/T 0127.15—2009《口腔医疗器械生物学评价 第2单元:试验方法 亚急性和亚慢性全身毒性试验:经口途径》。

本部分与 YY/T 0127.15—2009 的主要技术变化如下:

- 修改了标准名称;
- 修改了规范性引用文件,将“GB/T 16886.12”修改为“ISO 10993-12”,增加了“ISO 10993-11 医疗器械生物学评价 第11部分:全身毒性试验”标准;
- 第3章“目的”改为“目的与原则”,增加了“试验原则”的内容,删除原第5章中该部分内容;
- 删除了术语和定义中的“剂量 Dose”定义,并增加 ISO 10993-11 中给出的术语和定义适用于本部分;
- 将“每组试验动物 10 只”修改为“每组试验动物至少 20 只(亚急性试验至少 10 只)”;
- 将“单剂量组试验,试验剂量为 1 000 mg/(kg 体重·d)”修改为“单剂量组试验,试验剂量至少

为 1 000 mg/(kg 体重·d)”;

——将“亚慢性试验每周 5 d 给服材料”修改为“亚慢性试验每周 7 d 给服材料”；

——修改了附录 A“常见临床症状和观察项目”。

本部分由国家药品监督管理局提出。

本部分由全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会(SAC/TC 99)归口。

本部分起草单位：国家药品监督管理局北大医疗器械质量监督检验中心、四川医疗器械生物材料和制品检验中心、上海生物材料研究测试中心。

本部分主要起草人：林红、韩建民、李盛林、葛兮源、傅嘉、梁洁、袁墩、孙皎、黄哲伟、陆华。

本部分的历次发布情况如下：

——YY/T 0127.15—2009。

引 言

医疗器械种类繁多,在评价与口腔组织接触的医疗器械经口途径全身毒性时,应根据器械或材料与口腔组织接触的时间具体选择亚急性或亚慢性试验。大多数情况下亚急性试验经口给服时间为 28 d,亚慢性试验为 90 d。

口腔医疗器械生物学评价

第 15 部分：亚急性和亚慢性全身毒性试验： 经口途径

1 范围

YY/T 0127 的本部分规定了口腔医疗器械亚急性和亚慢性经口全身毒性试验方法。本部分适用于评价与口腔接触的医疗器械经口途径的亚急性和亚慢性全身毒性。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本标准。

ISO 10993-11 医疗器械生物学评价 第 11 部分:全身毒性试验(Biological evaluation of medical devices—Part 11:Tests for systemic toxicity)

ISO 10993-12 医疗器械生物学评价 第 12 部分:样品制备与参照样品(Biological evaluation of medical devices—Part 12:Sample preparation and reference materials)

3 目的与原则

3.1 目的

本试验系在一定时期内(28 d 或 90 d)将口腔医疗器械或医疗器械浸提液重复多次经口灌注动物体内,测定其对试验动物的影响,以判定其是否具有潜在的亚急性或亚慢性全身毒性作用。

3.2 试验原则

在评价口腔医疗器械毒性特征的过程中,进行经口途径重复给服毒性试验时,可参照急性毒性试验信息。

本试验为获得一定时期内反复多次经口给服受试样品而引起的健康危害提供相关信息。重复给服的时间亚急性全身毒性试验一般为 28 d,亚慢性全身毒性试验一般为 90 d。为了获得尽可能多的信息而要对动物进行仔细的临床观察。

给服期间每日密切观察动物的毒性反应,期间死亡或试验结束被处死的动物要进行尸检。

注:ISO 10993-11 中的试验原则适用于本文件。

4 术语和定义

ISO 10993-11 中界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

4.1

无可见有害作用水平 no observed adverse effect level;NOAEL

在规定的试验条件下,用现有的技术手段或检测指标未观察到任何与受试样品有关的毒性作用的

最大接触剂量。

4.2

附加组 satellite group

在试验中增设的一组,该组试验动物数与其他组相同,给服剂量与最高剂量组相同,在高剂量组给服停止后需继续观察 14 d (在亚慢性试验中为 28 d),以研究毒性作用的可逆性、持续性和迟发效应。

5 试验方法

5.1 试样制备

5.1.1 一般要求

受试物应溶解或悬浮于适宜的介质中,建议首选水,其次是植物油(如玉米油),或考虑使用其他介质。对非水溶性介质,应了解其毒理特性,否则应在试验前先确定其毒性。推荐通过调整受试物溶液浓度使各剂量组经口给服的容量接近一致。

若受试物为材料浸提液,则按照 ISO 10993-12 的规定进行材料浸提液的制备。

5.1.2 分散介质

根据所用材料,选择如下分散介质之一,使配成的材料呈溶液、乳浊液或悬浮液。

5.1.2.1 蒸馏水。

5.1.2.2 2%淀粉溶液:将 4 g 淀粉溶于 200 mL 蒸馏水中,煮沸后冷却至室温,备用。或将 2%淀粉液置于 4 ℃冰箱中,于 24 h 之内使用,用前恢复温度至室温。

5.1.2.3 食用纯玉米油或橄榄油。

5.1.2.4 其他合适的分散介质(如:1%~3%羧甲基纤维素溶液,明胶溶液)。

5.1.2.5 0.154 mol/L 氯化钠溶液(生理盐水)。

5.1.3 试验材料预备

5.1.3.1 固体材料

将材料冷研成或切削成粒度小于 200 μm 的颗粒。制备过程中使用的器具均应不被油、灰尘污染。若需消毒,则于 121 ℃消毒 30 min。若材料不能用蒸汽灭菌法消毒,则用相应其他方法消毒,但应对消毒方法的适用性进行说明。

5.1.3.2 糊状或橡皮样材料

将一定量的材料放于分散介质中达到指定的浓度。用高速搅拌器搅拌混合 30 s,如需过滤,则应计算滤液中材料的浓度。

5.1.4 试样制备

水溶性材料,用 5.1.2.1 中的介质制备成 20%的水溶液。油溶性材料,用 5.1.2.3 中的介质制备成 20%油溶液。水油均难溶者可用 5.1.2.2 中的介质配成 20%混悬液。若材料不能制备成溶液、混悬液或乳浊液,或材料难以制成粒度小于 200 μm 的颗粒,则制备材料浸提液。

5.2 试验动物

一般首选健康、初成年大鼠,适用时也可选用其他实验动物。如使用雌性动物,宜未育并无孕。动物体重范围为 130 g \pm 20 g。试验开始时,同性别动物体重之间相差不得超过平均体重的 20%。在试验

前至少 5 d 使动物适应实验室环境。试验动物及动物饲养应符合国家相应规定。选用常规饲料,饮水不限制。

5.3 试验组设定及剂量选择

将大鼠随机分为试验组和对照组。亚慢性试验每组试验动物至少 20 只(亚急性试验至少 10 只),雌、雄各半。若计划在试验过程中处死动物,应增加动物数。

每一种供试品应至少设立一个试验组和一个对照组,必要时还可增设不同剂量的试验组和一个附加组。附加组动物数与其他组相同,剂量与最高剂量组相同,在高剂量组给服停止后继续观察 14 d(亚慢性试验 28 d),以研究毒性作用的可逆性、持续性和迟发效应。

如根据器械材料成分和结构方面的相关数据预期给予 1 000 mg/(kg 体重·d)剂量不会出现毒性反应时,可考虑进行单剂量组试验,试验剂量至少为 1 000 mg/(kg 体重·d)。

若无任何数据可以参考,则需进行剂量筛选试验以确定试验剂量。对照组除不接触受试样品外,其他条件应与试验组完全相同。

剂量水平的设计应考虑有关受试物或相关材料的全部毒理学数据。为了得出明确的剂量反应关系,一般设高、中、低 3 个剂量水平组。高剂量应为引起动物明显毒性反应的最低剂量。中剂量应引起较轻的毒性反应即观察到有害作用的最低剂量。低剂量组应不产生任何毒性反应,即相当于未观察到有害作用的最高剂量(将 NOAEL 作为最低剂量组)。

亚慢性毒性试验中高剂量选择可参考如下两个方法:如果能够确定受试物的 LD₅₀ 值,可以参考 LD₅₀ 值的 1/20~1/5 为最高剂量。或以急性毒性的阈剂量为该受试物的最高剂量。高、中、低 3 个剂量组间距选择可参考文献[1]~[3]。

若用浸提液试验,可设定单剂量组试验。根据 ISO 10993-12 的要求制备浸提液,以此浸提液为试验剂量水平。对照组给服同体积的浸提介质。

5.4 给服方法

用连有灌胃针头的注射器或其他灌胃法给服试样。亚急性试验每周 7 d 给服材料,持续 28 d。亚慢性试验每周 7 d 给服材料,持续 90 d。给服液体体积不超过 10 mL/kg 体重。只有是水溶液时,给服体积可不超过 20 mL/kg。在给服高浓度刺激性或腐蚀性物质将会导致严重副作用的情况时,应调整受试样品溶液浓度使各剂量组给服体积尽量一致。每天给服试样的时间尽量一致,必要时应根据动物体重调整给服量,使之维持在恒定的剂量水平。给服试样前需禁食数小时至过夜,不禁水。

5.5 临床观察

亚急性试验观察期为 28 d,亚慢性试验观察期为 90 d。亚急性试验附加组在试验结束后应继续观察 14 d,亚慢性试验附加组在试验结束后应继续观察 28 d,期间不进行任何处置,以观察给药后毒性作用的可逆性、持续性和迟发效应。

至少每天定时观察试验动物的临床表现,要考虑到给服后预期出现反应的高峰时间。每天至少 2 次观察记录动物的发病率和死亡率。

建议在动物试验前和试验后,最好对所有试验动物,至少应对最高剂量组和对照组动物,使用检眼镜或其他有关设备进行眼科检查。若发现动物有眼科变化则应对所有动物进行检查。

第一次给服前及至少每周一次对所有动物详细记录临床表现。观察宜在笼外工作台上进行,最好每天定时进行。观察记录应尽量详细,最好采用明确的记分系统。应采取相应措施使试验条件保持稳定,最好由非试验操作人员进行观察。

观察并记录皮肤、被毛、眼、黏膜的改变和呼吸系统、循环系统、神经系统、肢体活动、行为方式等变化发生的时间、程度和持续时间。

如发现动物死亡或濒危应及时解剖或冷藏后解剖检查,以减少动物同类互残及死后组织自溶。观察项目见附录 A。

5.6 体重和摄食量

所有动物至少每周称重一次。至少每周测量一次饲料的消耗量。

5.7 血液学检查

试验结束时进行血液学检查。检查项目参见附录 B。血样在处死动物前或处死动物时采集,并贮存在合适的条件下。

5.8 临床生化检查

试验结束时进行。推荐隔夜禁食空腹取血进行临床生化检查,检查项目参见附录 B。在某些情况下还应增加检测与肝或其他器官有关的一些酶和胆酸。如出现肉眼可见的器官改变,可考虑增加与之相应的血清标记物检测。

5.9 尿液检查

尿液检查不作为常规检验,仅在预期或观察到有这方面的毒性反应的情况下才考虑进行。检验时在试验的最后一周内定时采集尿液(如 16 h~24 h)。检查项目参见附录 B。

5.10 大体解剖

试验结束时,将全部试验动物无痛处死后进行大体解剖及脏器检查,包括体表及体表孔口、颅、胸腔、腹腔及内脏等。

将全部试验动物(垂死的和或中间处死的动物除外)的肝、肾、肾上腺、睾丸(卵巢)、附睾(子宫)、胸腺、脾、脑和心脏等取下后去除其上附着组织后尽快称量其湿质量,以防止干燥。

根据供试品预期作用途径选择需进一步进行组织病理学检查的器官或组织,取下后置于适宜的固定液中。具体器官和组织参见附录 C。

5.11 组织病理学检查

检查应包括:

- a) 所有最高剂量组和对照组动物的器官或组织。
- b) 低、中剂量组,宜对动物肺脏进行组织病理学检查便于判定动物的健康状态。还宜考虑对低、中剂量组进行肝和肾的组织病理学检查,其他组织病理学检查可不必常规进行,如高剂量组动物的器官或组织有组织病理学的变化,则应检查低、中剂量组动物的相应器官和组织。
- c) 各剂量组大体尸检有异常的器官和组织。
- d) 附加组动物的被其他试验组证明有病变的器官和组织。

5.12 结果评价

试验结果以表格形式总结。内容包括各组动物数、在试验中死亡或被人道处死的动物数及死亡或被人道处死的时间、出现毒性反应的动物数、观察到的毒性反应类型的描述(包括开始的时间、持续时间和严重程度)以及出现每种毒性反应动物的百分比。

综合临床观察、临床检查、大体尸检、组织病理学检查的结果,对受试样品在亚急性(亚慢性)全身毒性试验中是否有毒作用及其毒作用特点,包括受试样品的靶器官、蓄积毒性等做出初步评价。

采用适当的统计学方法进行分析。在试验设计时选择好统计学方法。

5.13 试验记录

试验记录应包括如下信息：

- a) 试验物质：
 - 物理性质、纯度和生物化学性能；
 - 其他表征描述数据。
- b) 介质(若适用)：
 - 如选择水之外的介质,进行论证。
- c) 试验动物：
 - 所用动物种属、品系；
 - 动物数量、年龄、体重和性别；
 - 来源、饲养条件、饮食等；
 - 试验开始时的体重。
- d) 试验条件：
 - 剂量选择说明；
 - 适宜时,试验物质配方/制备的详细说明;达到的浓度;稳定性和同质性；
 - 受试样品给服的详细说明；
 - 适宜时,试验物质浓度(mg/kg)转换至实际剂量[mg/(kg·bw·d)]；
 - 饲料、水质量的详细说明。
- e) 结果：
 - 体重/体重变化；
 - 若适用,饲料和水的消耗；
 - 性别和剂量水平的毒性反应数据,包括毒性体征；
 - 临床观察情况、严重程度和持续时间(不论是否为可逆性)；
 - 血液学试验和结果以及相关基线数据；
 - 临床生化学试验和结果以及相关基线数据；
 - 最终体重和器官重量数据；
 - 尸检发现；
 - 全部组织病理学检查详细描述；
 - 结果的统计学分析。
- f) 结果讨论。
- g) 结论。

附 录 A
(资料性附录)
常见临床症状和观察项目

常见临床症状和观察项目见表 A.1。

表 A.1 常见临床症状和观察项目

临床观察	观察症状	涉及的系统
呼吸	呼吸困难(腹式呼吸、气喘)、呼吸暂停、紫绀、呼吸急促、鼻流液	中枢神经系统(CNS)、肺、心脏
肌肉运动	嗜睡减轻或加重、扶正缺失、感觉缺乏、全身僵硬、共济失调、异常运动、俯卧、震颤、肌肉抽搐	CNS、躯体肌肉、感觉、神经肌肉、自主性
痉挛	阵挛、强直、强直性阵挛、昏厥、角弓反张	CNS、神经肌肉、自主性、呼吸
反射	角膜、翻正、牵张、对光、惊跳反射	CNS、感觉、自主性、神经肌肉
眼症状	流泪、瞳孔缩小/散大、眼球突出、上睑下垂、混浊、虹膜炎、结膜炎、血泪症、瞬膜松弛	自主性、刺激性
心血管症状	心动过缓、心动过速、心律不齐、血管舒张、血管收缩	CNS、自主性、心脏、肺
流涎	过多	自主性
立毛	被毛粗糙	自主性
痛觉丧失	反应降低	CNS、感觉
肌肉状态	张力减退、张力亢进	自主性
胃肠	软便、腹泻、呕吐、多尿、鼻液溢	CNS、自主性、感觉、胃肠运动性、肾
皮肤	水肿、红斑	组织损害、刺激性

附录 B

(资料性附录)

推荐的血液学、临床化学和尿液检查

B.1 血液学

- 凝血(PT、APTT);
- 血红蛋白浓度;
- 红细胞容积;
- 血小板计数;
- 红细胞计数;
- 白细胞计数;
- 白细胞分类。

B.2 临床化学

- 白蛋白;
- ALP;
- ALT;
- AST;
- 钙;
- 氯;
- 胆固醇;
- 肌酐;
- GGT;
- 血糖;
- 磷;
- 钾;
- 钠;
- 总胆红素;
- 总蛋白;
- 甘油三酯;
- 尿素氮;
- 其他酶类,若适用;
- 可考虑将总免疫球蛋白水平作为免疫毒性的指示器。

B.3 尿液分析(定期采集,如 16 h~24 h)

- 外观;
- 胆红素;
- 尿糖;

- 酮；
- 隐血；
- 蛋白；
- 沉渣；
- 比重或渗透压；
- 体积；
- 如怀疑试验样品导致特异性器官毒性时，可选用其他合适的试验（通常要求冷冻样品采集）。

附 录 C
(资料性附录)

推荐进行组织病理学评价的器官

推荐进行组织病理学评价的器官包括：

- 肾上腺 * ；
- 全部大体损害(包括试验位置)；
- 大动脉；
- 骨髓(大腿骨、肋骨或胸骨)；
- 脑 * (有代表性部分,包括大脑、小脑和脑桥)；
- 盲肠；
- 结肠；
- 十二指肠；
- 附睾 * ；
- 食管；
- 眼；
- 胆囊(如有)；
- 心脏 * ；
- 回肠；
- 空肠；
- 肾 * ；
- 肝 * ；
- 肺和支气管(经充气并浸入固定剂内保存)；
- 淋巴结(代表局部接触位置和远端全身作用的淋巴结)；
- 乳腺(雌性)；
- 肌肉(骨骼肌)；
- 鼻甲骨(用于吸入试验)；
- 神经(坐骨神经或胫骨神经,最好贴近肌肉)；
- 卵巢 * ；
- 胰腺；
- 甲状旁腺；
- 脑垂体；
- 前列腺；
- 直肠；
- 唾液腺；
- 精囊；
- 皮肤；
- 脊髓；
- 脾 * ；
- 胸骨；
- 胃；
- 睾丸 * ；

- 胸腺 * ；
- 甲状腺；
- 气管；
- 膀胱；
- 子宫 *（包括子宫颈和输卵管）；
- 阴道。

标星号的器官、组织在进行组织病理学评价时宜称重,如需要,其他器官也要称重。临床和其他发现可显示检查其他组织的必要性,而且宜根据已知的试验物质特性保存可能的靶器官。

参 考 文 献

- [1] 周宗灿.毒理学基础[M].2版.北京:北京医科大学出版社,2000.
 - [2] 李寿琪.毒理学原理与方法[M].2版.成都:四川大学出版社,2003.
 - [3] 王心如.毒理学实验方法与技术[M].2版.北京:人民卫生出版社,2007.
 - [4] OECD guidelines for the testing of chemicals No.407 Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents,2008年.
 - [5] OECD guidelines for the testing of chemicals No.408 Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents,1998年.
-