

ICS 11.040.30

CCS C 30

GB

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

人类辅助生殖技术用医疗器械

体外鼠胚试验

Medical devices for human assisted reproductive technology— In vitro  
mouse embryo assay

(草案)

XXXX-XX-XX发布

XXXX-XX-XX实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会

发布

# 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020给出的规则起草。

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并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：



# 人类辅助生殖技术用医疗器械

## 体外鼠胚试验

### 1 范围

本文件规定了体外鼠胚试验方法，适用于与配子和/或胚胎接触的人类辅助生殖技术用医疗器械的安全性评价。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件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文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分：动物福利

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照样品

GB/T XXXX 人类辅助生殖技术用医疗器械 术语和定义

### 3 术语、定义和缩略语

#### 3.1 术语、定义

GB/T XXXX界定的以及下列术语适用于本文件。

注：以下胚胎均指小鼠胚胎。

##### 3.1.1

**囊胚 blastocyst**

受精卵经卵裂形成的具有囊胚腔的胚胎。

##### 3.1.2

**1-细胞胚胎 1-Cell Embryo**

受精但尚未发生卵裂的合子。

#### 3.2 缩略语

PMSG: 孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotrophin)

hCG: 人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin)

### 4 试验方法

#### 4.1 概述

本试验是采用小鼠胚胎体外常规培养体系，在从受精卵到囊胚的培养过程中，根据待评价产品的功能和特性，在相应培养环节使用待评价液体类产品或者器具类产品的浸提液，通过观察早期胚胎从受精卵到囊胚的发育情况来评价待评价产品对胚胎发育的潜在毒性。

试验步骤应当尽可能模拟供试品用于人类辅助生殖培养的操作程序。本试验需要在具备条件的洁净实验室内进行。

## 4.2 试验材料

### 4.2.1 试验动物

试验动物品系：选择敏感和稳定的品系。

试验动物周龄：宜选取6周龄~8周龄雌鼠，性成熟雄鼠。

动物福利应符合GB/T 16886.2的要求。

注：有关试验动物品系的选择参见附录A，推荐使用B6D2F1等杂交一代小鼠。试验动物购买自有资质的试验动物生产机构。

### 4.2.2 试剂

- a) PMSG。
- b) hCG。
- c) 适合的培养液。
- d) 透明质酸酶。
- c) 培养用油。

注：试验中使用的与配子、胚胎接触的试剂需选取经鼠胚试验检测合格或已上市产品。

### 4.2.3 耗材

- a) 显微镊。
- b) 眼科剪。
- c) 移卵装置。
- d) 10 $\mu$ L、100 $\mu$ L、1000 $\mu$ L移液器吸头。
- e) 培养皿。

注：试验中使用的与配子、胚胎接触的耗材需选取经鼠胚试验检测合格或已上市产品。

### 4.2.4 仪器

- a) CO<sub>2</sub>培养箱

温度37 $^{\circ}$ C  $\pm$ 0.3 $^{\circ}$ C,相对湿度大于90%(饱和湿度), 5%或6% CO<sub>2</sub>; 或者三气培养箱。

- b) 体视置显微镜和倒置显微镜

注：如采用干式培养，则对湿度无硬性要求。

### 4.3 试验过程

#### 4.3.1 样品准备

##### 4.3.1.1 供试品准备

胚胎体外培养相关的液体类供试品，按照产品使用说明进行合理运输、保存和使用。试验过程中根据产品的临床使用说明来准备供试品。人类辅助生殖器具类供试品按照GB/T 16886.12的要求合理浸提，浸提介质推荐使用经鼠胚试验检测合格的培养液或已上市产品。

##### 4.3.1.2 对照组准备

###### a) 阳性对照组

所使用的阳性对照品应经方法学验证，证实其在规定的使用方法和剂量下能够产生有统计学意义的胚胎毒性。

###### b) 阴性对照组

阴性对照组使用经鼠胚试验检测合格的培养液或已上市产品。

#### 4.3.2 试验程序

##### 4.3.2.1 超数排卵

选择6周龄~8周龄雌鼠，经腹腔注射PMSG 10IU/只；PMSG注射后46h~48h后经腹腔注射hCG 10IU/只，注射 hCG当日雌鼠与同品系雄鼠合笼过夜。

##### 4.3.2.2 准备培养皿

培养胚胎前在细胞培养皿中制备一定数量30 $\mu$ L~50 $\mu$ L大小的液体微滴(培养液)，表面覆盖培养用油，在CO<sub>2</sub>培养箱内预平衡4h~18h。

##### 4.3.2.3 鼠胚采集

合笼第二天早上检查交配情况，选择见栓小鼠备用。

1- 细胞胚胎收集：注射hCG后18h~22h后处死见栓雌鼠，在输卵管壶腹部收集1-细胞胚胎。将收集到的絮状受精卵团放置到37 $^{\circ}$ C提前预热好的透明质酸酶中，当胚胎周围的卵丘和颗粒细胞被消化分离后立即转移、清洗后，挑选出正常形态的受精胚胎，转移到培养微滴中，用于1-细胞鼠胚检测试验。

##### 4.3.2.4 体外培养

采用微滴法培养，将收集到的鼠胚随机分成一个阳性对照组、一个阴性对照组和一个供试品组，置于已平衡的培养液(见4.3.2.2)中，于CO<sub>2</sub>培养箱中培养。每组鼠胚数不少于50个。

注1：每组试验鼠胚来自3只~5只小鼠，将每只孕鼠的胚胎随机分配到各试验组进行试验。建议每个微滴中不超过20个胚胎。

注2：供试品准备、试验过程中供试品接触方式、供试品接触时间随供试品种类而各有不同，具体给样时间和方式参照附录B。

### 4.3.3 试验结果

1-细胞胚胎体外接触培养96h后记录囊胚数量。观察指标：囊胚形态观察。

可接受准则：

- a) 阳性对照组的囊胚形成率显著低于阴性对照组；
- b) 阴性对照组的囊胚形成率 $\geq 80\%$ 。

### 4.3.4 试验结果报告

#### 4.3.4.1 数据分析

对形成囊胚的受精卵比例进行计算：

$$\text{囊胚形成率 (\%)} = \frac{\text{囊胚数}}{1 - \text{细胞数}} \times 100\%$$

#### 4.3.4.2 囊胚质量判断

目前常用的方法主要有形态观察法。

发育良好的囊胚，囊胚腔充分扩张，内细胞团大小适中，滋养层细胞连接紧密且大小均匀。发育差的囊胚，囊胚腔小，内细胞团小或无内细胞团，滋养层细胞稀疏。

注：在具备技术条件的情况下，鼓励兼用囊胚细胞计数法对发育期的胚胎进行分析。

#### 4.3.4.3 试验报告内容

试验报告应包含如下信息：

- a) 供试品信息；
- b) 试验动物信息；
- c) 试验条件；
- d) 试验程序；
- e) 试验结果；
- f) 试验结论。

## 附录 A

### (资料性附录)

#### 关于试验动物选择的说明

实验动物按遗传学可分为同基因型(近交系、突变系、杂交F1 代等)和不同基因型(封闭群)。

在鼠胚试验中收集胚胎用的小鼠，应具备遗传稳定、对药物敏感且敏感性均一的特点。近交系小鼠和杂交F1 代小鼠具有基因型相同、遗传稳定、表现型均一的特点，国际上常用的F1代动物有：AKD2F、BA2CF1、BCF1、BCBAF1、B6DIF1、CKAF1、B6D2F1、CBA/C57、CAF1等。

## 附录 B

### (资料性附录)

#### 试验中供试品接触时间和接触方式的确定

鼠胚试验中使用的液体大致分为两类，一类是相对长时间的直接或者间接接触胚胎，例如胚胎培养液、囊胚培养液、体外受精液、培养用油等，在胚胎培养的过程中需要与胚胎直接或者间接的接触 24h 以上；一类是相对短时间的直接或间接接触胚胎，例如卵泡冲洗液等，在胚胎体外培养过程中与胚胎接触时间短，大约在数小时或者数分钟。因此，在鼠胚试验中，要根据体外培养的实际操作情况，让鼠胚在待评价测液体中孵育时间尽可能地接近实际培养时间。

表B.1 试验中供试品接触时间和接触方式的确定

鼠胚操作 步骤	供试品								
	卵泡冲洗液/缓冲液/精子洗涤液	胚胎冷冻/解冻液	受精液	卵裂培养液	囊胚培养液	器具类产品浸提液	颗粒细胞去除液/冷冻、解冻套装	培养用油	其他
收集胚胎	缓冲液	缓冲液	缓冲液	缓冲液	缓冲液	缓冲液	缓冲液	缓冲液	缓冲液(M2)
培养前处理	供试品中孵育 20 min	按照供试品生产使用方法进行处理	供试品中孵育 24 h	供试品中清洗 2~3 遍	培养液		参照产品说明书处理	培养液	
1~2 细胞胚胎到 6~8 细胞	培养液中培养	培养液中培养	培养液中培养	供试品中培养至 6-8 细胞	培养液	供试品浸提液中培养	培养液	培养液，培养液上覆盖供试品	液体类： 根据产品使用方式在胚胎相应培养阶段使用
6~8 细胞到囊胚	培养液中培养	培养液中培养	培养液中培养	培养液中培养	供试品中培养至囊胚	供试品浸提液中培养	培养液	培养液，培养液上覆盖供试品	

注：1. 缓冲液和培养液选择经鼠胚试验检测合格的培养液或已上市产品。

2. 相较于临床实际使用，鼠胚试验所用胚胎数较多，冷冻、解冻液产品可根据操作胚胎数，适当调整各组份体积，鼓励在冷冻阶段进入液氮冷冻保存适当时间，再进行解冻操作。

## 参考文献

- [1]Gardner DK,Reed L,Linck D,Sheehan C,Lane M.Quality Control in Human IVF.Sem. Reprod.Med.23:319-324
- [2]Gardner DK,Lane M.Embryo Culture Systems in In Vitro Fertilization:A Practical Approach.Ed.Gardner DK,Informa Health Care,NY,2007:221-282
- [3]Weiss TJ,Warnes GM,Gardner DK.Mouse Embryos and Quality Control in Human IVF. Reprod.Fertil.Dev.1992,4(1):105-107
- [4]Davidson A,Vermesh M,Lobo RA,Paulson RJ.Mouse Embryo Culture as Quality Control for Human In Vitro Fertilization:The One-cell Versus Two-cell Model.Fert.Steril.1988,49: 514-521
- [5]US Federal Register,Obstetric and Gynecologic Devices:Reclassification and Classification of Medical Devices Used for In Vitro Fertilization and Related Assisted Reproduction Procedures.63: 48428-48437,1998.
- [6]Nagy A,Gertsenstein M,Vintersten K,Behringer R.Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual.3rd Ed.Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,2003
- [7]U.S.Department of Health and Human Services,Food and Drug Administration Center for Devices and Radiological Health,Devices Used for In Vitro Fertilization and Related Assisted Reproduction Procedures:Submission Guidance for a 510(k)Druft Guidance.
- [8]Australian Government,Department of Health and Ageing,Therapeutic Goods Administration,In Vitro Fertilisation(IVF)Solutions
-