ICS 11.040.40
C 45

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1575—2017

组织工程医疗器械产品　修复和替代骨组织植入物骨形成活性的体内评价指南

Tissue engineering medical device products—Standard guide for in vivo assessment of implantable devices intended to repair or regenerate bone defect

2017-08-18 发布　　2018-09-01 实施

国家食品药品监督管理总局　发布

目　　次

前言 …… Ⅲ
1　范围 …… 1
2　规范性引用文件 …… 1
3　术语和定义 …… 1
4　意义和用途 …… 3
5　动物模型 …… 3
6　不同动物临界骨缺损及范围 …… 6
7　缺损类型 …… 7
8　试验程序 …… 7
9　结果和评价 …… 9
10　分析 …… 10
参考文献 …… 11

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

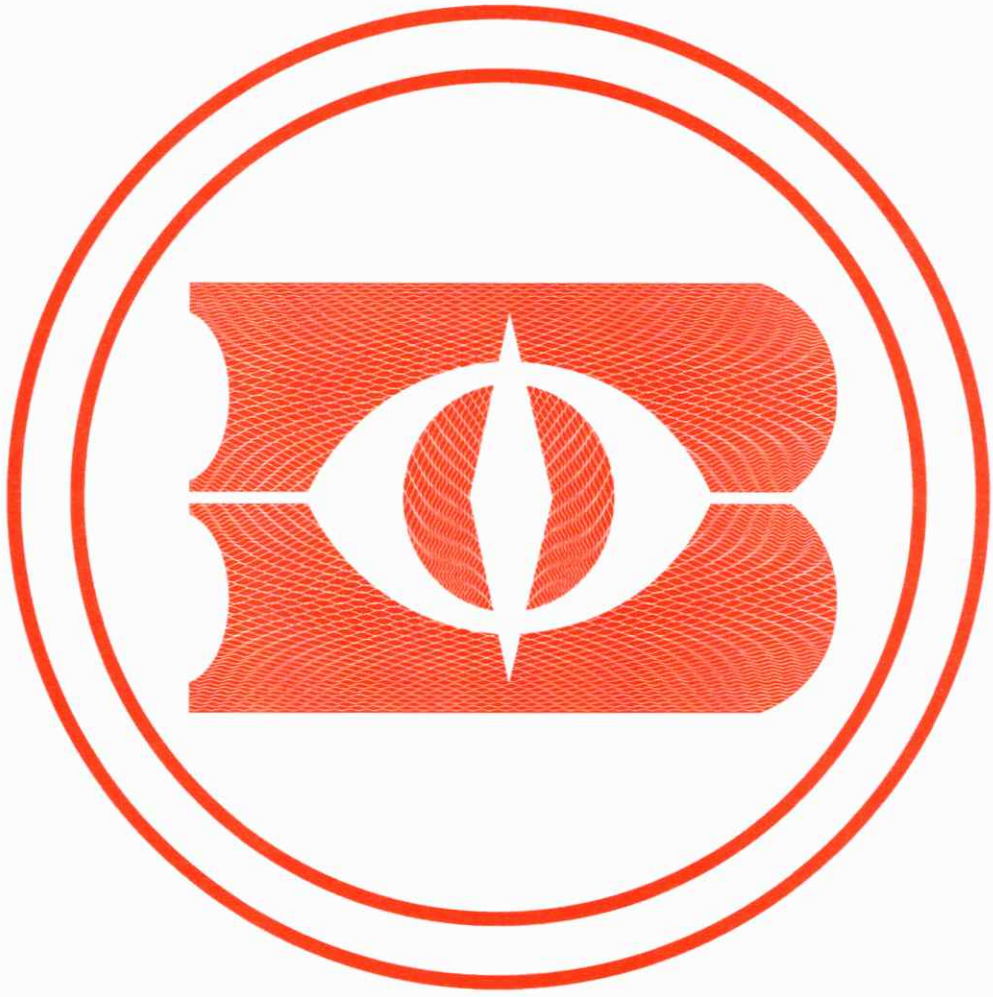
请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家食品药品监督管理总局提出。

本标准由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会(SAC/TC 110/SC 3)归口。

本标准起草单位:南方医科大学、中国食品药品检定研究院。

本标准主要起草人:欧阳钧、廖华。



组织工程医疗器械产品　修复和替代骨组织植入物骨形成活性的体内评价指南

1　范围

本标准规定了修复和替代骨组织缺损的植入物骨形成活性的体内评价通则。本标准中的植入物可由天然或合成生物材料(可生物降解),或其复合物构成。

本标准描述了大鼠、兔、犬、猪、羊等不同种属的动物模型和相应的试验程序,以及形态学、组织生物化学和生物力学分析等结果测定和评价方法。

本标准适用于修复和替代骨组织缺损的植入物。

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 16886.1　医疗器械生物学评价　第1部分:风险管理过程中的评价与试验(ISO 10993-1:2009,IDT)

ISO 12891　外科植入物的取出和分析(Retrieval and analysis of surgical implants)

3　术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

骨缺损　bone defect

先天性或后天性疾病以及外伤等原因造成完整骨骼的骨质缺失。

3.2

临界骨缺损　bone critical-size defect

动物体内终生不能自行修复的最小骨缺损。

3.3

软骨化骨　endochondral ossification

间充质细胞演变为软骨,即软骨雏形,为软骨原基,其中心的软骨细胞肥大,基质钙化,软骨膜血管侵入软骨细胞囊中,由成骨细胞的成骨活动而成骨,形成原始骨化中心,以后在骨干两端还出现继发骨化中心,骨化中心不断扩大,最后全部骨化完成骨骼的发育。躯干、四肢骨、颅底骨为软骨化骨形成。

3.4

膜化骨　intramembranous ossification

间充质细胞演变为纤维膜,而后膜内出现一个或多个骨化中心,再逐步扩大,完成骨的发育。面骨和颅盖诸骨为膜内化骨形成。

3.5

骨修复　bone repair

受损的骨或其替代物通过细胞增殖和新细胞外基质合成的愈合过程。

3.6

骨重建(塑) bone remodeling

骨基质和矿物质在体内的连续周转过程,首先是骨吸收(破骨过程),然后是骨形成(成骨过程)。这个重建过程保障了人体骨骼的力学性能完整,并对保持体内钙离子的动态平衡具有重要作用。

3.7

骨再生 bone regeneration

丢失的骨组织的重建或修复。

3.8

成骨细胞 osteoblast

分布于骨组织表面,胞体有细小突起,矮柱状或椭圆形,胞质嗜碱性。电镜下可见大量的粗面内质网和高尔基复合体。成骨细胞合成和分泌骨基质的有机成分,形成类骨质。成骨时,成骨细胞还释放基质小泡。泡内有细小的钙化结晶,是钙化的起始部位。成骨细胞分泌类骨质后被包埋于其中,便演变为骨细胞。

3.9

骨细胞 osteocyte

位于骨板内或骨板间,胞体较小,有许多细长突起,胞体所在的腔隙称骨陷窝;突起所在的腔隙称骨小管。骨细胞的结构和功能与其成熟度有关。刚转变的骨细胞与成骨细胞相似,仍能产生类骨质。随着类骨质逐渐钙化为骨质,细胞逐渐变为成熟的骨细胞。体积变小,细胞器减少,突起延长,相邻骨细胞的突起以缝隙连接相连,骨小管彼此相通。骨陷窝和骨小管内含有少量组织液。骨细胞具有一定的溶骨和成骨作用,参与调节钙、磷平衡。

3.10

破骨细胞 osteoclast

破骨细胞数量少,主要分布于骨组织的边缘,是一种多核的大细胞,含有6个~50个核。目前认为它由多个单核细胞融合而成,无分裂能力。胞质为嗜酸性,细胞器丰富,尤以溶酶体和线粒体居多。功能活跃的破骨细胞有明显的极性,光镜下可见破骨细胞贴近骨基质的一侧有皱褶缘。电镜下呈许多大小和长短不一的突起。胞质内含多种水解酶和有机酸,可以溶解骨盐,分解骨的有机成分。表明破骨细胞具有很强的溶骨和吸收能力。

3.11

骨质 bone substance

骨质由骨组织构成,分为骨密质和骨松质。骨组织又构成了骨质。骨密质质地致密,力学性能(抗拉压、抗扭转和抗弯曲性)较强,主要配布于骨表层。扁骨的骨密质配布于表层,称内板和外板。骨松质配布于中间,称板障。骨髓即充填于骨松质的网眼中。短骨和长骨的骨骺,外周是薄层的骨密质,内部为大量的骨松质。小梁的排列显示两个基本方向,一是与受力方向一致;另一则与肌肉的牵拉方向一致。二者构成最有效的承力系统。骨质在生活过程中,由于劳动、训练、疾病等各种因素的影响,表现出很大的可塑性。

3.12

骨膜 periosteum

是由纤维结缔组织(致密结缔组织)构成的纤维膜,被覆于除关节面以外的骨质表面,并有许多纤维束伸入于骨质内。此外,附着于骨的肌腱、韧带于附着部位都与骨膜编织在一起。因而骨膜与骨质结合甚为牢固。骨膜富含血管、神经,通过骨质的滋养孔分布于骨质和骨髓。包被在骨表面的,称骨外膜,衬附在骨髓腔面的则称骨内膜。

3.13

骨髓 bone marrow

是存在与骨中的柔软的海绵状造血组织，可产生白细胞、红细胞和血小板，隶属于结缔组织。

3.14

骨单位 osteon

又称哈弗斯系统，是长骨中起支持作用的主要结构，位于内、外环骨板之间的大量长柱状结构。由4层～20层同心圆排列的哈弗斯骨板(Haversian lamella)组成。其中轴有一纵行小管称中央管，内有血管神经走行。穿通管与中央管相通。

3.15

骨不连 non-union of bone

是骨折后常见并发症，又称为骨折不愈合，是骨折端在某些条件影响下，骨愈合停止，骨折端形成假关节。X线照片显示骨折端互相分离，间隙较大，骨端硬化，萎缩疏松，髓腔封闭。不论固定多久都不能愈合。

3.16

生物力学 biomechanics

生物力学是应用力学原理和方法定量研究生物体中力学问题的生物物理学分支。其研究范围从生物整体到系统、器官(包括血液、体液、脏器、骨骼等)、组织、细胞、蛋白和基因。生物力学的基础是能量守恒、动量守恒、质量守恒三定律及描写物理性质的本构方程。依研究对象的不同可分为生物流体力学、生物固体力学和运动生物力学等。

4 意义和用途

4.1 本标准的目的在于提供各种动物临界骨缺损体内模型，用于修复或替代骨组织缺损的医疗产品的临床前评价。

4.2 本标准包括动物模型介绍、手术要点、组织处理以及组织标本的定性和定量分析等。

4.3 本标准的使用者应按照GB/T 16886.1医疗器械生物学评价标准的要求，在做本部分所述的体内评价前，进行材料和/或器械的生物学评价。

4.4 动物模型结果不一定能准确预示人体使用结果，所以应谨慎解释在人体的可能适用性。

5 动物模型

表1说明了在确定合适的动物模型、临界骨缺损的大小、范围和部位等方面的考虑点。

注：表1为参考使用的动物模型，如采用其他模型，需提供超过临界骨缺损尺寸的依据。非纯种动物应增加样本量。

表1 常用骨缺损实验动物模型

种属	常用品种	年龄	体重/kg	通常使用的缺损部位[a]	临界骨缺损长度/mm	特征
大鼠	SD大鼠	4周～8周	0.18～0.28	股骨干	0.3～5	非横断、横断
猫	家猫	9个月	1.50～4.50	胫骨	10	横断、非横断
兔	日本大耳白兔	9个月	2.0～3.0	桡骨、胫骨、腓骨、股骨	8～15	横断
	新西兰大白兔	9个月	2.0～3.0	桡骨、胫骨、腓骨、股骨	8～15	横断

表 1（续）

种属	常用品种	年龄	体重/kg	通常使用的缺损部位[a]	临界骨缺损长度/mm	特征
犬	混种犬、Beagle 犬	>1 年～2 年	9.0～15.0	股骨、桡骨	20	横断
猪	小型猪	10 个月	10～60	下颌骨	20	非横断
羊	山羊	>1 年～2 年	20～30	胫骨、椎体	20～30	横断
猴	恒河猴	5 年～10 年	4.3～10.7	桡骨	25	横断
[a] 参考部位。						

5.1 骨缺损的部位和范围

5.1.1 由于人体的骨折和骨缺损多发于四肢长骨，对于软骨化骨，推荐在动物模型中使用股骨、胫骨、桡骨或腓骨缺损评价骨缺损的修复/再生。对于膜化骨，推荐使用颅骨缺损评价其修复/再生。脊柱缺损则推荐使用山羊椎体骨缺损模型。

5.1.2 不同种属的动物在体重、骨骼解剖、骨骼力学性能方面有显著差异，同种实验动物的个体差异，所选取试验部位的差异性，对骨缺损范围和修复再生均有较大影响。在制备骨缺损模型时宜仔细考虑缺损部位、范围和植入物研究阶段等因素。

5.1.3 应选择合适的动物和骨缺损部位，使其骨缺损部位、方式、范围适于进行对预期在人体使用的配方、设计、尺寸和配套使用器械等的充分研究和优化。

5.1.4 较大的动物具有和人类相似的生理反应，进行骨缺损试验有着先天的优势，更接近人体生理情况，更适于骨缺损修复研究。

5.1.5 较大的缺损通常需要某种方式的固定以保护植入物，减少植入物脱位。植入物的固定方法可能对缺损周围宿主组织和修复有不利影响。小型动物通常不需要固定，通过小型动物试验结果预测在需要固定的大型动物和人体试验的结果时，需要注意试验中植入物设计的不同之处。

5.1.6 对每种动物而言，临界骨缺损是指动物体内终生不能自行修复的最小骨缺损，每种动物的临界骨缺损值通常不同，应在设计骨缺损范围、植入物大小和固定方法时应仔细考虑。

力学载荷影响骨缺损修复。在力学生物学因素中，肌肉张力，牵拉和剪切等应力因素等在调控骨骼的生长发育、滋养等方面起着重要作用。力学载荷的大小，形式，性质及作用时间对植入物、植入部位周围软组织及临近骨组织的解剖位置和骨骼移位变化均有影响。因此，选择用于评价植入物的缺损部位时应体现力学载荷对植入物性能的影响。

5.1.7 当分析植入部位在站立和运动中的受力状况时，应考虑每一种属动物的步态和姿态。

5.1.8 股骨、胫骨、桡骨和腓骨本身以及处于不同解剖部位的受力形式状态和强度显著不同。

5.1.9 由于动物跑动、跳跃、骨骼肌牵拉、关节过度伸展或屈曲而使植入物受到过度和迅速变化的应力，会导致试验结果变异性增加，应采取措施减少缺损部位或缺损肢体快速和/或过度运动的行为或其他因素。

5.2 动物性别与年龄

5.2.1 由于血液循环中类固醇对骨代谢和再生的影响，应考虑试验动物的性别。不应使用妊娠和哺乳期的动物。推荐试验组群内的试验动物性别一致。

5.2.2 在生长过程中，骨和关节处于代谢和重塑的动态变化中。由于存在这些生理过程对组织修复的影响，因此试验中每种动物的年龄应超过骨骼成熟年龄。试验组群内的动物应骨骺闭合。每种动物骨

骼成熟情况有所不同，需要时通常可用放射显影确定是否涉及年龄因素。

5.2.3 大龄动物更有可能发生骨质减少和退行性关节病，如骨关节炎，导致骨修复能力下降。除非这些情况对植入物的预期目的具有重要意义，应避免使用大龄动物。干细胞源、生长因子反应性和细胞代谢活性通常随年龄增加而降低。因此，取决于宿主细胞数量和活性的修复过程在更老的动物中可能受一定影响。

5.3 研究周期

5.3.1 研究周期长短取决于植入物的开发阶段、动物种属、缺损大小以及植入物的组成和设计。

5.3.2 在小型动物模型，植入 6 周～8 周的小缺损可以提供植入物和固定器械存留时间，以及修复类型等方面的信息。

5.3.3 对于大型动物模型，8 周～12 周的研究仅限于提供生物相容性、早期细胞反应以及缺损内植入物的存留和状况等方面的信息。

5.3.4 在形态学和组织生物化学检测结果(包括邻近骨、软骨和骨缺损下骨界面)的基础上判断骨缺损修复或再生程度通常需要 8 个月～12 个月的研究。

5.4 大鼠模型

5.4.1 与其他动物相比，大鼠模型非常经济，便于获取。

5.4.2 由于受到体型及其主要长骨的长度限制，骨缺损的尺寸受限，应用机会较小。

5.4.3 大鼠模型多采用股骨的闭合性横行骨折：最适于采用组织学方式评价骨缺损的修复。暂时还无法获取大鼠长骨临界骨缺损的精确数值。

5.4.4 大鼠也常用于颅骨缺损及修复的评价。

5.5 兔模型

5.5.1 与大型动物相比，兔模型通常更为经济。

5.5.2 兔由于体型适中，性情温顺，非常便于饲养管理，所以在骨缺损所选用的实验动物中被广泛采用。

5.5.3 兔模型最适于评价生物相容性、材料配方以及植入物基本设计筛选等。在试验性骨不连模型制作方面，桡骨，胫骨及股骨都是经常使用的植入物评价部位。

5.6 猫模型

5.6.1 猫的体型相对较大，大多数性情温顺，易于饲养，可以用于骨缺损修复的试验研究。

5.6.2 猫的胫骨多用于骨缺损模型的制备。

5.7 犬模型

5.7.1 犬的体型适中，骨的长度较为适宜进行骨缺损修复试验，但是由于购买及饲养管理所需费用较高，在某种程度上限制了试验者对其的选用。

5.7.2 犬的股骨、胫骨、尺骨、桡骨等长骨可作为骨缺损模型的制备和评价部位。

5.8 猪模型

猪的体型较为适中，但是由于饲养及管理方面问题，较少应用。可选择小型猪(如 Göttingen minipigs，增加品系如香猪、云南巴马猪、西藏小型猪)作为骨缺损研究的试验对象，下颌骨和脊柱常被选为骨缺损及植入物的评价部位。

5.9 山羊模型

5.9.1 山羊四肢长骨的长度与人类四肢骨的长度接近，故较多用于骨不连模型的制备及评价骨修复材料的修复能力。

5.9.2 山羊胫骨、跖骨通常用作骨缺损及植入试验部位。

5.9.3 与绵羊相比，通常认为山羊对人为手术干预耐受性好。

5.9.4 在纳入试验组前，每只山羊应通过山羊脑炎的血液筛选。

6 不同动物临界骨缺损及范围

6.1 软骨化骨

6.1.1 股骨

6.1.1.1 股骨周围无其他长骨、骨间膜等结构影响试验结果的科学性，是常用的骨缺损部位。

6.1.1.2 小型动物(大鼠)可制备闭合性横行骨折，缺损长度 0.4 mm 左右。

6.1.1.3 中型动物(猫、兔)可制备股骨中段 15 mm～17 mm 缺损，以确保骨缺损完全超出股骨自行愈合的限度。

6.1.1.4 大型动物(犬、猪、山羊)四肢长骨的自我修复能力有限，采用大于临界骨缺损值的缺损长度，以避免自行愈合而影响试验的科学性，股骨节段性骨缺损范围达 20 mm 即超出其临界性骨缺损值。

6.1.2 胫骨

6.1.2.1 在骨缺损的试验研究中，保证骨损伤局部的正常微环境是其骨修复成败的关键。

6.1.2.2 中型动物胫骨节段性骨缺损长度为 8 mm～12 mm。

6.1.2.3 大型动物单侧胫骨的截骨长度为胫骨长度的 20%，其截骨长度大约为 20 mm～30 mm。

6.1.3 桡骨

6.1.3.1 10 mm～16 mm 桡骨干缺损对确立中型动物的临界骨缺损值有重要参考意义。

6.1.3.2 大型动物桡骨干缺损范围不超过 20 mm。

6.1.4 腓骨

多用于中型动物(腓骨干 5 mm 横行缺损接近其临界骨缺损值)。

6.1.5 下颌骨

小型猪下颌骨 20 mm 的缺损已完全超出了其能自行愈合的最小限度。

6.1.6 跖骨

羊跖骨 6 mm 横行骨缺损即表现为骨不连。

6.1.7 椎骨

山羊和小型猪常作为椎骨缺损及修复的动物模型。

6.2 膜化骨

6.2.1 骨发生过程中，颅骨为典型的膜内成骨。颅顶的圆形骨缺损模型被广泛采用。

6.2.2 大鼠颅顶全层 5 mm～8 mm 直径圆形骨缺损超出其自行愈合范围。对于兔大于 8 mm 的全层颅骨缺损，已超出其可自行愈合范围，即超出临界骨缺损的范围，最终导致骨不愈合。对于犬而言，大于 20 mm 直径的颅骨全层缺损超出其自行愈合范围。羊的全层颅骨临界骨缺损为 35 mm～45 mm。（单位为毫米）

7 缺损类型

7.1 软骨化骨缺损

7.1.1 通过使用合适的器械，可以移除骨组织，而不过多损伤周围组织，形成骨（全层或部分厚度的）缺损。

7.1.2 对于骨缺损，可以使用骨科器械（截骨钻、刀、骨锯、骨刮勺等）进行截骨，但要小心避免移除或损伤骨膜及周围软组织。针对不同动物，应选择不同型号的截骨器械、截骨的力度和速度，避免产生过多热量引起周围组织的热坏死。

7.1.3 应注意不同动物、不同部位长骨的直径、皮质厚度均存在差异。试验者应考虑这些差异，以获得一致的骨缺损。

7.1.4 应形成垂直于关节表面的缺损。

7.1.5 在同一动物双侧长骨可形成相同的缺损以评价一个以上的植入物。应考虑多个缺损的大小和位置，以及对周围组织的影响。试验应包括阴性对照和其他对照。

7.1.6 防止过度的骨损伤，以免增加骨不连、假关节、骨质疏松的风险。

7.1.7 长骨过大或过多的缺损而致的力学载荷不稳定分布可能会损害周围骨、软骨组织、关节活动，从而影响植入物性能评价。

7.1.8 为确保长骨骨缺损模型的成功制备，可先行骨膜环形切除，再进行截骨。

7.2 膜化骨缺损

7.2.1 制备颅骨全层骨缺损时，应于硬脑膜外和颅骨外板之间放置隔离物，以避免对硬脑膜和外层骨膜的影响。

7.2.2 手术操作要轻柔，避免脑组织的损伤。

7.2.3 应使用合适的器械产生一致的骨穿透力，尽量减少对骨板下组织的过度损害。

8 试验程序

8.1 植入物制备

所有动物植入试验的材料应按 GB/T 16886.1 的要求进行生物相容性评价。植入物组分可以经灭菌处理或无菌制备，或应用已知适于植入物组分和功能的方法进行终末期灭菌处理。

8.2 缺损模型的制备

8.2.1 应检测骨、软骨、关节和滑膜液是否有不可接受的病理学改变。缺损的大小应一致。

8.2.2 应在截骨过程中和截骨后冲洗缺损，以降低热量，并在植入前除去存留的骨和软骨微粒。

8.2.3 为降低热坏死所致的组织损伤，应使用低速电动磨钻。

8.2.4 如截骨时用线锯，导引针穿出内侧骨壁少许可稳住线锯，然后自内而外贴导引针体锯截骨质，注意保护软组织。

8.2.5 移除截取的骨组织时应避免出血。

8.2.6 建议在植入物植入前，用止血海绵控制严重出血。出血的程度在动物种属和试验组间会有明显差异。

8.3 植入物植入

8.3.1 植入物应以标准的可重复操作的方式植入。
8.3.2 应尽量避免缺损周围骨、软骨、关节组织过度损伤。植入物应在周缘与缺损的垂直壁接触，在底部与骨的横断面接触(对于全厚缺损而言)。
8.3.3 如果使用组织瓣，应以对邻近和相对的骨损伤最小的方式固定在原有骨上。
8.3.4 植入物放置的深度应使其接触面和周围骨表面充分匹配(平齐)。
8.3.5 植入区的软组织张力大时，需减张或转瓣缝合。
8.3.6 植入物填充前骨缺损处应充分止血。
8.3.7 填充时应用细头吸引器械或干纱布不断吸干缺损处及周围组织的渗液，然后植入材料。
8.3.8 缺损较大，渗出液较多的病灶应进行引流。

8.4 植入物固定

8.4.1 要根据缺损大小、部位、动物种属等，选择合适的植入物固定方法来防止过度运动和/或移位。
8.4.2 固定方法应能反映在站立和运动中的受力状况。
8.4.3 应考虑固定对周围组织和植入物性能的短期和长期影响。

8.5 关节负载和制动

8.5.1 应考虑动物的关节解剖、关节大小、动物的步态等确定合适的制动方法。
8.5.2 可以在术后使用内固定(如桥式钢板、髓内针)、夹板、外固定器械和石膏等减少关节运动和载荷。
8.5.3 在确定制动期限时，应考虑废用性萎缩和可能的负面结果对骨、关节的影响。
8.5.4 人和动物骨损伤后，连续的主动活动对再生过程有一定益处，但在动物模型试验中相似的治疗方式可行性低，未被广泛接受。
8.5.5 应考虑内固定、石膏和夹板带来的相关术后护理问题。应每日检查动物，以便发现任何大体畸形和关节制动带来的动物过度不适征象。

8.6 康复和管理

8.6.1 设计的恢复条件应减少应力和过度运动的可能性。对于山羊、绵羊，推荐使用可减少过度范围活动的恢复性围栏 2 d～3 d。
8.6.2 应经常监测动物，并记录观察结果以确保健康的生理状态。
8.6.3 在将试验动物放归更大的种群时，应确保动物的健康状况良好。

8.7 生存期

8.7.1 与标准的敷料相比，夹板能减少关节运动和载荷，然而在选择治疗时间的长短时，应考虑废用性萎缩和其可能的不利结果对骨、软骨和关节的影响。
8.7.2 在研究中适于用影像学来评价植入物的放置位置。
8.7.3 在恢复后，大型动物应继续留在保护性畜栏至少 9 d，然后可放归畜栏或种群中放养。
8.7.4 兽医应常规检查动物，处理任何大体畸形和动物的不适表现。

8.8 动物尸检

8.8.1 动物应根据相应的管理办法和条例的可行规范以人道方式实施安乐死。

8.8.2 应进行动物尸检以确定长骨、关节是否有可能影响研究结果的任何大体畸形。

8.8.3 应沿着周围的软骨和骨组织取出植入物。

8.8.4 可收集与植入部位直接相邻的其他骨组织(数量标准化)。

8.8.5 应将取材组织放置在符合形态学(脱钙石蜡或不脱钙塑料包埋)、组织生物化学或生物力学测试等检测方法要求的溶液中。

9 结果和评价

9.1 大体评价

推荐按照 ISO 12891 的要求获取活检标本,大体评估应包括:

a) 缺损部位的外观描述;

b) 缺损周边骨的外观(是否存在骨痂形成);

c) 周围骨的外观(是否存在骨赘);

d) 修复部位组织颜色和数量的描述(包括表面外观和结构),植入物的整合程度。

9.2 形态学

采用组织学切片评价骨缺损处组织再生或修复的数量和性质。推荐采取连续切片。染色的方法可以评价组织性质、缺损修复区胶原的形成及含量、骨小梁与骨基质的形成、骨再生和再血管化进程、髓腔再通程度、成骨细胞的数量和形态等,推荐采用苏木素和伊红染色、Masson 三色染色,Safranini-o 染色,Weigert 染色,硫堇染色,甲苯胺蓝、苯胺蓝等染色法。

9.2.1 显微镜分析和评分

9.2.1.1 推荐使用标准的组织病理学指标来分析组织学切片的不良组织反应。

9.2.1.2 在评价植入物性能时,应考虑:

a) 缺损部位及其周围的组织性质;

b) 表面外观以及和周围骨组织的连续程度;

c) 与缺损区周围骨和软骨的整合程度;

d) 骨重建的性质;

e) 细胞形态;

f) 固定器械周围组织的性质。

9.2.1.3 推荐利用形态计量学来测量组织学指标,如厚度、整合情况、细胞数量和表面性质。

9.2.1.4 由于修复组织可能随时间发生生物化学成分和组成的变化,较短的修复时间可能不能反映长期结果。

9.2.1.5 短期的组织学评价可用于筛选和优化,而长期的结果评价应基于形态学、组织生物化学和生物力学检测。

9.3 组织生物化学

正常骨骼的骨组织主要由胶原、蛋白多糖、无机成分组成。比较修复组织与原有骨组织蛋白和蛋白多糖的生物化学定量可以为修复的程度和性质提供有用信息。

9.3.1 推荐使用已确立的方法来检测胶原类型和蛋白多糖含量。推荐使用不同的生物化学分析和形态学评价相结合来比较结果。可采用碱性磷酸酶染色、胶原免疫组化染色、骨钙素检测和 Von Kossa 钙染色、无机盐含量测定等手段进行定性和定量分析。

9.3.2 一般在缺乏良好的形态学结果时,生物化学组分的测定不能保证评价的正确性。

9.4 影像学分析

9.4.1 可采用常规的X线摄片观察，对骨缺损修复部位进行正、侧位摄X线片。对X线片的骨缺损情况进行量化评分。按照Lane-Sandhu X射线评分标准进行评价。评价内容包括骨形成、骨连接、骨塑形三个方面(见表2)。

表2 骨形成、骨连接和骨塑性的评分标准

分值	骨形成	骨连接	骨塑性
0	无骨形成	骨折线清楚	未见骨塑形
1	骨形成占缺损25%		
2	骨形成占缺损50%	骨折线部分存在	骨髓腔形成
3	骨形成占缺损75%		
4	骨形成充满缺损	骨折线消失	皮质骨塑形

9.4.2 其他影像学资料(如micro CT、MRI等)可作为参考依据。

9.5 生物力学测试

9.5.1 在体内，骨作为结构性材料，其功能高度依赖其生物力学性能。生物化学分析本身不足以确定骨的力学性能。

9.5.2 对于软骨化骨建议对经修复或再生形成的骨组织的生物力学性能进行评价，如：最大负荷，断裂载荷、最大变形等指标来表征。

9.5.3 可采用不同的力学测试系统进行加载和测试。

9.5.4 为评价膜化骨缺损植入物的结构和功能，可对颅骨缺损修复区进行测试，可采用相关的加载测试系统。

9.5.5 推荐将相关的测试数据与已发表的人体和动物不同部位的骨缺损植入修复后生物力学数值进行比较。

10 分析

需做统计分析，应对每一评分标本的每一分类和总分计算平均值和标准差。

参 考 文 献

[1] WK8032 Standard Guide for Pre-clinical in vivo Evaluation of Critical Size Segmental Bone Defects

[2] WK16591 Guide for the In Vivo Assessment of Bone Inductive Materials

[3] Stevens S S, Beaupre G S, Carter D R. Computer model of endochondral growth and ossification in long bones: biological and mechanobiological influences[J]. J Orthop Res. 1999, 17(5): 646-653

[4] Schmitz J P, Hollinger J O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions[J]. Clin Orthop Relat Res. 1986(205): 299-308

[5] Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P. An experimental model for non-union in rats[J]. Injury. 1995, 26(10): 681-686

[6] Probst A, Jansen H, Ladas A, Spiegel HU. Callus formation and fixation rigidity: a fracture model in rats[J]. J Orthop Res. 1999, 17(2): 256-260

[7] Kokubu T, Hak D J, Hazelwood S J, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur[J]. J Orthop Res. 2003, 21(3): 503-510

[8] Schmidhammer R, Zandieh S, Mittermayr R, Pelinka LE, Leixnering M, Hopf R, Kroepfl A, Redl H. Assessment of bone union/nonunion in an experimental model using microcomputed technology[J]. J Trauma. 2006, 61(1): 199-205

[9] Shiratori K, Matsuzaka K, Koike Y, Murakami S, Shimono M, Inoue T. Bone formation in beta-tricalcium phosphate-filled bone defects of the rat femur: morphometric analysis and expression of bone related protein mRNA[J]. Biomed Res. 2005, 26(2): 51-59

[10] Toombs J P, Wallace L J. Evaluation of autogeneic and allogeneic cortical chip grafting in a feline tibial nonunion model[J]. Am J Vet Res. 1985, 46(2): 519-528

[11] Toombs J P, Wallace L J, Bjorling D E, Rowland GN. Evaluation of Key's hypothesis in the feline tibia: an experimental model for augmented bone healing studies[J]. Am J Vet Res. 1985, 46(2): 513-518

[12] 林博文，徐忠世，肖德明，卢小虎，杨大志. 实验性骨不连模型的制作[J]. 中山医科大学学报. 2002, 23(5): 331-335

[13] Pekkarinen T, Jamsa T, Maatta M, Hietala O, Jalovaara P. Reindeer BMP extract in the healing of critical-size bone defects in the radius of the rabbit[J]. Acta Orthop. 2006, 77(6): 952-959

[14] Xie H, Yang F, Deng L, Luo J, Qin T, Li X, Zhou GQ, Yang Z. The performance of a bone-derived scaffold material in the repair of critical bone defects in a rhesus monkey model[J]. Biomaterials. 2007, 28(22): 3314-3324

[15] Dos S N F, Volpon J B. Experimental nonunion in dogs[J]. Clin Orthop Relat Res. 1984 (187): 260-271

[16] Bruder S P, Kraus K H, Goldberg V M, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects[J]. J Bone Joint Surg Am. 1998, 80(7): 985-996

[17] Schliephake H, Jamil M U, Knebel J W. Experimental reconstruction of the mandible using polylactic acid tubes and basic fibroblast growth factor in alloplastic scaffolds[J]. J Oral Maxillofac Surg. 1998, 56(5): 616-626, 626-627

[18] Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel

L, Guillemin G. Tissue-engineered bone regeneration[J]. Nat Biotechnol. 2000, 18(9): 959-963

[19] Sakata Y, Ueno T, Kagawa T, Fujii T, Yamachika E, Sugahara T. Osteogenic potential of cultured human periosteum-derived cells-a pilot study of human cell transplantation into a rat calvarial defect model[J]. J Craniomaxillofac Surg. 2006, 34(8): 461-465

[20] Marzouk K M, Gamal A Y, Al-Awady A A, Sharawy M M. Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects[J]. J Oral Maxillofac Surg. 2007, 65(8): 1508-1516

[21] Yoon E, Dhar S, Chun D E, Gharbjanian N A, Evans G R. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model[J]. Tissue Eng. 2007, 13(3): 619-627

[22] Gordjestani M, Dermaut L, De Ridder L, De Waele P, De Leersnijder W, Bosman F. Osteopontin and bone metabolism in healing cranial defects in rabbits[J]. Int J Oral Maxillofac Surg. 2006, 35(12): 1127-1132

[23] Lee J Y, Choo J E, Choi Y S, Park J B, Min D S, Lee S J, Rhyu H K, Jo I H, Chung C P, Park Y J. Assembly of collagen-binding peptide with collagen as a bioactive scaffold for osteogenesis in vitro and in vivo[J]. Biomaterials. 2007, 28(29): 4257-4267

[24] Umeda H, Kanemaru S, Yamashita M, Kishimoto M, Tamura Y, Nakamura T, Omori K, Hirano S, Ito J. Bone regeneration of canine skull using bone marrow-derived stromal cells and beta-tricalcium phosphate[J]. Laryngoscope. 2007, 117(6): 997-1003

[25] Oest M E, Dupont K M, Kong H J, Mooney D J, Guldberg R E. Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects[J]. J Orthop Res. 2007, 25(7): 941-950

[26] Schantz J T, Hutmacher D W, Lam C X, Brinkmann M, Wong K M, Lim T C, Chou N, Guldberg R E, Teoh S H. Repair of calvarial defects with customised tissue-engineered bone grafts II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy in vivo[J]. Tissue Eng. 2003, 9 Suppl 1: S127-S139

[27] Cowin S C. Bone mechanics handbook[M]. Second Edition ed. 2001

[28] 史志东，刘明旺，秦忠宗，王琴梅，郭英，叶卓鹏，俞中和. 体外制成复合软质再生颅骨修复材料填充犬颅骨缺损[J]. 中国组织工程研究与临床康复. 2007, 11(44): 8844-8847

[29] Haberstroh K, Ritter K, Kuschnierz J, Bormann K H, Kaps C, Carvalho C, Mulhaupt R, Sittinger M, Gellrich N C. Bone repair by cell-seeded 3D-bioplotted composite scaffolds made of collagen treated tricalciumphosphate or tricalciumphosphate-chitosan-collagen hydrogel or PLGA in ovine critical-sized calvarial defects[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010, 93(2): 520-530

[30] Zins J E, Moreira-Gonzalez A, Parikh A, Arslan E, Bauer T, Siemionow M Biomechanical and histologic evaluation of the Norian craniofacial repair system and Norian Craniofacial Repair System Fast Set Putty in the long-term reconstruction of full-thickness skull defects in a sheep model[J]. Plast Reconstr Surg. 2008, 121(5): 271e-282e

[31] ASTM F 1983 植入可/再吸收生物材料的生物相容性评价指南(Standard practice for assessment of compatibility of absorbable/resorbable biomaterials for implant applications)

中华人民共和国医药
行业标准
组织工程医疗器械产品 修复和替代骨组织植入物骨形成活性的体内评价指南
YY/T 1575—2017
*
中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销
*
开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 26 千字
2017年11月第一版 2017年11月第一次印刷
*
书号:155066·2-32566 定价 26.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

YY/T 1575-2017