



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0511—2009

多孔生物陶瓷体内降解和 成骨性能评价试验方法

Test method for evaluation of the biodegradation and
osteogenesis of porous bioceramic *in vivo*

2009-12-30 发布

2011-06-01 实施



国家食品药品监督管理局 发布

前 言

本标准参照 ISO 10993-6:2007《医疗器械生物学评价 第 6 部分:植入后局部反应试验》中有关植入方法,并在对国内外相关文献分析验证的基础上,结合多孔生物陶瓷体内降解性能和成骨性能的特点制定而成。

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准由国家食品药品监督管理局提出。

本标准由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:上海生物材料研究测试中心。

本标准主要起草人:孙皎、沈晴昶、黄哲玮、卢建熙、薛旸、陆华、丁婷婷。

多孔生物陶瓷体内降解和成骨性能评价试验方法

1 范围

本标准评价多孔生物陶瓷体内降解和成骨性能提供指南。本标准规定了材料植入骨组织后,对材料的降解和成骨性能进行定性及定量评估的试验方法。

本标准适用于植入到活体骨组织内多孔生物陶瓷的降解和成骨性能的评价,不考虑机械或功能负荷对其的影响。降解程度的评价系根据材料在骨组织内产生的降解反应,成骨能力的评价系根据骨组织内新骨生成的程度。

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:评价与试验(GB/T 16886.1—2001, idt ISO 10993-1:1997)

GB/T 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分:动物保护要求(GB/T 16886.2—2000, idt ISO 10993-2:1992)

GB/T 16886.6 医疗器械生物学评价 第6部分:植入后局部反应试验(GB/T 16886.6—1997, idt ISO 10993-6:1994)

GB/T 16886.9 医疗器械生物学评价 第9部分:潜在降解产物的定性和定量框架(GB/T 16886.9—2001, idt ISO 10993-9:1999)

3 术语和定义

GB/T 16886.1 和 GB/T 16886.9 中的定义和下列定义适用于本标准。

3.1

多孔生物陶瓷 porous bioceramic

含有较多孔洞,其孔洞结构具有一定生物功能(如有利于细胞/组织的长入和代谢)的一类无机非金属材料。

注:多孔生物陶瓷举例: β -磷酸三钙多孔生物陶瓷(β -TCP)、羟基磷灰石多孔生物陶瓷(HAP)等。

3.2

成骨 osteogenesis

骨的形成过程。

3.3

植入物初始量 initial material volume (IMV)

植入物植入前不包括孔内面积的横截面总面积。

3.4

植入物剩余量 residual material volume (RMV)

植入物在组织内残留的不包括孔内面积的横截面总面积。

3.5

植入物横截面积 material cross section (MCS)

植入物植入前包括孔内面积的横截面总面积。

3.6

新骨生成量 new bone formation volume (NBFV)

植入物横截面内所形成的新骨总面积。

注:新骨指新生的骨组织。

4 试验方法

4.1 原理

本方法系将多孔生物陶瓷材料植入到实验动物骨组织内一定时间后,通过组织学检查的方法,结合图像分析系统的分析,对试验材料植入物与已经被临床所接受的同类材料植入物的降解性能和新骨形成能力进行比较和评价。

注:在进行体内降解试验前宜先按照 GB/T 16886.14 的要求对植入物进行定性与定量分析。

4.2 植入样品的制备

4.2.1 试验材料

试验样品的物理特性(如形状、孔隙率、孔径等)可影响试验材料的降解性能。

每一个试验样品都应经过与最终产品相同的制造、处理、污物清除及灭菌过程,样品制备和灭菌后,应特别注意在植入前或植入过程中不使其受到擦伤、损坏或任何污染。

对于组织工程支架材料,应考虑采用不含细胞的供试品做试验,因为动物对细胞成分的免疫反应和细胞对动物的反应可能会干扰局部组织反应的结果。

4.2.2 对照材料

对照样品的尺寸、形状应与试验样品一致。对照样品所采用的处理、清洗及灭菌方法应能使其保持可接受性和良好的对照性。

对照材料应选择与待选试验材料预期用途一致的、已经被临床所接受的同类材料。

4.2.3 植入样品尺寸

植入样品的尺寸应根据所选用动物、材料的孔隙率大小及其骨组织的大小来决定,原则上应参见 GB/T 16886.6 的规定,推荐选用圆柱状植入样品,以避免机械因素造成的组织反应。

对具有一定孔隙率的植入样品,在选择兔或狗作为实验动物时,植入体可加工成直径 4mm~6mm、长 8mm~10mm 的圆柱体。

注:其他相关信息见 GB/T 16886.6。

4.3 实验动物和植入部位

4.3.1 实验动物

应按照 GB/T 16886.2 规定的实验动物要求选择动物和设计;动物饲养与管理应符合国家有关动物饲养的规定进行。

骨内植入试验所需时间较长,一般首选新西兰兔,体重不小于 2.5kg。

注:其他相关信息见 GB/T 16886.6。

应足以保证每一植入期至少能获得 10 个试验样品和 10 个对照样品的数量。

4.3.2 植入部位

应参照 GB/T 16886.6 规定选择适宜的植入部位,试验样品与对照样品应以相同条件植入到同一年龄、性别,同一品系同种动物的相同解剖部位,建议在一只动物的左右两侧分别植入试验样品和对照样品。

选择植入部位时,应确保植入手术不会造成试验部位病理性骨折,对年幼动物应避免将植入物植入到骺区或其他未发育成熟的骨内。一般推荐选择股骨远端髁部骨作为植入部位,与冠状面平行植入,植入时应避免材料进入骨髓腔和关节腔。

4.4 骨植入手术

在麻醉和无菌条件下,于双侧膝外侧作纵切口,用止血钳分离组织暴露出股骨外侧髁。采用比植入物直径略小的钻头,在质量浓度为 9g/L 的无菌氯化钠注射液冲洗下,低速间歇地在双侧股骨外侧髁各钻一个腔洞,深度与植入物的长度接近,清除骨屑,将样品轻轻按压植入,使样品表面平于或略低于骨皮质表面,左右各植入一枚,一侧为试验材料,另一侧为对照材料,随后分别缝合肌筋膜和皮肤切口。

注:植入物直径与骨植入床匹配良好对于避免纤维组织向骨内生长至关重要。

4.5 试验周期

试验周期的确定应根据试验样品的预期用途和降解性能而定,体内动物实验前应事先评估试验样品的降解时间,降解时间可以通过体外实时、加速降解试验或特定环境下的数学模型来推算。原则上观察期至少设置三个时期,试验周期一般应长于试验样品降解和被吸收的时间,或应能使相应的组织反应达到一稳定状态。通常可设置以下三个时间点:

- 没有或仅有少量降解;
- 降解发生的过程中;
- 组织修复处于稳定状态或植入物几乎完全降解。

术后植入物的降解率及周围组织结构的改变随时间而变化。对于预期在 12 周内可以完全降解的多孔生物陶瓷,推荐选择 2 周、4 周、12 周三个观察期;对于预期超过 12 周完全降解的多孔生物陶瓷,可酌情选择 4 周、12 周、26 周、52 周或更长时间为观察期。

5 结果观察与评价

5.1 临床观察

植入后 1 天、3 天和 5 天观察植入点皮肤反应,有无出血、红肿和植入物排出等异常现象。在植入周期内每天观察动物的一般状态,并记录任何异常现象,包括局部、全身和行为异常。记录死亡的动物数并及时进行尸检,垂死动物及时隔离并处死。

5.2 解剖观察

按照 GB/T 16886.2 的要求处死动物,肉眼观察植入部位组织有无异常病变。

5.3 植入物切取和标本制备

切取包裹植入物及其周围约 1.0cm~2.0cm 的组织,将其置于 4% 的中性缓冲甲醛溶液中固定,制备不脱钙硬组织显微学检查的标本。不脱钙硬组织显微学检查的标本制备详见附录 A。

在制作组织切片时,每一植入点分别需要切取松质骨内外、中、内三个部位的组织。

5.4 不脱钙硬组织显微学检查

采用不脱钙的硬组织显微学检查方法,定性和定量分析多孔生物陶瓷的降解和成骨性能。

5.4.1 降解和成骨性能的定性分析

光学显微镜下观察植入部位植入物是否发生降解和新骨生成,并观察、描述新骨的成熟度(包括编织骨、板层骨、骨髓等)。

5.4.2 降解和成骨性能的定量分析

5.4.2.1 采用图像分析系统[Bioquant 专用计算机、Image Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics) 图像分析软件、Leica DM4000B 显微镜],分别定量分析植入物初始量、植入物剩余量、植入物横截面积以及新骨生成量,计算植入物降解率及新骨生成率。

5.4.2.2 按式(1)计算植入物降解率(MDR):

$$\text{MDR}(\%) = (1 - \text{RMV}/\text{IMV}) \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

MDR —— 植入物降解率;

RMV —— 植入物剩余量;

IMV —— 植入物初始量。

5.4.2.3 按式(2)计算新骨生成率(RNBF):

$$\text{RNBF}(\%) = \text{NBFV}/\text{MCS} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

RNBF —— 新骨生成率;

NBFV —— 新骨生成量;

MCS —— 植入物横截面积。

5.4.2.4 分别计算下列各项数据:

- a) 植入物降解率平均值;
——每植入点松质骨内植入物外部、中部、内部的降解率的总和除以 3。
- b) 植入物降解率总平均值与标准差;
——各植入点植入物降解率平均值的总和除以 10。
- c) 新骨生成率平均值;
——每植入点松质骨内植入物外部、中部、内部的新骨生成率的总和除以 3。
- d) 新骨生成率总平均值与标准差。
——各植入点新骨生成率平均值的总和除以 10。

5.4.3 结果评价

根据试验样品和对照样品的降解率和新骨生成率数据,结合临床预期用途作出总体评价。

6 实验报告

实验报告应包括详细的数据资料,以能够对结果作出独立的评价。实验报告应注明检测机构和检测日期,应报告下列项目:

- a) 植入样品;
——分别描述试验样品和对照样品的孔隙率、孔径大小、外形、尺寸和数量。
——选择对照材料的理由。
——样品的处理过程:包括所采用的清洗、处理和灭菌技术。如果样品不是在本实验室制备,在检

测开始之前,生产厂家应提供这些资料。

b) 动物与植入;

——动物的种属、品系、来源、年龄、性别和体重,检测期间的环境条件,动物饮食及动物状况,以及检测期间包括意外死亡在内的所有观察发现。

——植入方法以及每个动物和每一部位植入物的数量。

c) 取样与组织学制备;

——所采用的取样方法,记录每只动物、每一观察期植入物取到的数量,所有样品都应作为试验的一部分。

——植入部位的大体观察,所采用的组织学切片制备技术。

——图像分析软件的名称和版本号。

d) 肉眼和显微镜观察;

——每一植入物的观察情况以及植入物周围组织的大体外观。必要时,应包括引流淋巴结的观察。

——分别报告试验样品和对照样品的植入物降解率总平均值与标准差、新骨生成率总平均值与标准差及新骨成熟度。

e) 结果评价。

——报告应包括对植入后试验和对照材料局部生物学反应的综合及比较评价。

附录 A

(资料性附录)

不脱钙硬组织切片的样本制备

A.1 试样固定

A.1.1 固定液配置

配置 4% 的中性甲醛溶液作为样本的固定液。

A.1.2 固定时间

通常固定 3 天~4 天,然后用流水冲洗固定液。

A.2 样本脱水与透明

按表 A.1 要求,将样品依次置于不同体积浓度的乙醇溶液中去掉样品中的水分,接着用二甲苯透明样本。

表 A.1 样本脱水与透明方法

次数	试剂浓度	时间(h)
1	70%乙醇	24
1	80%乙醇	24
1	90%乙醇	24
1	95%乙醇	24
3	无水乙醇	24
1	二甲苯	4

A.3 包埋液制备

A.3.1 甲基丙烯酸甲酯(MMA)包埋液

按下列步骤进行:

- 1) 将 60g 氢氧化钾溶解于 1200ml 蒸馏水中;
- 2) 取 400ml MMA 液与上述氢氧化钾液混合 3min,静置 10min;
- 3) 同法重复 2 次;
- 4) 加入 400ml 蒸馏水洗涤 2 次;
- 5) 回收 MMA 液,加入 50g 无水硫酸铜;
- 6) 24h 后过滤。

A.3.2 MMA 预聚液

按下列步骤进行:

- 1) 取 103ml 纯 MMA 液加入 2g 过氧化苯甲酰;
- 2) 置于 56℃ 水浴 20min,再置于冰水浴 15min;
- 3) 可重复多次使 MMA 液略显黏稠;
- 4) -10℃ 保存。

注:预聚能缩短包埋时间,因此可根据需要采用预聚液或非预聚液。

A.4 样本包埋

采用 MMA 进行标本包埋并按下列步骤进行：

- 1) 用硅油处理包埋容器的内壁；
- 2) 在包埋容器内放置少量 PMMA 块，然后放入标本后，加入预聚或未预聚的 MMA 单体；
- 3) 抽真空 4h~6h；
- 4) 4℃冰箱内静置 1 周~2 周；
- 5) 常温下继续聚合直至硬化。

A.5 切片

选定松质骨部位的组织，分别取外、中、内三个部位的组织切片。切片方向与植入物长轴垂直，采用锯式或其他类型切片机制片，所获得的切片包含植入物及周围组织。

A.6 贴片

按下列步骤进行：

- 1) 切片磨平至光滑；
- 2) 超声洗涤 2min；
- 3) 40℃烘箱烘干；
- 4) 取有机载玻片一块，测量其厚度(A)；另取切片测量其厚度(B)；
- 5) 于载玻片中心滴注一滴快干胶水(氰基丙烯酸酯)，放上切片；
- 6) 待干燥。

A.7 磨片

按下列步骤进行：

- 1) 测量粘贴切片后的载玻片厚度(C)，计算胶水厚度(E)： $E=C-(A+B)$ ；
- 2) 假设最终切片厚度为 X，则应磨去的厚度(F)为： $F=B+E+X$ ；
- 3) 可先后用 P320 和 P1200 砂纸磨去 $F\mu\text{m}$ 。

A.8 抛光

要求达到显微镜下观察切片表面无划痕即可。

A.9 染色

表 A.2 所列 VAN GIESON 苦味酸品红染色方法适用于厚度 $50\mu\text{m}\pm 5\mu\text{m}$ 的切片。

表 A.2 VAN GIESON 苦味酸品红染色方法

步骤	试剂	时间(min)
1	0.1%甲酸	3
2	漂洗	2
3	20%甲醇	2
4	漂洗	2
5	Stevenol 蓝染液	5
6	漂洗	2
7	Van Gieson 苦味酸品红液	8
8	无水乙醇洗涤	1

参 考 文 献

- [1] GB/T 16886.12—2005 医疗器械生物学评价 第12部分:样品制备与参照样品
 - [2] GB/T 16886.14—2003 医疗器械生物学评价 第14部分:陶瓷降解产物的定性与定量
 - [3] LU J. X, GALLUR A, FLAUTRE B, et al. Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *J Biomed Mater Res*, 1998,42:357—367
 - [4] FLAUTRE B, ANSELME K, DELECOURT C, et al. Histological aspects in bone regeneration of an association with porous hydroxyapatite and bone marrow cells. *J Mater Sci; Mater Med*, 1999,10:811—814
 - [5] KOERTEN HK, VAN DER MEULEN J. Degradation of calcium phosphater ceramics. *J Biomed Mater Res*, 1999,44:78—86
 - [6] ISO 10993.6-2007 Bioplogical evaluation of medical devices — part 6: Tests for local effects after implantation
 - [7] ISO 10993-1:2003 Biological evaluation of medical devices part 1: Evaluation and testing
 - [8] ISO 10993-2:2006 Biological evaluation of medical devices part 2:Animal welfare requirement
 - [9] Qingyi Shen, Jiao Sun, Chemical dissolution and bone formation in identical porous β -TCP and HA, *Key Eng. Materials*, 330—332(2007)35—38
-

中华人民共和国医药
行业标准
多孔生物陶瓷体内降解和
成骨性能评价试验方法

YY/T 0511—2009

*

中国医药科技出版社出版发行
北京市海淀区文慧园北路甲 22 号
邮政编码:100082

网址 www.cmstp.com

电话:发行:010-62227427 邮购:010-62236938

三河市腾飞印务有限公司印刷

各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 20 千字

2011 年 5 月第一版 2011 年 5 月第一次印刷

*

书号:145067·84 定价 15.00 元

如有印装差错 由本社发行部调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)62214756