

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1680—2020

同种异体修复材料 脱矿骨材料的 体内成骨诱导性能评价

Allogeneic grafts—In vivo evaluation of osteoinductive potential for materials
containing demineralized bone

2020-02-21 发布

2021-01-01 实施

国家药品监督管理局 发布



目 次

前言	I
引言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 动物模型	2
5 实验步骤	3
6 结果判定	4
7 报告内容	5
参考文献	6

前 言

本标准按 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。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准由中国食品药品检定研究院归口。

本标准起草单位：浙江大学、中国食品药品检定研究院、浙江星月生物科技股份有限公司、广州医科大学附属第三医院。

本标准主要起草人：欧阳宏伟、汪燕艳、赵洪石、徐丽明、张智勇、邵安良。

引 言

含脱矿骨材料在体内主要用于骨缺损填充与修补。为了验证该材料的有效性,应进行动物试验评价其成骨诱导能力。目前,研究材料成骨诱导能力的方法主要包括体外实验、体内原位植入试验和体内异位植入试验。体外实验一般是通过在材料上培养细胞,检测细胞中部分成骨标志物的变化来研究材料的成骨诱导能力。虽有研究证明体外结果与体内实验结果相关,但体外实验并不能全面、直接地反映材料的成骨诱导能力,只能作为间接实验证据。体内原位植入实验则可能会因为植入部位自身具有的骨形成能力而产生假阳性结果。体内异位植入实验选择无骨形成能力的组织如骨骼肌作为植入部位,可有效降低出现假阳性结果的几率,因此该方法是目前评估材料成骨诱导能力的有效方法之一。

同种异体修复材料 脱矿骨材料的 体内成骨诱导性能评价

1 范围

本标准给出了同种异体的脱矿骨类产品在植入(或注射)人体内时引起或促进骨形成有效性的评估方法及其指南。

本标准适用于脱矿骨及含脱矿骨医疗器械产品的成骨诱导性能评价。

注：含人类基因重组 BMP 蛋白的骨植入物也可参考本标准进行体内成骨诱导性能评价。

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：动物福利要求

YY/T 0513.3 同种异体修复材料 脱矿骨

3 术语和定义

YY/T 0513.3 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

脱矿骨材料 **Materials containing demineralized bone**

包括但不限于脱矿骨基质、生长因子、分化因子、生物活性载体和/或非生物活性载体。

3.2

异位 **heterotopic**

植入/移植位点不直接与骨接触，如骨骼肌。

注：原位为在骨组织中或与骨组织直接接触的植入/移植的部位。

3.3

肌间隙 **intermuscular**

在解剖学上可识别的肌肉之间的部位。

注：肌间隙在手术剥离时通常不发生或很少发生出血。

3.4

成骨 **osteogenic**

成骨细胞移行至将要合成骨组织的部位，分泌、合成骨胶原及骨蛋白纤维，将钙、磷吸收到纤维的孔隙中进行沉淀结晶，形成骨组织的过程。

3.5

骨传导 **osteoconduction**

骨组织从植入体-骨节界面沿植入体表面或其内部孔隙、通道或管道攀附延伸的现象。

3.6

骨诱导 osteoinduction

间充质干细胞被诱导分化为成骨细胞或成软骨细胞,最后形成骨组织的现象。

4 动物模型

4.1 通则

在产品的有效性研究中应设立恰当的阳性和阴性对照,而在已验证的常规批次检测中可不设对照。其中,阴性对照可用经 4 mol/L 盐酸胍灭活的脱矿骨材料、矿化的松质骨及热灭活的脱矿骨材料;阳性对照可用已通过体内验证的脱矿骨材料。

4.2 动物选择

4.2.1 有免疫系统遗传缺陷的动物(无胸腺裸小鼠或裸大鼠)是首选用于评估人脱矿骨产品异位骨形成能力的动物模型。裸小鼠(裸)动物的胸腺基本功能失调,缺少 T 细胞而不能产生细胞毒性效应细胞和移植物抗宿主反应。因此,不存在 T 细胞对外源性材料的应答。

注 1: 无胸腺动物仍能够产生天生的免疫反应(巨噬细胞、巨细胞和颗粒性红细胞),因此,具有对非生物相容性或微生物(培养物)阳性产品产生免疫反应能力。

注 2: 选择裸大鼠还是裸小鼠作为试验动物模型取决于预期评价的植入物的大小(体积)。

4.2.2 植入实验中宜使用雄性无胸腺动物,若使用雌性动物需证明其发情周期不会对实验造成负面影响。

4.2.3 植入实验中宜使用青春期的无胸腺动物(植入时年龄为 6 周~9 周),老年动物可能不会对骨诱导材料做出有效的应答。

4.3 异位植入位点

无胸腺小鼠/大鼠模型中,臀肌或股二头肌的肌间袋状空隙均为合适的植入位点。在临床应用中,骨组织植入位点存在血液与骨组织以及成骨成分,而血液与骨组织、成骨成分会造成异位植入时出现假阳性结果。

4.4 植入数量与样品体积/质量

4.4.1 植入数量:在产品有效性检验中,宜使用 3 个独立批次的产品进行试验。每个批次的产品建议使用 3 只动物,每只动物 2 个植入位点;阳性对照与阴性对照各植入 3 只动物体内,每只动物 2 个植入位点,保证最终每组不少于 4 个样本进行评价。

注:这样的设计可在 95% 包含区间内获得 83% 的包含概率。这允许新骨形成检测中存在 12% 的差异。假设如下:形成的新骨占 40%;标准偏差是 5%;统计显著性水平为 0.05。

4.4.2 样品体积/质量:一般情况下,植入的样品含脱矿骨材料质量为 (15 ± 5) mg,植入的样品尺寸宜长 3 mm~5 mm,宽 3 mm~5 mm,厚 1 mm~3 mm(粉剂或颗粒性材料可以加赋形剂,使用的赋形剂应不含矿物质和成骨活性物质,不影响原材料的成骨诱导能力)。

4.4.3 试验组应与阴性对照组、阳性对照组具有相同的脱矿骨材料植入剂量和形状,使结果具有可比性。如使用赋形剂应设立相应的对照组,排除赋形剂对成骨诱导能力的潜在影响。

4.5 取材时间

裸小鼠建议在植入 4 周时进行取材,或根据产品特点在植入 4 周~8 周时选择合适时间点取材,观察样本中的成骨情况。

5 实验步骤

5.1 实验动物管理

按照 GB/T 16886.2 的要求进行。

5.2 样品准备

5.2.1 所有植入物的质量或体积需统一,以保证植入的脱矿骨材料的质量或体积相等,其中脱矿骨材料的质量可通过冻干称重测量,体积可通过测量长度、宽度与厚度后计算得出。阳性对照和阴性对照需使用相等的量,为了保证实验室间结果的可比性,试验报告中需明确说明测试用植入物/对照品的质量或体积。

5.2.2 对于脱矿骨材料粉末、膏状物或泥状产品,建议样品在植入前放入 0.5 mL 或 1 mL 注射器管中,便于植入。

注:(汞)合金载体和/或事先灭菌的明胶胶囊可有助于植入。

5.3 肌间隙植入

5.3.1 动物应在无菌的微隔离笼中饲养,并喂食无菌的啮齿类动物饲料和水。在植入实验前,实验动物需事先隔离 7 d。

5.3.2 植入过程中应无菌操作。

5.3.3 每只动物通过在耳缘打孔做标记区分,并称重。记录每只动物的识别码和体重。

5.3.4 可以通过捏动物后肢脚趾(趾间)来判断麻醉状态。如果动物有反射性反应,则麻醉不足以进行后续植入操作。技术人员应在术中监测动物的呼吸情况。

5.3.5 将麻醉的动物以俯卧位置于操作室或手术室中洁净试验操作台上并固定。用碘液擦拭动物背部、腰部区域,从手术中心位置开始至手术边缘部位,最后用清洁无菌纱布垫擦去碘液。

5.3.6 臀中肌与臀大肌肌间隙植入的详细步骤为:小心地提起位于背部腰处脊柱上方的皮肤,切开一 0.5 cm~1 cm 长的单向切口。将皮肤切口翻开,同时使用钝性剥离方法,在臀中肌与臀大肌组织中沿着肌肉纤维方向平行制造一个小袋状空隙,注意避开血管。若有少量出血需及时止血,并尽量将血液除去。在臀中肌与臀大肌肌间隙中植入样品。植入后用缝线缝合肌肉层。使用相同的方法在另一侧臀中肌与臀大肌肌间隙中植入其他试验品或对照品。最后用缝线将皮肤层缝合。

注:在样本植入时注意防止样本接触血液,如:手术时尽量避免出血,若不小心出血应尽量先进行压迫止血并清理伤口血液残留后再植入样品;术后缝合时,缝合线穿插的位置尽量远离样本。

5.4 动物术后处理

5.4.1 将动物放回饲养笼,单独饲养。

5.4.2 术后每天观察一次动物的健康状况并记录。可通过直接接触动物或笼外观察的方式判定动物健康状况。如果观察到有异常的临床症状或炎症及感染症状,应尽快进行相应处理。

5.4.3 若实验动物在试验过程中发生死亡,需对动物进行尸检。若动物在术后 14 d 后(包括 14 d)发生死亡,将植入部位及周围组织取出并固定,直至确定它在组织学研究中的潜在用途。若动物在术后 14 d 之内发生死亡现象,则进行尸检处理。应每次都记录动物的最终体重。

5.5 取材方法

5.5.1 在设计的时间点进行取材,取材前记录每只实验动物的最终体重、健康状况,以及是否存在异常状况。

5.5.2 触摸植入区域,确定大致的植入位置。用解剖刀在臀中肌上做一纵向切口。观察手术处是否有血液流出,若有血液流出,先进行止血处理。

5.5.3 除去筋膜,锐性分离肌肉周围组织并整体取出肌肉。若植入的材料迁移离开肌肉组织,则详细记录观察到的情况,以便后续分析样品迁移对骨诱导过程的影响。如当植入物迁移到实验动物的骨组织附近会导致产生假阳性结果。

5.5.4 去除植入物周边的无关组织。

5.5.5 记录肌肉及植入物的任何颜色、形状异常,和/或植入物与相连的肌肉组织的状况。避免组织脱水,将样本放置于8倍~10倍体积中性缓冲福尔马林的组织盒或标本瓶中,固定至少72 h。或者将样本放入组织盒,快速冷冻固定标本。

5.6 样本的组织学评价

5.6.1 将样本通过快速冷冻进行冰冻切片,或通过常规组织学染色程序固定。固定后,进行脱钙(若有必要)、脱水、石蜡或其他介质包埋并修整。包埋前,将样本沿长轴对半切开,并将剖面朝下进行组织块包埋。切片厚度一般为 $4\text{ }\mu\text{m}\sim 7\text{ }\mu\text{m}$,在载玻片上展开制成切片,每片至少包含3个不同的截面,然后选择最佳的新骨形成物观察法对切片进行染色。染色方法有:苏木素-伊红染色(HE),甲苯胺蓝染色、阿辛蓝染色、masson三色染色、Goldner三色染色和Von Kossa染色。若使用Von Kossa染色,要特别注意区分污点和新生骨的钙化。

5.6.2 每个样本至少制备3张切片,将褶皱最少、染色最均匀、植入材料量最多的切片用于成骨诱导能力评价。

5.6.3 在显微镜的目镜中插入一 $5\times 5(24\text{ mm}^2)$ 网格。无胸腺小鼠植入物样本切片观察使用10倍物镜,总放大倍数为100倍,无胸腺大鼠样本切片使用4倍物镜,总放大倍数为40倍。在载物台上放置标本时,调整样本切片位置,使得物镜处于样本切片四个角中的一个角的上方。查看每个视野,直至观察到整个样品切片。一个视野即在100/40倍放大倍数下,在 5×5 网格范围内,能观察到的区域。若在一特定划分区域内不能确定是否存在骨形成物,则换用高放大倍数的物镜观察,在确定后,换至10/4倍物镜观察其他划分区域。

5.6.4 对观察结果进行评分。具体方法为:统计一个切片所有视野中网格内包含 $\geq 50\%$ 植入骨和/或骨形成物的小方格总数(A),其中,若小方格中存在 $>50\%$ 的空白区域、纤维结缔组织、骨骼肌、赋形剂、添加剂或填充剂等,无论其中是否存在新骨,均不计数。若小方格满足以上条件,且其含有至少1种新骨形成元素,则记为阳性格。统计一个切片所有视野中的阳性格数(B)。按照式(1)计算新骨形成元素含量。

$$\text{新骨形成元素含量} = \frac{B}{A} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

注:新骨形成元素包括:成软骨/软骨细胞、成骨/骨细胞、软骨、骨质、新骨、网织状骨和骨髓。

5.6.5 感染或异物反应会影响材料的成骨诱导能力判断。若观察到感染或异物反应中任一现象,则有必要重复植入实验。

6 结果判定

6.1 使用评分系统(见表1)将不同实验室间的结果统一化、规范化,降低不同实验室间评估结果的差异。

表 1 产品新骨形成能力评分系统

评分	新骨形成元素含量/%	检测结果
0	样本中未观察到植入物	不合格
1	<10	不合格
2	10~20	合格
3	21~30	合格
4	>30	合格

6.2 当一批次中 75% 的受检样品的平均新骨率 $\geq 10\%$ 时,可认为该批次具有骨诱导潜力。在批次检验和货架寿命检测中,若骨含量在大多数视野中的检测结果可重复,则可认为该产品具有良好的骨诱导潜力。

6.3 所有的阴性对照结果需 $< 10\%$ 的新骨形成物。

6.4 报告数据应由至少 2 个研究人员的独立盲评和统计得出。

7 报告内容

7.1 测试样品的基本信息:样品名称、规格、性状、批号、组织来源/部位、有效期。

7.2 动物实验的质量管理信息:检测体系的描述(动物种类、性别、年龄、来源、体重范围、方案中涉及的动物数量、动物标识),动物饲养(动物接收、环境适应、动物房环境、饮食、饮水以及遵循 GB/T 16886.2 的声明)。

7.3 研究设计、试验过程、检验方法、评价标准和评价结果。

7.4 记录应包括所有方法的偏差。

7.5 执行和委托验证的责任方的签名和日期。

参 考 文 献

- [1] 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
 - [2] 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
 - [3] GB/T 25440.1 外科植入物的取出与分析 第1部分:取出与处理
 - [4] 药物非临床研究质量管理规范 原国家食品药品监督管理局令第34号
 - [5] 中华人民共和国实验动物管理条例 原国家科学技术委员会令第2号,2011年第一次修订,2013年第二次修订,2017年第三次修订
 - [6] ASTM: F2529-13, Standard Guide for in vivo Evaluation of Osteoinductive Potential for Materials Containing Demineralized Bone (DBM)(含脱矿骨材料的成骨诱导性能体内评价指南)
 - [7] Jean T. Edwards, Michele H. Diegmann, Nelson L. Scarborough. Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in a rat model, Clinical Orthopaedics and Related Research, 1998, 357: 219-228
 - [8] Reddi, A. H. and Huggins, C., Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats, Proc Nat Acad Sci, 1972, 69: 1601-1605
 - [9] Davi E, Aslan M, Simsek G, Yilmaz AB. The effects of bone chips dehydrated with solvent on healing bone defects. J Int Medical Res. 2002;30:168-173
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
同种异体修复材料 脱矿骨材料的
体内成骨诱导性能评价
YY/T 1680—2020

*

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

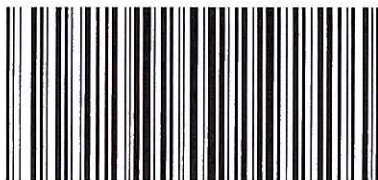
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2020年3月第一版 2020年3月第一次印刷

*

书号: 155066·2-34239 定价 18.00 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 1680-2020