

ICS 11.040.40

C 35

团 体 标 准

T/CSBM XXXX-XXXX

可降解镁金属骨科植入物植入后局部降解、 成骨与组织反应的评价方法

Evaluation of local degradation, osteogenesis and tissue response after implantation of
degradable Mg-based bone implant

(征求意见稿)

(在提交反馈意见时, 请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国生物材料学会 发布

目 次

前 言	3
1 范围	4
2 规范性引用文件.....	4
3 术语和定义.....	4
4 试验设计.....	5
5 试验方法.....	6
6 结果评价.....	7
7 试验报告.....	8

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准文件的结构和起草规则》的规定起草。

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。

本文件由中国生物材料学会提出。

本文件由中国生物材料学会团体标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：上海交通大学医学院附属第九人民医院、北京大学口腔医学院。

本文件主要起草人：孙皎、刘昕、韩建民、陆华、郭传琰、隋佰延、俞懿强、邱天成。

可降解镁金属骨科植入物植入后局部降解、成骨与组织反应的评价方法

1. 范围

本文件规定了可降解纯镁及镁合金植入骨组织后，对材料局部降解性能、成骨性能及组织反应进行评价的试验方法。

本文件适用于可降解镁金属骨科植入物的局部降解、成骨与组织反应的评价，不适用于全身毒性反应的评价。

2. 规范化引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分：动物保护要求

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 16886.9 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

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

ASTM F1983-14 Standard Practice for Assessment of Compatibility of Absorbable/Resorbable Biomaterials for Implant Applications

3. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

可降解镁金属骨科植入物 Degradable Mg-based bone implant

以纯镁或镁合金为主的用于骨植入或骨修复的一类可降解金属材料。

3.2

骨生成 osteogenesis

骨组织的生成。

3.3

降解 degradation

材料的解体。

3.4

降解产物 degradation product

某一材料或物质由于物理、代谢和/或化学分解而产生的所有中间或最终副产物。

3.5

植入物初始量 initial material volume (IMV)

植入0天时植入物的横截面面积或体积。

3.6

植入物剩余量 residual material volume (RMV)

植入物在组织内残留的横截面面积或体积。

3.7

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；或植入物所在某一特定区域内所形成的新骨体积。

注：新骨指新生的骨组织。

4 试验设计

4.1 概述

本方法系将医用镁基骨修复材料植入到试验动物骨组织内一定时间后，在试验的不同时点，通过影像学和组织学检查，结合图像定量分析，对可降解镁金属材料植入物的降解性能、成骨能力及植入后局部组织反应进行评价。

注：在进行体内降解试验前宜先按照GB/T 16886.15的要求对植入物进行定性与定量分析。

4.2 样品的制备

4.2.1 试验样品

试验样品的物理特性（如形状、表面粗糙度等）可影响材料的降解性能。

每一个试验样品都应经过与最终产品相同的制造、处理、清洁、灭菌及包装过程，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。

4.2.2 参照样品

鉴于目前尚无公认的、适用于镁基材料对照的材料，因此，可以考虑选择已上市的同类可降解骨修复材料作为参照样品，以评价植入后局部的组织学反应程度，比较材料的降解速率和新骨生成率。

4.2.3 样品形状

植入样品可加工成圆柱形、螺钉状或刻有螺纹，推荐选用圆柱状植入样品，以减少机械刺激对组织的影响。

4.2.4 样品尺寸

根据所选用动物及其骨组织的大小来决定植入样品的尺寸。推荐兔胫骨或股骨部位植入，选用2×6mm的圆柱体。

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 和实验动物的国家法规要求，选择试验动物和饲养，并自由获取食物和水。

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,雌兔应无孕。应选择足够数量的动物以保证每种检查(脱钙和不脱钙)的每一试验周期至少能获得10个试验样品和10个参照样品的标本数。

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,推荐选择兔的胫骨或股骨部位,试验样品与参照样品(若有)应以相同条件分别植入到同一年龄、性别,同一品系同种动物的两侧相同解剖部位,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。

4.4 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。体内动物试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降解试验或特定环境下的数学模型来推算。原则上试验周期应至少(但不限于)设置3个观察时期,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。通常至少(但不限于)设置以下3个时间点:

- 没有或仅有极少量降解;
- 降解过程中(推荐应包括植入物剩余量约为50%时的时间点);
- 组织反应处于稳定状态或植入物几乎完全降解。

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周内几乎完全降解的材料,推荐(但不限于)选择1周、4周、12周为观察期;对于预期超过12周完全降解或达到降解稳态的材料,可根据植入物的降解特性,酌情选择4周、13周、26周、39周、52周或更长时间为观察期。

5. 试验方法

5.1 手术过程

在麻醉和无菌条件下,按常规外科手术要求,于股骨外侧或胫骨内侧部位备皮、消毒、铺巾,切开皮肤,分离皮下组织,沿肌肉间隙暴露骨皮质,用低转速间歇地钻孔,同时用生理盐水冲洗降温,对于胫骨或股骨部位,一侧钻两个孔(最多3个孔),深度与植入物的长度接近,孔径为2 mm,两孔间距不小于10mm,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,螺纹状植入体旋入孔内,逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤。参照材料于对侧同法操作。

5.2 术后临床观察

植入后2周内应每天观察植入部位的皮肤反应情况,有无出血、红肿、气肿和植入物排出等异常现象。

在试验期内定期观察动物的健康状况,记录任何异常发现,包括局部反应及异常行为。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。

5.3 动物处死

观察期结束时用过量麻醉剂无痛处死动物。

5.4 大体观察

目视或用低倍放大镜观察植入部位组织。记录观察到的组织反应的特性和程度，包括血肿，水肿，纤维包裹和/或任何大体发现。记录可观察到的植入物状态，包括表面形态、位置、完整性和残留情况等。

另外，在观察植入部位时，如果动物表现出病态或对植入物的异常反应，如必要则应进行大体尸检。

5.5 取材及组织病理切片制备

切取的组织标本应包括植入物及其周围足够多的未受到影响的组织。对切取的组织块按固定，分别采用脱钙和不脱钙2种制片技术制备组织病理切片，以评价植入后局部的组织学反应以及材料的降解和新骨的生成情况。

5.5.1 常规组织病理切片制备（脱钙）

含植入物的骨组织块取材后应立即置于10%甲醛液中固定2w，然后，置于合适的脱钙液（如EDTA）中脱钙，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，垂直植入体长轴进行常规制作病理切片，HE染色。

5.5.2 硬组织病理切片制备（不脱钙）

含植入物的骨组织块取材后应立即置于70%酒精固定1w~2w，然后梯度酒精脱水，二甲苯透明，甲基丙烯酸甲酯溶液渗透1w，聚甲基丙烯酸甲酯包埋。应在皮质骨组织区域内垂直于植入物的长轴进行切片。采用硬组织切片机切片，研磨抛光至 $50\pm10\text{ }\mu\text{m}$ 厚度，Van-Gieson（V-G）酸性品红染色，或其他适宜的染色方法。

注：在制作组织切片时，每一植入点切取皮质骨区。

5.6 影像学检查

必要时，可采用微型计算机断层扫描（micro-CT）影像学检查分析镁合金植入物的三维降解情况，根据设备情况，选择合适的电压、电流和曝光时间，其中有效像素尺寸不低于10微米。采用相应的软件计算降解剩余合金和新形成骨的体积。

6 结果评价

6.1 降解与成骨性能

6.1.1 定性分析

采用不脱钙的硬组织切片，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）。

6.1.2 定量分析

6.1.2.1 植入物剩余量和新骨生成量分析

采用不脱钙的硬组织切片，运用图像分析系统，光学显微镜下分别定量分析植入物剩余量以及新骨生成量，计算植入物降解率及新骨生成率。

按式（1）计算植入物降解率（degradation rate, DR）：

$$DR(\%) = (1 - RMV/IMV) \times 100\%; \quad (1)$$

式中：

DR —植入物降解率，

RMV —植入物剩余量；

IMV —植入物初始量

按式(2)计算新骨生成率(Rate of new bone formation, RNBF)：

$$RNBF (\%) = NBFV / IMV \times 100 \%; \quad (2)$$

式中：

$RNBF$ —新骨生成率，

$NBFV$ —新骨生成量；

IMV —植入物初始量。

6.1.2.2 计算植入物降解率平均值及新骨生成率平均值

分别计算下列各项数据：

a) 植入物降解率平均值

— 各植入点植入物降解率的总和除以10。

b) 新骨生成率平均值

— 每植入点新骨生成率的总和除以10。

6.2 局部组织学反应

6.2.1 组织学观察(定性)

采用脱钙的硬组织切片，在光学显微镜下观察并比较试验样品与参照材料周围的组织反应，需要(不限于)观察的指标包括：

— 植入物周围气腔形成；

— 肉芽组织、纤维化和纤维囊腔形成；

— 炎性反应程度：炎性充血；炎细胞浸润的数量、分布及种类(嗜中性白细胞、淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞及多核巨细胞)；

— 组织变性及坏死的存在、范围及程度；

— 血管分布、脂肪浸润及新骨形成。

采用不脱钙的硬组织切片，在光学显微镜下，观察的指标包括：

— 材料的破裂和/或存在碎片、材料降解残留物的形状和位置；

— 植入物与周围组织之间的界面；

— 材料周围组织中气腔形成情况。

6.2.2 组织学反应半定量分级

参照GB/T 16686.6附录E的组织学反应记分系统对试验样品的组织切片分别记分。

6.3 影像学分析

必要时，采用配套的软件分析镁合金残留体积，并绘制镁合金植入物体积与时间曲线。

计算分析新生骨体积($V1$)占骨质缺损区域($V0$)的体积比例(Δv)，计算公式为：

$$\Delta v (\%) = (v1 / v0) \times 100\%.$$

7 试验报告

试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。试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参照样品的外形、尺寸和数量。
 - 样品的处理过程: 包括所采用的清洗、处理和灭菌技术(若有)。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。
- 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。
 - 详细描述并比较评价脱钙组织切片中的组织学反应及反应分级情况。
 - 分别报告试验样品和参照样品(若有)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材料的降解率、新骨生成率以及局部组织学反应作出总体评价。
