

# 团 体 标 准

团体标准编号  
代替的团体标准编号

## 磷酸钙生物陶瓷的体内骨诱导性评价方法

*In vivo* evaluating method of oteoinductivity for calcium phosphate bioceramics

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国生物材料学会 发布



# 目 次

## 目录

前 言 .....	II
引 言 .....	III
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. 植入实验 .....	2
6 结果判定 .....	4
7 报告内容 .....	4
附录 A .....	5
参考文献 .....	6

## 前　　言

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

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：四川大学、四川医疗器械生物材料和制品检验中心有限公司、天津市医疗器械质量监督检验中心、四川拜阿蒙生物活性材料有限责任公司、上海贝奥路生物材料有限公司。

本文件主要起草人：朱向东、李向锋、袁波、袁暾、梁洁、肖玉梅、张凯、卢霄、袁博、陈和仲、张丽、张兴栋

本文件首次发布。

## 引　　言

骨诱导磷酸钙生物陶瓷是生物材料骨诱导理论研究转化应用的成果之一，其不仅为临床骨缺损的再生修复提供了可能，也是“组织诱导性生物材料”新定义与理论得以提出的坚实基础。客观地对具有骨诱导性的磷酸钙生物陶瓷类产品进行骨诱导能力的评价，对于控制产品质量，提升产品临床应用可接受水平意义重大。虽然已形成部分体外评价磷酸钙生物陶瓷的骨诱导能力的方法，但受限于当前的研究水平，无法全面、直接地反映其骨诱导能力，仍需要在动物体内实验中进行确认。体内实验受到动物种属、植入方法、植入部位、评价方法等因素影响显著，若不进行相对的规范，实验研究的可比性将受到很大限制，并降低了这些实验研究的价值。而在较为统一的标准之下实施的磷酸钙生物陶瓷体内骨诱导性研究，将可以对相关产品的研发与临床应用提供有力的支持。



# 磷酸钙生物陶瓷的体内骨诱导性评价方法

## 1. 范围

本标准描述了磷酸钙生物陶瓷进行体内植入后骨诱导性评价的方法。

本标准适用于磷酸钙生物陶瓷医疗器械产品的体内骨诱导性能评价。

## 2. 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本文件的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

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：动物福利要求

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 41672-2022 外科植入物 骨诱导磷酸钙生物陶瓷

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

## 3. 术语和定义

GB/T 41672所界定的以及下列术语与定义适用于本文件。

### 3.1 骨诱导 Osteoinductivity

可向多种组织细胞分化的间充质细胞被诱导分化为成骨细胞或成软骨细胞，最终形成骨组织的现象。

[定义来源GB/T 41672-2022]

### 3.2 磷酸钙生物陶瓷 Calcium phosphate bioceramics

由磷酸钙盐构成的，具有骨传导性的一类生物活性陶瓷。

[定义来源GB/T 41672-2022]

### 3.3 异位 Heterotopic

植入/移植位点不直接与骨接触，如骨骼肌。

[定义来源YY/T 1680-2020]

### 3.4 肌间隙 Intermuscular

在解剖学上可识别的肌肉之间的部位。

### 3.5 皮下 Subcutaneous

皮肤以下的疏松结缔组织或脂肪组织。

## 4. 动物模型

### 4.1 动物选择

健康的实验用小鼠、大鼠、兔子、犬、猪、羊或猴等动物。推荐使用成年健康的犬、猪、羊或猴等大动物。

### 4.2 异位植入口点

当采用肌间隙植入时，应选择肌肉丰富处的肌肉之间植入，避免植入材料与骨接触，如脊柱旁肌、大腿肌等。肌间袋状孔隙为合适的植入口点。

当采用皮下植入时，应根据实验动物的种属和植入材料的尺寸选择合适的植入部位，可选择背部脊柱旁或颈部等部位植入。

### 4.3 植入数量与植入时间

应在同样条件下将试验和对照材料样品植入相同年龄、性别和品系的同一种属动物的对应解剖部位，根据动物种属大小和解剖位置情况确定植入物的数量和尺寸。在可能的情况下，参照/对照样品和试验样品宜植入同一只动物。至少使用 3 只动物进行植入试验，每只动物不少于 2 个植入口点，保证最终每组不少于 5 个样本进行评价。

在植入 3 个月后进行取材，或根据产品特点选择合适时间点实施取材。

## 5. 植入实验

### 5.1 实验动物管理

参考 GB/T 16886.2 的要求进行。

### 5.2 样品准备

植入物的体积/质量需一致，以保证植入的磷酸钙生物陶瓷样品间具有可比性。准备植入的样品应无菌。

### 5.3 植入操作

参考GB/T 16886.6的要求进行。

## 5.4 动物术后管理

5.4.1 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与记录。

5.4.2 若实验动物在试验过程中发生死亡，需记录动物的最终体重，并对动物进行尸检，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。

## 5.5 取材方法

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

5.5.2 相关操作及动物福利要求参考 GB/T 16886.2 和 GB/T 16886.6。

## 5.6 组织学评价

5.6.1 取材后，采用经确认的固定方法进行固定，将固定好的样本进行硬组织切片；或通过常规组织学处理程序，进行脱钙、脱水、石蜡或其他介质包埋并修整，然后选择适宜的新骨形成观察方法对切片进行染色。建议的染色方法有：苏木素-伊红染色(H&E)，甲苯胺蓝染色、阿辛蓝染色、Masson 三色染色、亚甲基蓝-碱性品红染色、Goldner 三色染色和 Von Kossa 染色等。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，选取染色最均匀、植入材料量最多的切片用于成骨诱导能力评价。

5.6.3 使用显微镜观察或切片扫描系统确定样品内部是否存在新骨形成物及其量。

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新骨形成的面积(A),样品内部所有孔隙结构的面积(B),

注：新骨形成包括：骨质、新骨、编织骨、板层骨和骨髓。

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 使用以下评分系统（见表1）进行评分。

表1 体内骨诱导新骨形成能力评分系统

评分	新骨形成量/%	检测结果
0	样品中未观察到新骨	差
1	<1	差
2	1-10	合格
3	11-20	良好
4	>20	优秀

6.2 当同一植人批次中 75%的受检样品，且平均新骨率>1%时可认为该批次具有骨诱导潜力。

6.3 报告数据来源于不少于三个研究人员的独立统计和评估结果。

## 7 报告内容

### 7.1 测试样品的基本信息

样品名称、规格、形状、批号、有效期和必要的理化信息（如孔隙结构信息、物相组成等）等。

### 7.2 植入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）。组织学处理的方法描述（固定方法、切片参数及染色方法等）。

7.3 研究设计、实验过程、检验方法、评价标准和评价结果的描述。

7.4 记录应包括所有方法的偏差。

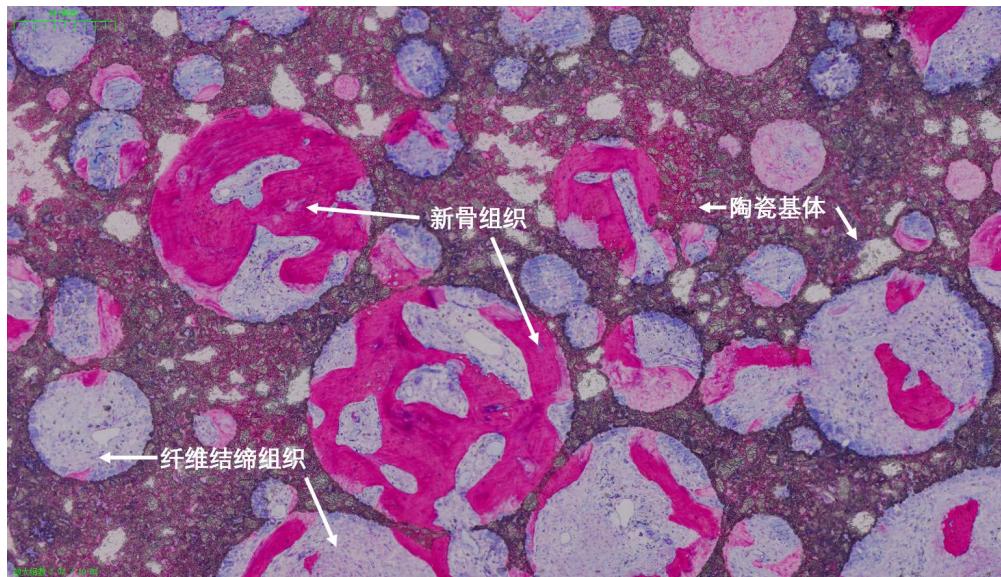
7.5 执行和委托验证的责任方的签名和日期。

## 附录 A

(资料性)

### 组织学切片中新骨的识别

图A给出了磷酸钙陶瓷植入比格犬背部肌内3个月的硬组织切片图片（亚甲基蓝-碱性品红染色），从图中可以看到，磷酸钙陶瓷基体清晰可见（见箭头），且孔隙内部有大量的新生骨组织形成（见箭头），未成骨的孔隙区域长入了大量的纤维结缔组织（见箭头）。



图A 磷酸钙陶瓷异位植后的组织学切片

## 参考文献

- [1] 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
- [2] Zhang X, Zou P, Wu C, et al. A study of porous block HA ceramics and its osteogenesis[J]. *Bioceramics and the human body*. Amsterdam, eds: A Rovaglioli and A Krajewski; Elsevier, 1991: 408-415.
- [3] Yang Z, Yuan H, Tong W, et al. Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: Variability among different kinds of animals. *Biomaterials*. 1996, 17: 2131-7
- [4] Hong Y, Fan H, Li B, et al. Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphate nanoceramics. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2010, 70(3-6): 225-42
- [5] Yuan H, Fernandes H, Habibovic P, et al. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(31): 13614-9
- [6] Tang Z, Li X, Tan Y, et al. The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics. *Regenerative biomaterials*, 2018, 5(1): 43-59
- [7] Zhou C, Li X, Cheng J, et al. *Bioactive Ceramics and Metals for Regenerative Engineering*. *Regenerative Engineering*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2018
- [8] Perez RA, Mestres G. Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration[J]. *Materials Science & Engineering C*, 2016, 61(Apr.): 922-39.
- [9] Yuan H, Kurashina K, de Bruijn J D, et al. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 1999, 20(19): 1799-806
- [10] Fan H, Ikoma T, Tanaka J, et al. Surface structural biomimetics and the osteoinduction of calcium phosphate biomaterials. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2007, 7(3): 808-13
- [11] Barradas A M, Yuan H, van Blitterswijk C A, et al. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater*, 2011, 21(407): 29
- [12] Veronesi F, Maglio M, Brogini S, et al. In vivo studies on osteoinduction: A systematic review on animal models, implant site, and type and postimplantation investigation[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2020, 108(9): 1834-1866.
- [13] Feng C, Wu Y, Li Q, et al. A Novel Hollow - Tube - Biphasic - Whisker - Modified Calcium Phosphate Ceramics with Simultaneously Enhanced Mechanical Strength and Osteogenic Activity[J]. *Advanced Functional Materials*, 2022, 32(44): 2204974.