

中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXX—XXXX

可吸收医疗器械植入后组织病理学样本制备与评价方法

The Method of tissue sample preparation and histological evaluation for absorbable medical devices after implantation

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

征求意见稿

2022.7

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

## 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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会（SAC/TC248）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

征求意见稿

## 引 言

可吸收医疗器械植入后局部反应与降解的评价不同于不可吸收医疗器械,其可重现和具有意义的评价历史还不长。可吸收医疗器械植入后可能不会形成纤维囊腔,但可能会出现材料降解和吞噬降解产物的细胞。评价时考虑观察植入部位可吸收医疗器械是否发生降解、植入物自身及降解产物对局部组织的炎性反应以及植入部位修复过程的影响。对于可吸收骨植入物,除评价降解性能外还包含植入物周围新骨生成情况。只要不损害动物福利或干扰预期的生物反应,影像技术、不透射线的标记或手术观察等方法都是可行的。

征求意见稿

# 可吸收医疗器械植入后组织病理学样本制备与评价方法

## 1 范围

本文件规定了可吸收医疗器械植入后局部组织病理学样本的制备、组织反应及降解情况的评价方法。

本文件适用于可吸收医疗器械。

## 2 规范性引用文件

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 16886.6 医疗器械生物学评价 第6部分：植入后局部反应试验

## 3 术语和定义

GB/T 16886.6 界定的术语和定义适用于本文件。

## 4 概述

本方法系将可吸收医疗器械植入动物体内一定时间后，对制备植入物周围组织的组织病理学样本方法进行规范，并对可吸收医疗器械的植入后局部反应及降解情况进行评价的方法。

## 5 组织病理学样本制备方法

### 5.1 总则

对于可吸收医疗器械植入后局部反应组织病理学样本制备时，组织包膜在接触固定液之前或之后可能是开放的，小心操作避免破坏植入物/组织界面，将植入物在原位与组织完整包埋在一起，记录植入物表面和组织界面的状况。对于不宜取出或“硬”的植入物（可吸收人工骨、可吸收金属、可吸收聚合物等），可采用树脂包埋和适宜的切片或磨片技术制备组织病理学切片，无需脱钙处理。过程中要避免使用溶解材料的溶剂（如某些可吸收凝胶类产品可能溶解于固定液），如果不能避免，则要采取措施标记材料在组织中的位置。

### 5.2 植入物取出及组织样品采集

对于可吸收医疗器械植入后局部反应试验，在规定的时间取材时，首先应识别植入部位标记物（如非侵入持久性皮肤染料、非吸收性缝合线等）来确定植入位置。

可吸收医疗器械植入早期，样品可能不降解或微量降解，中期有可能发生实质性结构紊乱和/或器械碎裂，取材时尽量完整。降解后期可吸收性植入物可能基本被吸收，取材部位可能不明显，则需扩大

取出部位，可包括预期植入位置周边2 mm~5 mm的正常组织，尽可能包含任何可辨认的残余材料，必要时取引流淋巴结。

### 5.3 固定

通过固定可保持细胞、组织的固有形态和结构，使组织硬化，便于切块。固定时，采用适宜的固定液固定组织，组织固定不宜影响后续切片和染色过程，且固定液不宜改变植入物的物理形态和体积。

### 5.4 修整组织块

根据样品特性和植入情况，选择适宜的切割位置、切面来修块，以便于后期的组织学观察。修块前宜详细观察组织样本块的外观，了解样品的植入部位、植入物位置、植入量及其他相关可参考的信息。必要时可利用X光线对植入物进行定位后，做好标记，再行分割。修块过程防止样品与组织脱离。

以下列举常见可吸收医疗器械植入后组织样本切割方式。

- a) 圆盘状材料（如可吸收膜等）：一般选择在其中心点纵切。
- b) 棒状或圆柱状材料（如可吸收骨钉等）：对于皮下、肌肉组织一般选择在中部横切；对于脑组织、骨组织带沟槽的圆柱形植入物，一般选择凹槽的中央位置和植入物的平坦顶端表面纵切。
- c) 非固形试验样品（包括粉剂、凝胶等）：选择在其植入点位置及植入位置周边几个毫米区域切割。

### 5.5 脱水

组织样本经过固定和冲洗后，组织中含有较多的水分，宜通过脱水除去组织内的水分。若组织脱水不当，可能会造成细胞损伤。脱水前将组织样本流水冲洗至少1 h，冲洗过程宜轻柔小心，水流宜尽可能地小，防止可吸收医疗器械与组织脱离。常见的脱水剂为醇类，也可使用丙酮等。

### 5.6 包埋与切片

对于“软”的可吸收医疗器械（如可吸收缝线、可吸收膜、止血海绵、可吸收凝胶等），在确保样本中保留植入材料和周围的组织的情况下可用石蜡包埋。若组织切片时，可使用不同熔点和硬度的多种石蜡类型满足不同组织的要求。包埋时宜按组织样品切面或指定切面（一般指组织块的最大面）向下埋入熔蜡中。

对于不宜取出或“硬”的植入物（如可吸收骨钉、可吸收支架等），首选将完整组织包膜与植入物一起在原位采用树脂包埋，采用适宜的切片或磨片技术制备组织学切片。

石蜡包埋组织切片的厚度一般为4  $\mu\text{m}$ ~8  $\mu\text{m}$ ，切片步骤宜避免产生影响（例如，不适当的切片工作或刀太钝导致的组织切片的固定相关的收缩或划痕、褶皱或撕裂）。采用树脂包埋切片时，采用平行粘片装置进行粘片，硬组织切片进行切片，硬组织磨片进行磨片。根据样本厚度，设置合适的磨片速度，其间不断多次利用千分尺测量切片厚度，直至所需的切片厚度。

### 5.7 染色

常用的组织显色方法有苏木素——伊红（HE）染色法、甲苯胺蓝染色法、亚甲基蓝——酸性品红染色法、Goldner三色染色法、Van Gieson苦味酸——品红染色法等。必要时可采用免疫组化染色对可吸收医疗器械植入后组织特定类型的浸润细胞进行染色分析。

## 6 可吸收医疗器械植入反应与降解评价方法

## 6.1 总体要求

将试验样品和对照样品的反应进行比较。在相对于每个植入物的等效位置进行试验植入物和对照的比较，这样可将组织与植入物之间相对运动造成的影响降至最低。对照样品应选择已确立临床可接受性和生物相容性的医疗器械所采用的材料，或选取商业化可购买的临床可接受性和生物相容性特性已普遍接受的可吸收材料作为对照样品。当采取可吸收材料为对照样品时，其材料类型、降解行为（尤其是降解速率）、临床应用的组织部位等应尽可能与试验样品类似并加以说明。

可吸收医疗器械的降解评价，部分取决于材料的降解速率。由于降解是一个连续的过程且降解过程中可能会发生降解产物的“爆发”性释放，宜对植入物各时间点与降解过程相关的局部组织反应进行评价，包括未降解或微降解时、发生降解时、达到稳定状态时，即组织修复或接近完全降解。

## 6.2 可吸收医疗器械植入后局部反应评价方法

### 6.2.1 定性分析

评估和记录的生物学反应指标应包括：

- 纤维化/纤维囊腔的病变范围；以微米或半定量表示层厚和炎症；
- 植入物周围空腔的形成；
- 与材料/组织界面的距离有关的炎性细胞类型、数量和分布，即嗜中性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和多核细胞；
- 出现坏死及其范围程度；
- 其他组织改变，如血管形成、脂肪浸润、肉芽肿形成、矿化和骨形成；
- 材料参数，如破裂和/或存在碎片、材料降解残留物的形状和位置；
- 长入组织的定性分析（包括新生组织形态等）；
- 对于骨植入物，包含植入物与组织之间的界面、植入物周围新骨生成情况（包括编织骨、板层骨、骨髓等）以及其间存在的非钙化组织。

表1给出了对可吸收医疗器械植入后的生物学反应进行定性分析评价的示例。

表1 可吸收医疗器械植入后生物学反应定性分析评价示例

指标	定性分析				
细胞浸润	无细胞浸润	极少量细胞浸润植入物裂隙（伴随或不伴随结缔组织形成）	中等程度细胞浸润植入物裂隙中和/或植入物碎片周围形成纤维组织	重度细胞浸润和/或大部分植入物碎片周围纤维组织形成	植入物碎片周围广泛存在浸润细胞和纤维组织
植入物碎片	完整	植入物少量降解，植入物边缘少量裂解，植入物出现裂隙和/或出现小碎片	植入物中等程度降解，植入物出现裂隙和/或出现一些植入物碎片	植入物显著降解，出现大量植入物碎片	植入物大量降解几乎全部成为碎片
吞噬作用	无吞噬	轻微吞噬，少量异物巨细胞	中等吞噬，一些和/或成团的异物巨细胞	显著吞噬，植入物周围存在数团异物巨细胞和/或异物巨细胞区域	重度吞噬，所有材料均被降解为大小不等的碎片并被巨噬细胞吞噬

### 6.2.2 半定量计分

适用时，对于每项组织学特性评价，诸如囊腔形成、炎症、多形核白细胞、巨细胞、浆细胞的存在和/或材料的降解，评价报告中宜描述所采用的半定量记分系统。除了反应成分的记分，还宜评价所有反应的程度。宜对每种细胞类型和新生血管形成反应进行说明。对于试验和对照样品之间存在显著差异值的每一细胞类型，宜解释该差异的相关性。

在这个半定量记分系统中，炎症细胞浸润和坏死用表2的记分系统，新生血管形成、纤维化和脂肪浸润用表3记分系统。表2参数权重因子为2，表3中参数权重因子1。表2和表3总值相加后分别计算试验组和对照组的平均记分，从试验组平均记分中减去对照组的平均记分。

表2 组织学评价系统——细胞类型/反应

细胞类型/反应	记分				
	0	1	2	3	4
多形核白细胞	0	极少, 1 phf~5 phf <sup>a</sup>	5 phf~10 phf	重度浸润	满视野
淋巴细胞	0				
浆细胞	0				
巨噬细胞	0				
巨细胞	0	极少, 1 phf~2 phf	3 phf~5 phf	重度浸润	成片分布
坏死	0	极少	轻微	中度	重度

<sup>a</sup> phf= 高倍 (400×) 视野

表3 组织学评价系统——组织反应

反应	记分				
	0	1	2	3	4
新血管形成	0	轻微毛细血管增生, 局灶性, 1~3 个芽	4~7 组毛细血管增生, 辅以成纤维细胞结构	较大范围的毛细血管增生, 辅以成纤维细胞结构	广泛毛细血管增生, 辅以成纤维细胞结构
纤维化	0	局限性区域	中度厚区域	厚区域	广泛区域
脂肪浸润	0	极少量脂肪细胞, 伴纤维化	数层脂肪细胞和纤维化	植入部位脂肪细胞聚集区域延伸扩大	植入物周围完全被脂肪细胞包裹

在本半定量记分系统下，与对照样品相比，该试验样品被认为对组织有以下反应：

- 无刺激或极轻微刺激 (0.0~2.9)；
- 轻度刺激 (3.0~8.9)；
- 中度刺激 (9.0~15.0)；
- 重度刺激 (≥15.1)。

### 6.3 可吸收医疗器械植入后降解和新生组织生成的评价方法

#### 6.3.1 降解率

选择在包含所有植入物视野的光学显微镜下，运用图像分析系统进行分析。测量植入物的剩余直径/面积/数量等半定量分析植入物剩余总量，以植入初始时的直径/面积/数量等为初始量，按式（1）计算植入物降解率（%）。

$$A(\%) = (1 - \frac{B}{C}) \times 100\% \quad (1)$$

式中：

- A——植入物降解率；
- B——植入物剩余量；
- C——植入物初始量。

### 6.3.2 新生组织生成率

当植入物的最终目的是使组织再生时，测量植入区域内新生组织的面积，按式（2）计算新生组织生成率（%）。

$$NB(\%) = \frac{S1}{S0} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

- NB——新生组织横截面的面积占植入物横截面总面积的百分率；
- S1——植入物横截面总面积内所形成的新生组织的总面积；
- S0——植入物横截面总面积。

针对骨科可吸收植入物，必要时，宜采用微型计算机断层扫描（micro-CT）等影像学检查植入物的降解和新骨生成情况。根据设备情况，选择合适的电压、电流和曝光时间，采用相应的软件计算新生骨的体积。按式（3）计算分析新生骨体积占骨缺损区域的体积比例（%）。

$$\Delta v(\%) = \frac{V1}{V0} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

- $\Delta v$ ——新生骨体积占骨缺损区域的体积比例；
- V1——新生骨体积；
- V0——骨缺损体积。

对于需要经过同位素、荧光或其他特殊方法进行标记来进行可吸收植入物降解分析，可采用相应的测试方法进行。

## 7 结果评价

可吸收医疗器械植入反应与降解评价应包括：

- a) 试验和对照样品的描述，如植入样品的识别、形状、尺寸和形态；
- b) 所采用的固定和组织切片制备技术，记录每只动物每个观察期切取出的植入物数量；
- c) 对植入物的评价，包括对植入物、组织和器官的总体观察结果；
- d) 植入部位和尸检中显示改变的任何器官的组织学评价方法和结果；
- e) 包含但不仅限于降解程度的描述，包括材料取出时的特性（如游离颗粒、纤维形成、无定形凝胶、结晶度等）。当植入物的最终目的是使组织重建，则评价主要关注植入部位预期形成的新生组织情况；
- f) 植入物植入后局部反应和降解的定性或定量分析；



- g) 从每次组织学评价中得出的结果和适用的（统计学）分析。适用时，应包括引流淋巴结的观察结果。

征求意见稿

## 参 考 文 献

- [1] ASTM F1983, Standard Practice for Assessment of Compatibiltiy of Absorbable/Resorbale Biomaterials for Implant
- [2] DE JONG, W.H., BERGSMA, J.E., ROBINSON, J.E. and BOS, R.R.M., Tissue response to partially in vitro predegraded poly-L-lactide implants, *Biomaterials*, 26, 2005, pp. 1781-1791
- [3] IKARASHI, Y., TOYODA, K., OHSAWA, N., UCHIMA, T., TSUCHIYA, T., KANIWA, M., SATO, M., TAKAHASHI, M. and NAKAMURA, A., Comparative Studies by Cell Culture and in vivo Implantation Test on the Toxicity of Natural Rubber Latex Materials, *J Biomed Mater Res*, 26, 1992, pp. 339-356
- [4] IKARASHI, Y., TSUCHIYA, T., TOYODA, K., KOBAYASHI, E., DOI, H., YONEYAMA, T. and HAMANAKA, H., Tissue Reactions and Sensitivity to Iron Chromium Alloys, *Mater Trans*, 43, 2002, pp. 3065-3071
- 

征文意见稿