

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0127.4-XXXX
代替YY/T 0127.4 -2009

口腔医疗器械生物学评价 第4部分：骨植入试验

Biological evaluation of medical devices used in dentistry

Part 4: Bone implant test

征求意见稿

××××-××-××发布

××××-××-××实施

国家药品监督管理局 发布

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。

本文件是 YY/T0127《口腔医疗器械生物学评价》的第4部分。YY/T 0127 已经发布了以下部分：

- YY/T 0127.1 口腔材料生物试验方法溶血试验
- YY/T 0127.3 口腔医疗器械生物学评价 第3部分：根管内应用试验
- YY/T 0127.4 口腔医疗器械生物学评价 第4部分：骨植入试验
- YY/T 0127.5 口腔医疗器械生物学评价 第5部分：吸入毒性试验
- YY/T 0127.6 口腔材料生物学评价 第2单元：口腔材料生物试验方法 显性致死试验
- YY/T 0127.7 口腔医疗器械生物学评价 第7部分：牙髓牙本质应用试验
- YY/T 0127.8 口腔材料生物学评价 第2单元：口腔材料生物试验方法 皮下植入试验
- YY/T 0127.9 口腔医疗器械生物学评价 第2单元：试验方法 细胞毒性试验：琼脂扩散法及滤膜扩散法
- YY/T 0127.10 口腔医疗器械生物学评价 第2单元：试验方法 鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验（Ames 试验）
- YY/T 0127.11 口腔医疗器械生物学评价 第11部分：盖髓试验
- YY/T 0127.12 牙科学口腔医疗器械生物学评价 第2单元：试验方法微核试验
- YY/T 0127.13 口腔医疗器械生物学评价 第13部分：口腔黏膜刺激试验
- YY/T 0127.14 口腔医疗器械生物学评价 第2单元：试验方法急性经口全身毒性试验
- YY/T 0127.15 口腔医疗器械生物学评价 第15部分：亚急性和亚慢性全身毒性试验：经口途径
- YY/T 0127.16 口腔医疗器械生物学评价 第2单元：试验方法 哺乳动物细胞体外染色体畸变试验
- YY/T 0127.17 口腔医疗器械生物学评价 第17部分：小鼠淋巴瘤细胞（TK）基因突变试验
- YY/T 0127.18 口腔医疗器械生物学评价 第18部分：牙本质屏障细胞毒性试验
- YY/T 0127.19 口腔医疗器械生物学评价 第19部分亚急性和亚慢性全身毒性试验：植入途径

本文件是对 YY/T 0127.4-2009《口腔材料生物学评价 第2单元：口腔材料生物试验方法 骨埋植试验》的修订。

本文件与 YY/T 0127.4-2009 相比，主要变化如下：

- 标准名称改为：“口腔医疗器械生物学评价 第4部分：骨植入试验”；
- 增加了“3 术语和定义”；
- 修改了“4 试样制备”；
- 增加了“6 实验动物及动物福利”；
- 修改了“7 试验周期”；将长期试验不少于 26 周改为不少于 12 周，增加了可降解/可吸收材料的试验周期设定内容；
- 修改了“8 试验部位”，增加了植入部位和试样尺寸的描述；
- 增加了“12.2.2 非脱钙标本制备的描述”；
- 修订了“12.4 反应分级与 12.5 结果判定”中将“4 周”改为“短期”，“26 周”改为“长期”，

增加了可降解/可吸收材料评价的内容。

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。

本文件由全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会（SAC/TC 99）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件所代替标准的历次版本发布情况为：

——YY 127-2009

口腔医疗器械生物学评价 第 4 部分：骨植入试验

1 范围

本文件规定了口腔医疗器械的骨植入试验方法。
本文件适用于评价组织对拟长期或持久与口腔骨组织接触的口腔医疗器械的生物学反应。

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 13810 外科植入物用钛及钛合金加工材
- 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 16886.12 医疗器械生物学评价 第 12 部分：样品制备与参照样品

3 术语和定义

GB/T 16886.6、GB/T 16886.12 中界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1 试验对照 experimental control

具有适当反应特性的物质，常用于特定的试验系统以评价试验系统的反应是否具有重现性和适宜性。

3.2 阴性对照 negative control

经充分表征的材料和/或物质。该材料和/或物质当用某一规定程序试验时，证实该试验程序对于在试验系统中得出具有重复性的、适当阴性、无反应或最小应答是适宜的。

3.3 参照材料 reference material

具有充分重现性的一种或多种特性值，并已确定能用于标定器具、评价测量方法时或给材料赋值的材料。

4 试样制备

4.1 应按最终产品相同的方法对试验样品进行制备、加工、清洁和消毒，优先选用成品进行骨植入试验，根据实验动物和植入部位选择并制备适宜尺寸的试样。固化类的材料（如骨水泥、根管充填材料等）：使用前需调和各组分，并在植入前使之固化。对于设计为需在应用部位固化或聚合的材料，首先考虑未固化前植入骨内，如无法实现应特殊说明。如材料为非无菌状态提供，应对其灭菌方法进行论证或说明。每个试验周期至少 10 个试样。

4.2 试样尺寸

优先选择小型实验动物，如大鼠、兔等；也可根据试验样品的特殊性选用较大型实验动物，使用较大型动物时需要论证。试样样品尺寸根据选用的试验动物和植入部位骨的大小来确定：

种属/	胫骨/股骨	股骨远端髁部	颅骨	下颌骨
-----	-------	--------	----	-----

植入部位	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
大鼠	/	直径 2，高度 6 的圆柱， 直径 1.5~2.5，长度 4-6 的螺钉	直径 4~6，高度 0.3~1.0 的圆片	推荐直径 4-6 的圆 片
兔	直径 2，高度 6 的圆柱， 直径 2~4，长度 4-6 的螺 钉	直径 2~5，高度 4-8 的 圆柱或螺钉	直径 6-12，高度 0.3~2 的圆片	推荐直径 2~4，长 度 3-6 的圆柱或螺 钉
比格犬	直径 2~4，长度 6-8 圆柱 或螺钉	直径 2~6，长度 6-10 的 圆柱或螺钉	/	直径 2~4，长度 6-10 的圆柱或螺钉

注：也可选用其他合适的动物和试样尺寸，参见 ISO 10993-6.

5 试验对照

按 GB/T 16886.12 的规定选择合适的试验对照材料，对照材料宜与试验样品具有尽可能相近的物理化学特性，或已知具有良好生物相容性和临床可接受性的材料。

金属试样的对照材料可选用化学成份符合 GB/T 13810 规定的纯钛和钛合金，按 4.2 加工成植入体。

6 实验动物和动物福利

6.1 动物福利应依照：

- a) GB/T 16886.2 或；
- b) 实验动物的国家法规要求。

注：根据 GB/T 16886.2 规定饲养，并可自由摄取食物及水。

6.2 选择实验动物要考虑动物的寿命和植入周期的长短。推荐优先选择小型实验动物，或可论证使用较大动物。记录动物的种属、性别、年龄、健康状况等。选择动物大小、动物重量和年龄以及植入部位时，宜确保植入物放置不会造成试验部位病理性骨折的重大风险。使用年幼动物时，确保植入物避开骺区或其他未发育成熟骨等部位。种属间骨的生理学差异至关重要，宜在植入前先对其进行评估。另外，相同种属的非特定目的选育的动物之间骨质量可能会有差异，必要时需要测定骨密度，以识别合适的实验动物和解释试验结果。

7 试验周期

7.1 非可降解/可吸收材料：根据器械的特性和用途选择合适的试验周期。试验应包括短期试验和长期试验。一般短期试验 1 周~4 周，长期试验不少于 12 周。

7.2 可降解/可吸收材料：试验周期通常设置至少三个时间点：降解/吸收早期（未有或仅少量降解/吸收）、降解/吸收中期（降解/吸收过程中）、降解/吸收晚期（组织反应达到稳定状态或产品几乎完全降解/吸收）。如需研究材料降解过程，试验周期应长于材料的降解/吸收时间，或者直至相应的组织反应达到稳定状态，通常需设置多个观察时间点。对于可降解/可吸收材料，可参考体外试验评估产品的降解/吸收时间，以辅助确定试验周期。

8 试验部位

8.1 试验和对照样品应采用等同的解剖位点，试验样品应植于对照样品的对侧。每一试验周期期应保证至少能获得 10 个试验样品和 10 个对照样品的数量，用于评价一种材料的组织样本应至少取自 3 只动物。

- a) 股骨外侧或胫骨内侧；
- b) 股骨远端髌部骨；
- c) 颅骨，靠近颅骨中线两侧；
- d) 下颌骨。

也可根据器械的实际用途选择其他合适的植入部位。

9 手术过程

常规手术过程如下：用合适麻醉剂将动物实行全身麻醉。于试验区域剃毛。用浓度为 5g/L 的碘伏或其他合适的消毒方式对术区消毒。逐层切开并分离皮肤、皮下组织，肌肉、骨膜。用低速钻断续地在骨上钻孔，同时用生理盐水冷却，钻出适量的孔用于植入样品。植入前将孔扩至最终直径或攻出螺纹，植入物直径与骨植入钻床应匹配良好，避免纤维组织向骨内生长。片状、柱状样品用手指按压嵌入，螺钉状植入物用器械按预定转距旋紧到位并记录该转距。逐层缝合肌筋膜、皮下组织及皮肤。必要时可使用抗生素，抗生素的使用需进行论证。如需要，应对植入位点采用合适的方式进行标记。

10 术后评价

在试验期内观察动物，并记录任何异常发现，包括局部反应及异常行为。

若植入部位感染或损伤而影响结果则应重新试验。

若动物在处死前已经死亡，应确定死亡原因。

若死亡与试验材料无关，则应补做试验。

11 处死

观察期结束时用过量的麻醉剂处死动物。

12 生物学反应评价

通过对不同时间内的肉眼观察和组织病理学反应分级评价生物学反应，并比较试验材料和对照材料的生物学反应。

对相同部位相对应的每一对照植入物与试验植入物进行比较，以保证组织和植入物之间相对运动产生的影响最小。

柱状样品的观测部位应是柱的中部；带槽的柱状植入物，其槽间的中央部位及平顶端面处适合于评价。

12.1 肉眼观察评价

用低倍放大镜观察切下的植入部位组织，应包括对局部引流淋巴结的评价。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。记录植入物的状态、形态、位置包括可降解/可吸收材料的可能残余物。观察结果应照相存档。

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反应，如必要则应进行大体尸检。

12.2 植入物切取和组织标本制备

为了评价局部生物学反应，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。如果植入物在观察部位不明显时（可降解/可吸收材料），应扩大取材部位至包括周围数毫米正常组织的范围。对于非可降解/可吸收材料，应包括大体病理结果显示异常的引流淋巴结。对于可降解/可吸收材料，如可行应包括引流淋巴结，因为引流淋巴结对于评价可降解材料的降解过程很重要。

12.2.1 脱钙标本制备

对切取的试验和对照植入物组织标本进行处理，固定于 10%的福尔马林溶液中，根据组织样本的大小，固定 1 天~3 天，完成固定后，采用合适脱钙剂进行脱钙处理，然后即可以从植入物囊腔中小心移除坚硬的材料，如表面光滑的金属或其他材料，囊腔代表植入腔。然后再进行常规系列乙醇脱水，石蜡包埋，平行植入人体长轴进行切片，间隔取片，H-E 染色。

采用常规技术（石蜡包埋）处理组织标本时，组织包膜在放入固定液之前或之后可能会被弄破，应报告植入物表面和组织床的状态，应注意尽量不要破坏植入物/组织界面。

12.2.2 非脱钙标本制备

当无法移除植入物或预测植入物/组织界面将被破坏时，推荐将完整组织包膜与在原位的植入物使用硬塑料一起包埋，制作硬组织切片。

对切取的试验和对照植入物组织标本进行处理，固定于 10%的福尔马林溶液中，根据组织样本的大小，通常固定 3 天~4 天，完成固定后，将标本脱水与透明处理，甲基丙烯酸甲酯（MMA）包埋，采用适当的切片、贴片、磨片与染色技术制备硬组织切片。事实表明，使用硬塑料包埋技术对界面组织不会造成明显改变。

也可以采用其他方式进行非脱钙标本制备。

12.3 显微镜观察评价

用定量记分系统（如用 μm 表示）或半定量记分系统进行组织学评价时，应考虑到受影响区域的范围。

应评价和记录的生物反应指标包括：

- a) 纤维化/纤维囊腔的病变范围；以微米或半定量表示层厚（见附录 A）和炎症；
- b) 由组织形态学改变而确定的变性；
- c) 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；
- d) 出现坏死及其范围程度；
- e) 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；
- f) 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；
- g) 对于多孔和可降解/可吸收植入材料，组织长入的定性和定量。

对于可降解材料和可吸收材料，在降解一半或接近完全降解水平时，会有一些残留物存在于组织中。

另外评价正常组织结构的修复时，应观察有代表性标记的或模板的植入部位。

对于骨组织，主要观察组织与材料的界面处，应评价植入物与骨的接触面积和植入物周围骨的数量以及其间的非钙化组织，注意骨吸收和骨形成情况。

对于观察到不良组织病理学结果（如免疫细胞浸润）的情况，除了标准的苏木素-伊红组织病理学评定方法外，推荐采用附加的分析方法。

12.4 反应分级

短期和长期试验的组织反应分级：

a) 无反应～轻微组织反应

短期时组织排列正常，无明显炎症反应，无骨吸收；

长期时组织排列正常，骨组织再生。无或仅轻微炎症反应。

b) 中度组织反应

短期时有炎症反应，组织保持其结构，但含有淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞，偶有异物细胞。无明显中性白细胞浸润。可有骨吸收；长期时有散在的慢性炎症细胞、淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞，偶有异物细胞浸润。组织排列良好，骨组织再生，无骨吸收。

c) 重度反应

短期时组织反应明显。组织排列差，并有中性白细胞浸润，可有骨吸收；长期时组织反应明显。淋巴细胞、浆细胞及巨噬细胞浸润。可有骨吸收。

其他试验周期的组织反应，可参考上述组织反应分级进行。

除可采用 12.4 的组织反应分级方法外，在组织反应分级过程中，还可参考采用半量化组织反应分级（参见附录 A）和量化计分系统。

12.5 结果判定

按照 11.4 组织反应分级的结果判定：（对于非可降解/可吸收或者可降解/可吸收材料降解/吸收达到稳态或者已是完全降解/吸收状态）

a) 长期时对照组出现中度反应的试样数为三个或三个以上需要重新试验。

b) 在任一观察期出现重度反应者均认为该材料不合格。

c) 长期时，中度反应的试样为三个或三个以上则认为该材料不合格。

d) 除上述情况外，均认为该材料合格。

对于尚未完全降解/吸收或降解/吸收未达稳态或其预期目的是使组织重建，主要关注植入部位预期形成的正常组织情况，不关注材料是否完全降解，可通过与参照材料组织反应的比较进行判定及评价。

附录A

(资料性)

植入后局部生物学反应评价示例

A.1 对于每一组织学特性的评价如囊形成、炎症、多形核白细胞、巨细胞、浆细胞、和/或材料降解/吸收等宜使用半定量记分系统（见参考文献6、7、8、9、10）。如表A1、表A2的组织学反应记分系统可以转化为如表A3的半定量记分系统。

A.2 可降解/可吸收材料的记分系统参见参考文献[11]。

A.3 半定量记分系统示例：

表A1 组织学评价系统示例-细胞类型/反应

细胞分型/反应	得分				
	0	1	2	3	4
多形核白细胞	0	极少，1 phf~5/phf ^a	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
坏死	0	极少	轻微	中度	重度
^a phf =高倍（400×）视野。					

表A2 组织学评价系统示例-组织反应

反应	得分				
	0	1	2	3	4
新生血管	0	轻微毛细血管增生，局灶性，1~3个芽	4组~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	中度厚度带	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绕

表A3 半定量评价系统示例

试验样品:																					
植入周期																					
对照样品																					
动物编号:	试验样品										对照样品										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A1.炎症反应																					
多形核白细胞																					
淋巴细胞																					
浆细胞																					
巨噬细胞																					
巨细胞																					
坏死																					
合计（×2）																					
A2.新生血管形成																					
纤维化																					
脂肪浸润																					
合计																					
总分=（A1+A2）																					
组合计																					
平均值																					
ª刺激指数=试验组平均数-对照组平均数																					
创伤性坏死																					
异物碎片																					
ª检查植入物数量																					
注：对于可降解/可吸收材料可能需要进一步观察，即降解/吸收程度。																					
ª刺激指数：用于评价结论中，材料对组织刺激程度的分级。如为负值记为“0”。																					
ª检查植入物数量：组织学评价记分代表该动物所在检查的植入物总数的平均记分。																					

表A4 材料对组织刺激程度分级

刺激指数	材料刺激程度分级
0.0~2.9	无刺激或极轻微刺激
3.0~8.9	轻度刺激
9.0~15.0	中度刺激
≥15.1	重度刺激

根据表 A4, 做出评价结论。

参考文献

- [1] GB/T 13810-2017 外科植入物用钛及钛合金加工材
- [2] ISO 10993-6: 2016 Biological evaluation of medical devices Part 6: Tests for local effects after implantation
- [3] ASTM F1983, Standard Practice for Assessment of Compatibility of Absorbable/Resorbable Biomaterials for Implant Applications
- [4] MHLW Notification, Principles for Biological Safety Evaluation of Medical Devices: IYAKUSHIN No.0213001 (2003.02.13)
- [5] Memorandum, Guidance for Specific Biological Tests relevant to the Principles issued by the MHLW Notification No.0213001 (2003.02.13): IRYOKIKI-SHINSA No.36 (2003.3.19)
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] RAHN, B.A., GERET, V., CAPAUL, C., LARDI, M. and SOLOTHURNMANN, B., Morphometric Evaluation of Tissue Reaction to Implants Using Low Cost Digitizing Techniques, Clinical Applications of Biomaterials, A.J.C. Lee, T. Albrektsson and P.-I. Branemark (eds), John Wiley & Sons Ltd., 1982
- [9] WALLIN, R.F. and UPMAN, P.J., Evaluating Biological Effects, Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, D.L. Wise et. al (eds), Part A, Vol 1, Ch 12, 1995, p. 422
- [10] ZOFFERATO, S., SAVARINO, L., STEA, S. and TARABUSI, C., Result of Histological Grading on 100 cases of Hip Prosthesis Failure, Biomaterials, 9, 1988, pp. 314-318
- [11] COHEN, J., Assay of Foreign-Body Reaction, Journal of Bone and Joint Surgery, 41A, 1959pp. 152-166
- [12] YY/T 1576-2017 组织工程医疗器械产品 可吸收生物材料植入试验
- [13] YY/T 1575-2017 组织工程医疗器械产品 修复和替代骨组织植入物骨形成活性的体内评价指南
- [14] YY/T0511 多孔生物陶瓷体内降解和成骨性能评价试验方法