

行政院原子能委員會  
委託研究計畫研究報告

醫療用骨材臨床前生物試驗之應用研究  
**Application study of pre-clinical biological testing for orthopedic  
biomaterials**

計畫編號：1002001INER083

受委託機關(構)：國立台北科技大學

計畫主持人：方旭偉 教授

聯絡電話：02-2771-2171 Ext.2521

E-mail address：hwfang@ntut.edu.tw

核研所聯絡人員：伍德馨 博士、蔡寧真

報告日期：100 年 11 月 30 日

## 目 錄

目 錄 .....	I
中文摘要 .....	1
ABSTRACT .....	3
壹、計畫緣起與目的 .....	4
一、計畫緣起 .....	4
二、計畫目的 .....	10
貳、研究方法與過程 .....	11
一、細胞毒性測試： .....	11
二、細胞貼附試驗 .....	12
三、內毒素試驗 .....	13
四、協助建立動物實驗模式 .....	14
參、主要發現與結論 .....	25
一、實驗結果 .....	25
(一)細胞毒性測試 .....	25
(二)細胞貼附測試 .....	27
二、結論 .....	29
肆、參考文獻 .....	31

## 中文摘要

近年來國內天然、人為造成之工安事故等意外益增，常造成傷患嚴重骨缺陷、骨折、斷裂或骨髓炎造成鄰近關節攣縮和急性骨髓炎等傷害，本計畫將選用具有良好生物相容性材料混合加工製程之複合骨材，同時作其生物體外適應性測試及活體相關試驗，探討複合骨材應用其標準動物實驗模式及活體內之藥理反應等。本研究材料之來源包含以有感溫性單體 N-異丙基丙烯醯胺(N-isopropyl acrylamine, NIPAAm)、丙烯酸(Acrylic acid, AAC)以及交聯劑 N, N'-亞甲基雙丙烯醯胺(N, N-methylene bisacrylamide, NMBA)製作而成之高強度及低摩擦水膠以及可作為重建骨缺損材料之生物可吸收的生物載體新式的醫療用複合骨材。所採用實驗方法為將已合成之醫療用複合骨材進行細胞毒性、細胞貼附實驗以及熱原試驗。本研究使用 MTT assay 與 LDH assay 方法針對三種合成不同形式之醫療用複合骨材進行細胞毒性評估，實驗結果顯示出三種型式的複合骨材皆具有低細胞毒性與良好的生物相容性。在細胞貼附實驗部分，利用 MTT 與 LDH assay 進行細胞貼附材料表面生長情況評估。MTT assay 實驗結果顯示由於細胞於材料表面生長情形與在培養盤中生長有所差異，所以細胞於材料表面存活率不高。使用 LDH assay 測試細胞毒性(cell cytotoxicity)，實驗結果顯示材料依然具有良好的生物相容性且具有低細胞毒性。透過符合醫療器材管理風險評估

ISO-14971 精神規範，本研究最終建立合宜的新型醫療用骨材材料  
開發上市流程。

## **Abstract**

With the increasing need of biomedical implants for orthopedic diseases, the orthopedic biomaterials become the focused items in biotechnology industry. The purpose of this project is to carry out the related experiments to evaluate the biological responses of the testing orthopedic biomaterials. We are going to perform the biocompatibility tests for a composite bone graft material made of N-isopropyl acrylamine, N,N-methylene bisacrylamide, and acrylic acid. It is attempted to apply this hydrogel with high strength and low friction characteristics for bone re-construction. To analyze the effect of cytotoxicity tests with three types composite bone graft material on L929 cell line for comparison, MTT and LDH assay of composite bone graft material extracts was used to treat on L929 cells and measured with OD570 and OD340 three days. The OD570 indicated good cell viability which up to 85% of control by MTT assay. The composite bone graft material also shows low cell toxicity according to results of LDH assay. By applying the ISO-14971 based risk assessment procedures, it is expected to develop an appropriate testing procedure for new developed orthopedic biomaterials.

## 壹、計畫緣起與目的

### 一、計畫緣起

配合政府將高價值生物和生醫技術工業納入國內經濟發展重點項目，而「兩兆雙星」產業計劃亦將生醫產業列為積極推動要項，因應使經濟發展之重點，且近年來國內天然、人為造成之工安事故等意外益增，常造成傷患嚴重骨缺陷、骨折、斷裂或骨髓炎造成鄰近關節攣縮和急性骨髓炎等傷害因而痛苦。炎等傷害因而痛苦，本計劃將選用具有良好生物相容性材料混合加工製程之複合骨材。同時作其生物體外適應性測試及活體相關試驗，探討複合骨材應用其標準動物實驗模式及活體內之藥理反應等。

骨缺損的癒合需靠兩端的骨組織新生堆疊而結合，臨床上對於骨折之處理，可藉由骨釘骨板等醫療器材提供骨固定（bone fixation）不僅可以提供缺損處力學的支持，也可以幫助骨缺損間距在臨界缺損（critical defect）以內直接癒合（direct bone healing）。而當骨缺損間距過大時，則須使用間接癒合（indirect bone healing）方式進行修復。首先形成將整個血腫患部包圍，待新生血管長出後，再逕行刺激骨組織再生並使深入缺損區域。由臨床經驗告知當骨缺損之間距拉大後，其間接性骨癒合的能力則相對的下降許多。此時便需要進行骨移植手術以輔助間接骨癒合的進行。所以具可塑性（shapeable）或可注射式（injectable）之骨填補材，不僅具操作便利性，更能迅速且密合地置入無特定形狀之骨缺損區域、減少可能之傷口的感染及疤痕的產生，降低病患的疼痛不適。

在市場分析與現況方面，生物可吸收高分子材料具有生物分解性（Biodegradable）與生物吸收性（Biobsoorbable）及生物相容

性 (Biocompatible) 之特性，基於此特性，生物吸收性材料在醫療用途上佔有相當重要的地位，先進國家均投入大量資源進行學術研究與產品開發。目前全世界生醫材料的產值已超過 40 億美金，依據英國 DRA 統計醫療用骨材之總產值已超過 120 億美金。綜合國內外醫療材料產品發展趨勢之演變，與隨著國人經濟收入的逐年增加，生活品質的快速提昇，對醫療品質日益的重視，未來對生物高分子材料產品及其需求勢必大幅成長。

各國法規針對醫療器材管理尤其是植入式醫材管理辦法對於安全性的考量相當嚴謹。不但在人體適用性上，要做到不引起毒性，不過敏，且所使用的材料一定要能抗菌、滅菌、乃至於生物可分解，其製品更要低單價才能符合醫院經營上的考量。本計畫擬針對醫療用骨材，同時參考 ISO 以及臨床前試驗規範等，設計一套標準生物相容性檢測流程，在實驗進行同時，收集大量實驗數據作為本研究之醫療用骨材進行系統化體外生物適應性評估之依據。



#### 醫療器材法規檢測規範

生物相容性測試：ISO10993

功能性檢測

風險控管標準：ISO14971

品質系統建立：ISO13485

本研究材料之來源包含以感溫性單體 N-異丙基丙烯醯胺 (N-isopropyl acrylamine, NIPAAm)、丙烯酸(Acrylic acid, AAC)以及交聯劑 N,N'-亞甲基雙丙烯醯胺(N,N-mathylene bisacrylamide, NMBA)製作而成之高強度及低摩擦水膠以及可作為重建骨缺損材料富含血小板膠之生物可吸收的生物載體新式的醫療用複合骨材。目前研究水膠所面臨的挑戰為提供足夠強度之水膠應用於脊椎骨、關節軟骨、肌腱與韌帶等結締組織上。利用水膠取代以上之組織，於活體內外必須具備極低的表面摩擦及磨耗性，適當的彈性模數與高機械強度，例如，含有 70%水分的關節軟骨在數百 MPa 及一百萬次循環應力作用下呈現非常低的磨耗係數。但是目前以天然及合成材料製備的水膠都不具備合乎關節軟骨置換所需要的機械強度，目前研究水膠普遍的機械強度均在  $10^{-2}$ ~ $10^{-1}$  MPa 之間，仍不足以應用於脊椎骨、關節軟骨、肌腱與韌帶等組織上，本研究團隊過去已成功研發出具有高機械強度以及彈塑性質的醫療用骨填補材料，將會是很適合取代脊椎骨、關節軟骨等組織的組織工程材料。

一般常用的骨移植的來源主要有三個：自體、異體、異種的骨填補物，但臨床使用上各有其風險。

**自體骨移植**：感染風險最低、骨融合情況最佳的方式，但是為了取得自體骨，需要再進行手術，而且取走部份的骨頭可能會造成骨頭的應力改變，甚是造成骨折，而且無法取得大量的骨組織。同時自體骨的吸收常是不可預期(un-predictable resorption)

**異體移植**：來自於他人捐贈的骨頭，一般保存在骨銀行中，可一次取得較大量的骨組織，但是，即使組織已經過病毒篩檢、



降低抗原反應，仍是有感染藉血液傳播的疾病之風險，如：肝炎、愛滋病、梅毒…等等。

**異種移植**：來自動物的骨頭，大多為牛或豬，在經過特殊的處理後用來植入骨缺損中，但是其引起的免疫反應較前兩者大，而且也可能被傳染人畜共通疾病。

為降低施行手術的風險，避免免疫感染等問題，目前有許多組織工程的研究將注意力轉移到含有骨整合性植體(osseointegrated implants)的開發上，並且目前已有許多研究結果發表。

引導骨組織再生(Guided bone regeneration, GBR)就是利用具骨引導或是骨誘導的材料來幫助骨缺損的修補。而理想的骨填補材料而言需要具備下列要素：(1)生物相容性(compatibility)，材料在植入後必須要和植入處的組織共存而不引發免疫反應。(2)骨誘導性(osteoinductive)，可促進骨性組織分化及增生的生長激素的分泌。(3)骨引導性(osteoconductive)，填補材料的結構如：孔洞大小(pore size)、孔洞率(porosity)、機械強度以及生物降解性(biodegradability)。目前臨床常使用之骨傳導基質(osteoconductive scaffold)成份係混合 60%的 hydroxyapatite 及 40% Tricalcium phosphate，由於缺乏骨誘導能力(osteinduction) 所以骨質新生之能力有限，僅限於 implant 之邊緣。所以具可塑性 (malleable) 或可注射式 (injectable) 之骨填補材，不僅具操作便利性，更能迅速且密合地置入無特定形狀之骨缺損區域、減少可能之傷口的感染及疤痕的產生，降低病患的疼痛不適。

目前在市售之具可塑性骨填補材商品中，產品上採用海綿狀脫鈣骨基質 (demineralized bone matrix, DBM) 之異體骨以不同載

體 (carrier) 混合黏接，形成具有可塑性之凝膠(gel)或黏土 (putty) 狀之骨填補材，如 Dynagraft® (GenSci) 採用 PF-127 (Pluronic®) 為載體製成黏土狀、Osteofil® SoloCervical Allograft (Regeneration Technologies) 則是以膠原蛋白 (collagen) 為載體、Grafton® (Osteotech) 則採用丙三醇 (glycerol) 為載體，以增加黏稠度之方式賦予產品良好之可塑性。另一方面亦可使用磷酸鈣鹽類粉體與磷酸溶液混合後，形成具有可注射性 (injectable) 而且在 37°C 時可因水合作用產生自我硬化 (self-setting) 之磷酸鈣骨水泥 (calcium phosphate cement, CPC)，市售商品包括 BoneSource® (Stryker Leibinger)、 $\alpha$ -BSM® (Etex)，與 Norian® SRS® (Skeletal Repair System) (Synthes) 等，然而上述產品雖操作便利，但在固化時間與機械物性方面仍有改善空間，同時這些產品均無骨誘導能力 (osteoinductive potential)。

關於誘導骨質新生因子之研究，其中最為廣泛討論的是骨生長激素 (Bone Morphogenetic Protein; BMP)。但在臨床的使用上，BMP 的使用仍有許多限制，例如用量，可能之副作用，仍有許多不確定之因素，同時價格昂貴，所以臨床使用之文獻極為有限，美國 FDA 也不再允許臨床使用。長久以來，我們都知道當組織受傷後，血小板會聚集於血管受損之位置形成 platelet aggregate，發揮止血之功能，但近年來的研究發現血小板細胞質內之  $\alpha$  顆粒，儲存有許多生長因子如 Platelet derived growth factor (PDGF)，Transforming growth factor (TGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF) 以及 Epidermal growth factor (EGF)。而間葉幹細胞的細胞膜上有這些生長因子的接收體 (receptor) 當這些生長因子與細胞膜上的接受體結合後，會誘導間葉幹細胞成為骨先驅細胞

(osteogenic precursor cell) 產生類骨質(osteoid)。Weibrich G. et al. 2002 年以類成骨細胞進行體外測試，針對不同濃度的血小板膠會刺激類成骨細胞生長，從而推論於體內試驗終將會影響成骨新生速度[9]。臨床上也有使用在病患局部口腔手術中協助組織受損癒合的研究。

本研究團隊經產學合作，與國內美瑞世生物科技公司及法國 Human plasma product services 合作研發製成可以製作凝血酶之 thrombin generation device (TGD)，此一裝置已經衛生署許可上市(許可証字號:衛署醫器製字第 000988 號)。在 93 年及 94 年國科會的計劃中我們已經能成功的自製血小板膠，並使用於大白兔及臨床病患修補顱骨缺損，結果証實骨質新生程度相當理想。人體實驗論文[Cranioplasty using osteoconductive scaffold and platelet glue] 已於 2008 年為 Journal of Trauma 接受刊登。95 年國科會計劃中，我們將此生物醫材應用於大白鼠眼眶底骨折之修補，結果証實生物適應性骨質新生程度相當理想。因此自 96 年開始，本研究小組向國科申請連續性三年之研究用於臨床眼眶底部粉碎性骨折病患之修復，臨床實驗已於 99 年 7 月結束。

本計畫選用以感溫性單體 N-異丙基丙烯醯胺(N-isopropyl acrylamine, NIPAAm)、丙烯酸(Acrylic acid, AAC)以及交聯劑 N, N'-亞甲基雙丙烯醯胺(N, N-methylene bisacrylamide, NMBA)，成功製備高強度奈米複合水膠支架。此支架具備良好的孔洞聯結性，利於細胞營養物之流通；含水率 85%，利於搭載生長因子；壓縮強度高達 42 MPa，細胞在培養的過程中，仍可維持支架結構的完整性，因此非常適合做為培養骨細胞及攜帶血小板膠之支

架。前期於三總團隊實驗中已證明於眼窩骨骼修復去有良好效果，材料材質柔軟及可塑性高，本身具有優秀的骨傳導性質，具有促進骨癒合效果以及空間維持的效能，幫助骨缺損部位組織修復癒合。

為完整高值化醫療奈米複合骨材臨床前試驗評估，協助國內臨床醫療應用技術發展，本計畫透過符合醫療器材管理風險評估 ISO-14971 精神規範，建立合宜的新型醫療用骨材材料開發上市流程。未來研究則希望透過累積的經驗數據，應用於臨床應用導向活體動物試驗設計，統計高單價醫用奈米複合骨材植入動物實驗情形，配合顯微放設攝影機造影及組織切片等技術，逐次評估附合生醫成品新生骨形成面積、礦物質沉積狀況…等骨組織型態評估。

## 二、計畫目的

本研究應用新型醫療奈米複合骨材混合血小板膠於臨床前試驗提供生物相容性檢測與體內植入物內毒素檢測分析技術。可細分為以下三點工作說明。

1. 建立已合成之醫療用複合骨材之細胞毒性和細胞貼附主要實驗及結果，以作其生物體外適應性評估。
2. 共同建立此醫療用骨材之標準植入較大型動物實驗模式，逐次評估其生物體內安全性。
3. 逐步依序建置醫療用骨材之內毒素試驗標準模式及技術。

## 貳、研究方法與過程

### 一、細胞毒性測試：

依細胞幾何型態實驗觀察、體外細胞毒性測試以及纖維母細胞於水膠表面之培養等方式評估醫療用複合骨材細胞毒性測試。

#### 1.細胞活性測試 (MTT assay)

3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氫唑溴鹽 (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)，簡稱 MTT，為黃色水溶性固體，可被活細胞粒線體中之去氫 (mitochondrial succinate dehydrogenases) 代謝還原產生紫色的沉澱物 formazan。因僅有活細胞內才存在具活性之粒線體酵素，故可藉助測定 formazan 產量的多寡來評估細胞之存活率。其步驟簡述如下：將待測活性之細胞樣本中的培養液吸除後，以 PBS 沖洗數次。加入 1 mL 含 MTT 之新鮮培養液 (0.5 mg MTT/mL)，並置於 37°C 之培養箱內反應三個小時。

移除未反應含有 MTT 之培養液後，添加 500  $\mu$ L DMSO，使用 vortex 震盪至紫色 formazan 顆粒完成溶解為止。取 200  $\mu$ L 溶有 formazan 之 DMSO 於酵素免疫分析儀 (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) 下，於波長 570 nm 下測量其吸光值，參考波長為 650 nm。

#### 2. 乳酸去氫酶 (Lactate dehydrogenase: LDH) 測試：

研究使用 Sigma 公司所生產之試劑組 (LDH-228-20; St Louis, US) [Bowers and McComb, 1966]，分析不同反應時間下收集的細胞培養液。利用乳酸去氫酶將乳酸 (Lactate) 氧化成丙酮酸 (Pyruvate) 和 NADH (Reduced Nicotinamide Adenine

Dinucleotide)的一種催化過程。當 NADH 生成時，在波長 340nm 下為最大吸光值，所測得的吸光值愈大表示乳酸去氫酶活性愈高。此試劑之成份包括 Lactate 50 mmol/L，NAD 7 mmol/L，Buffer pH=8.9，其中 NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)是作為此酵素反應中的氫離子接受器。總反應時間為 4.5 分鐘，而實際測試的反應時間為 3 分鐘，溫度設定為 37°C(因不同的溫度有其不同的反應係數)，以公式換算求得

真正的 LDH 活性濃度值，公式如下：

$$\text{LDH (U/L)} = \Delta A \text{ per min} * \text{TV} * 1000 / 6.22 * \text{SV} * \text{LP}$$

$\Delta A \text{ per min}$  = change in absorbance per minute at 340nm

TV = total volume (1.05 mL)

1000 = conversion of units per mL to units per liter

6.22 = milimolar absorptivity of NAD at 340nm

SV = sample volume (0.05 mL)

LP = light path (1 cm)

$$\text{LDH (U/L)} = \Delta A \text{ per min} * 1.05 * 1000 / 6.22 * 0.05 = \Delta A \text{ per min} * 3376$$

## 二、細胞貼附試驗

### 1.材料表面細胞貼附試驗

- (1)將薄膜以酒精滅菌後，置於無菌操作臺靜置乾燥。
- (2)將這些薄膜置於 24-well 中。
- (3)在每一 well 中注入  $5 \times 10^4$  個纖維母細胞株，為細胞貼附測試的起始個數。將此 24-well 培養皿放入培養箱，設定溫度為 37°C 及 5% CO<sub>2</sub>。24 小時後觀察細胞的生長情況，且選取三個 well 計數貼附在對照組 polystyrene(PS)

上的細胞個數，以此數目當作材料放入前 PS 表面細胞貼附個數。將薄膜放入每一 well 中，使薄膜平貼於 PS 表面上的細胞，放入培養箱，設定溫度為 37°C 及 5%CO<sub>2</sub>。

(4)分別在 12 小時、48 小時及 96 小時，以 0.3 ml 的 trypsin-EDTA 將細胞株打下來，再以 0.2 ml 的 PBS 溶液沖洗，收集成 0.5 ml 的細胞溶液。

(5)將細胞懸浮液以 trypan blue 染色後，利用位相差顯微鏡細胞計數纖維母細胞的個數。

(6)記錄纖維母細胞的貼附與生長個數，並用位相差顯微鏡拍下纖維母細胞在材料上的貼附及生長狀態。

## 2. 亞甲藍(Methylene blue)染色觀察

### (1)藥品配製

a. 亞甲藍溶液：稱取 0.02 克的 Methylene blue dihydrate 及 0.1 克的 Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>，加入 10 ml 的去離子水中。

### (2)實驗步驟

a.將 sample 以 PBS 清洗三次後，以 4% paraformaldehyde 溶液作細胞固定，室溫下反應 20 min。

b.PBS 清洗三次，2 min/次。

c.去離子水清洗三次，2 min/次。

d.加入亞甲藍染劑約 5 sec 後，以去離子水進行退染。

e.以位相差顯微鏡進行觀察。

## 三、內毒素試驗

依照中華藥典第六版附錄之”細胞內毒素檢驗法”進行測試。

本法係利用 *Limulus polyphemus* 之循環阿米巴變形細胞(circulating amebocyte)水性抽提液製成 LAL(Limulus Amebocyte Lysate) 試劑，與細菌內毒素結合可形成凝膠之特性，以已知濃度內毒素標準品稀釋液及檢品所作稀釋液，與已知效價之 LAL 試劑同時作用相比對，以測定檢品內所含細菌內毒素量之方法。內毒素是由格蘭氏陰性菌所產生的物質，易引發人體的過敏反應與發炎反應。本研究將依上述標準逐步建立以 LAL 分析來測試醫療用骨材之內毒素試驗模式，及先期技術。



#### 四、協助建立動物實驗模式

1. 本計畫動物實驗模式建立採用之研究方法與執行步驟：

##### (1)水膠製作

由原能所生醫材料研究團隊負責製造生產，該研究團隊已於 99 年原子能科技研究計劃中已能成功製成孔洞性水膠。

##### (2)血小板膠製作

由三軍總醫院整形外科陳天牧教授負責，在過去數年的國



科會研究計劃中，研究團隊已能自製血小板膠，其生物安全性也已獲臨床實驗証實。實驗操作前抽取患者 20~60 cc 的血液，經離心機器血球細胞分離機(Sepax cell separation system,衛署醫器輸字第 01749 號)分離出高濃度的血小板濃厚血漿(PRP)，與 thrombin 以體積 1:1 進行混合製成血小板膠使用。人造 thrombin 係以血漿與 10% CaCl<sub>2</sub> 混合，注入國內自行研發生產之 thrombin generation device (TGD)，搖晃 30 秒後，靜置 30 分鐘，再以空針取出應用。

### (3)水膠與血小板膠複合材料製作

由三軍總醫院整形外科陳天牧教授負責，於動物實驗前將水膠材料與血小板膠充分混合後植入受測動物，並進行縫合。

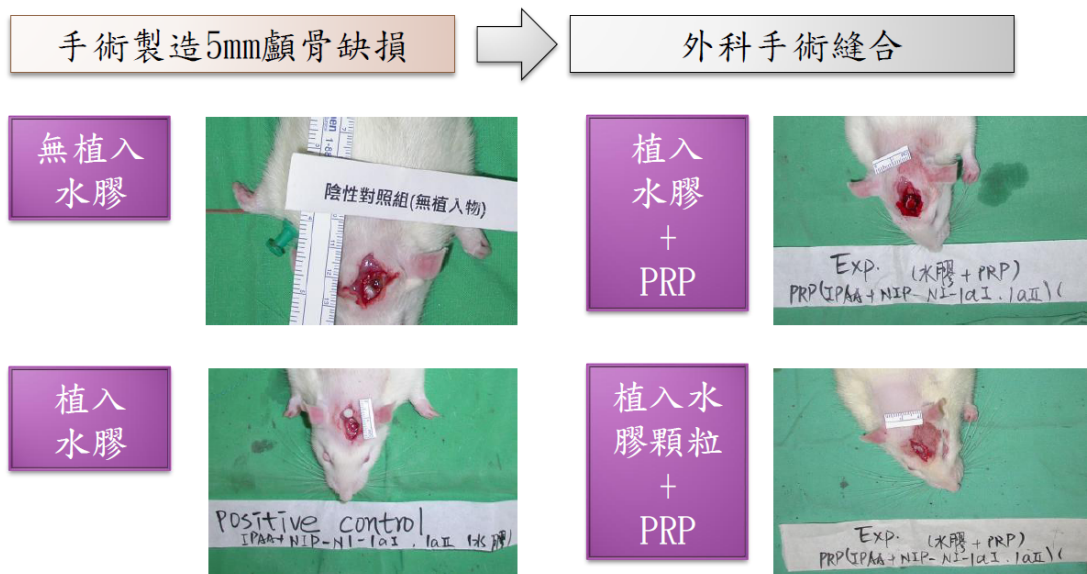
(4)動物實驗以大鼠顱骨植入複合植體觀察骨缺損成骨狀況做為動物模式，動物分組如下

(a)實驗\_1 組(4 隻大白鼠)將植入孔洞性水膠混合血小板膠，

(b)實驗\_2 組(4 隻大白鼠)將植入孔洞性水膠(粉狀)混合血小板膠，

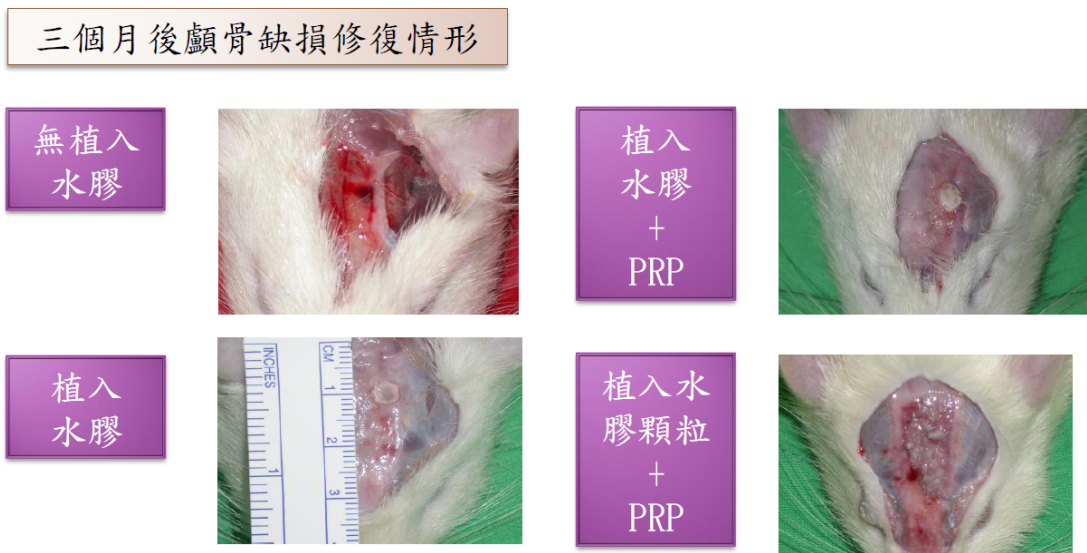
(c)陽性對照組(4 隻大白鼠)將僅植入孔洞性水膠，

(d)陰性對照組(4 隻大白鼠)將不植入任何物質。



(5)手術三個月後將犧牲動物，將植入物及周圍 2-4mm 取出，評估方法包括：

(a)巨觀檢查:觀察正常部位和植入的生醫複合物之間骨缺損修復的癒合及組織發炎反應狀況。



(b)顯微放射攝影(評估植入之生醫物質吸收，新生骨形成及礦物質沈積)，鼻竇標本經 70% 酒精固定二天後，經 Villanueva 骨染色劑染色約三週後，以不同濃度酒精脫水，再

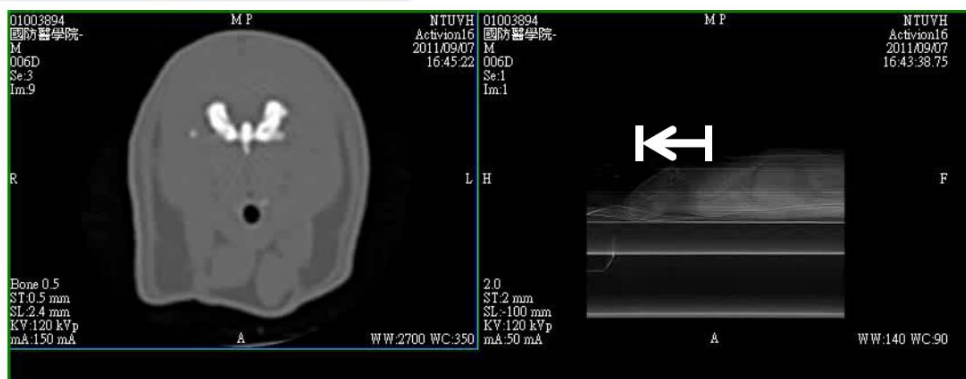
以丙酮脫蠟，然後再放入甲基複合樹脂液中，每日抽氣並加入新的 monomer，共抽氣一週，最後進入包埋。標本用電動鋸片機進行鋸片後，先進行顯微放射攝影術，後將標本磨成約 20-30  $\mu\text{m}$  之標本片，再利用 Leica DMLB 螢光顯微鏡配合硬組織影像分析專用軟體 osteomeasure 進行骨組織形態學評估。以顯微放射攝影儀 (Ohmic OM-603, Tokyo) 照射，並以高相差 X 光底片顯影 (high contrast X-ray film at 28 KV, 3 MA, for 40s)。由此可分析出植入的生醫複合物是否被吸收以及新生骨形成及礦物化沉積情形

(c)骨組織形態學評估 (包括新生骨面積，單位面積造骨細胞及破骨細胞數目，單位面積造骨細胞及破骨細胞數目，骨小樑平均厚度，礦物質沈積狀態)。骨組織形態學評估主要包括有以下幾項動態和靜態參數:新生骨面積，單位面積造骨細胞及破骨細胞數目，骨小樑平均厚度，礦物質沈積狀態。

犧牲前Micro-CT造影



Micro-CT造影掃描情形



(d)病理切片標本製作

將動物犧牲後，以手術器具取下觀察部位進行標本製作，以福馬林溶液將標本浸泡一周後，進行脫鈣，以石蠟包埋法將組織包埋，並取標本切片進行 H&E stain 染色觀察骨缺損部位修復情形。

(i)標本照片

植入水膠\_1





植入水膠\_2



植入水膠\_3





植入水膠\_4



PRP 製作





植入水膠+PRP\_1



植入水膠+PRP\_2





植入水膠+PRP\_3



植入水膠+PRP\_4





植入水膠(粉)+PRP\_1



植入水膠(粉)+PRP\_2





### 植入水膠(粉)+PRP\_3



以上各組標本情況看來，植入體內三個月之後進行觀察發現，水膠無降解現象，或是降解的數量很少，肉眼無法分辨。水膠植入大鼠體內後，並無引發大鼠傷口感染或是死亡的現象，顯示水膠材料具有生物相容特性。部分水膠植入骨缺損部位有將水膠頂起來的現象，顯示骨缺損癒合速度與水膠降解速度差異過大，骨缺損癒合快，水膠降解速度慢。但大多數標本材料與骨缺損部位密合度良好，以肉眼巨觀觀察並無水膠位移的現象。

## 參、主要發現與結論

### 一、實驗結果

#### (一)細胞毒性測試

使用 MTT assay 分析細胞活性(OD<sub>570</sub>)，LDH assay(OD<sub>490</sub>)分析細胞毒性，來評估水膠材料毒性。實驗步驟如下：

1. 接種細胞：用含 10%FBS 培養基配成細胞懸浮液，以每 well 10<sup>4</sup> 個細胞接種到 96 well，每 well 體積 200  $\mu$ l。

2. 培養細胞：於細胞貼壁後，依 L929 細胞株培養條件，將材料萃取液混和培養基進行培養 24 小時，之後進行第一次觀察，之後每隔 24 小時觀察一次，總共觀察三天。

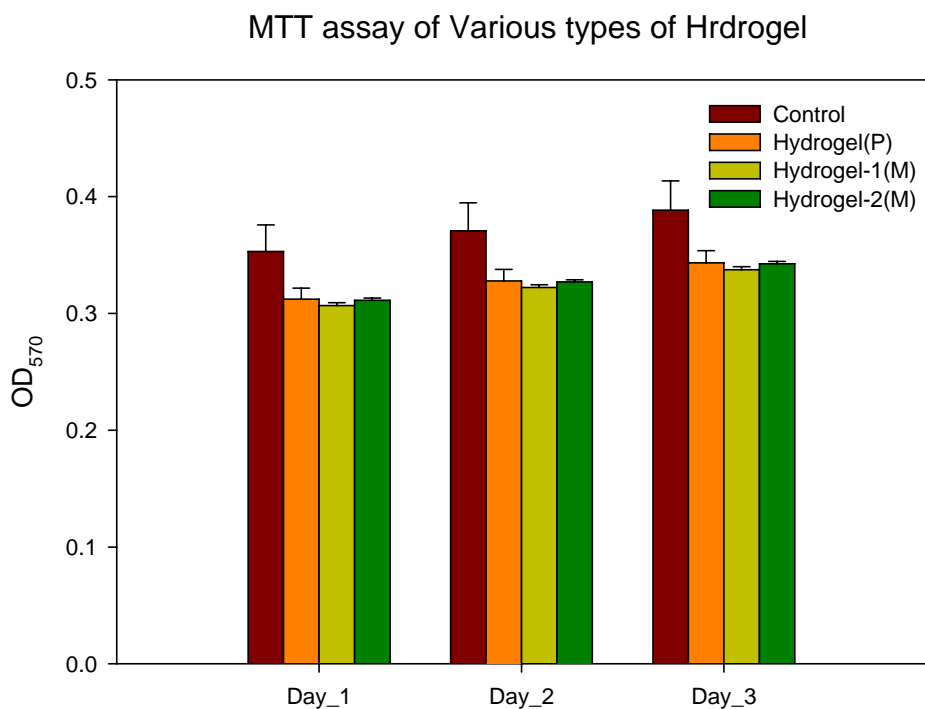
3. 呈色：培養細胞，每孔加 MTT 溶液 (5mg/ml 用 PBS <ph=7.4>配)20  $\mu$ l。繼續反應 3 小時後，停止反應，小心移除孔內培養上清液。每孔加 150  $\mu$ l DMSO，振蕩 10 分鐘，使結晶物充分融解。

4：比色：選擇 570nm 波長，在 ELSA reader 上測定各孔光吸收值，記錄結果。

以下為各組材料編號

材料型態	原能所編號	材料實驗編號
水膠粉狀	100.06(99)-LAL-PAA-NIP+N1-I 粉	Hydrogel(P)
水膠塊狀	100.04(03)-IPAA+NIP-N1-111(-a)	Hydrogel-1(M)
水膠塊狀	PNI(PA)+N1-A11(S)-LAL	Hydrogel-2(M)

## 1. MTT assay 實驗結果

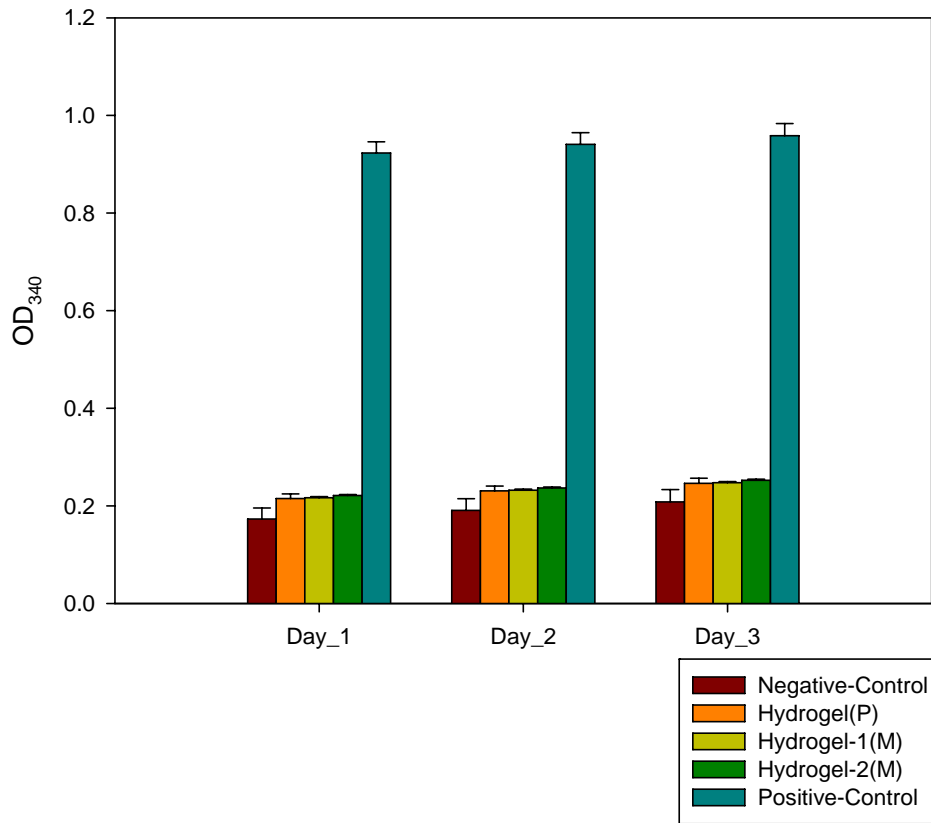


使用 MTT assay 測試細胞存活率(cell viability)，L929 細胞株與材料萃取液共同培養 3 個小時後(Day\_1)進行波長 570nm 吸光值量測，並且在共同培養 24 小時(Day\_2)、48 小時(Day\_3)分別量測 OD<sub>570</sub> 吸光值。實驗結果顯示材料具有良好的生物相容性，細胞存活率皆有 85%以上。

## 2. LDH assay 實驗結果

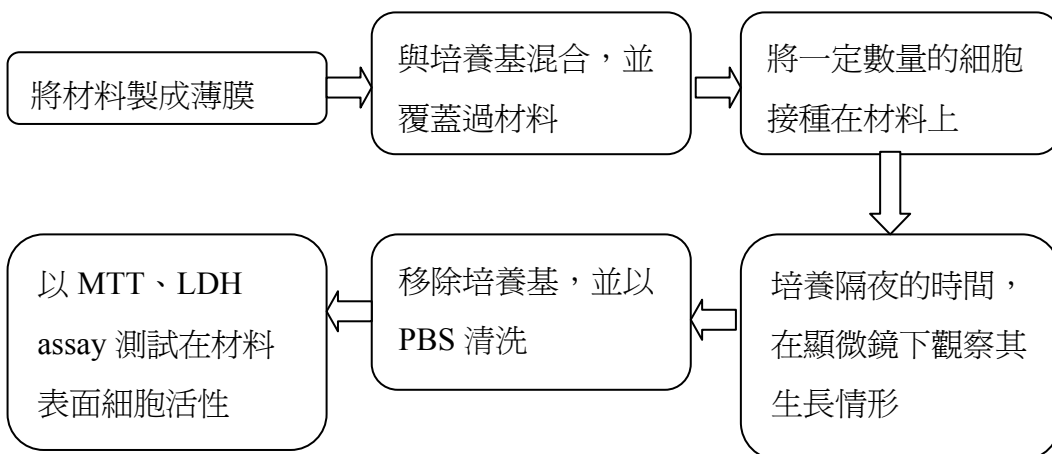
使用 LDH assay 測試細胞毒性(cell cytotoxicity)，L929 細胞株與材料萃取液共同培養 3 個小時後(Day\_1)進行波長 340nm 吸光值量測，並且在共同培養 24 小時(Day\_2)、48 小時(Day\_3)分別量測 OD<sub>570</sub> 吸光值。實驗結果顯示材料具有良好的生物相容性且具有低細胞毒性。

LDH assay of Various types of Hrdogel

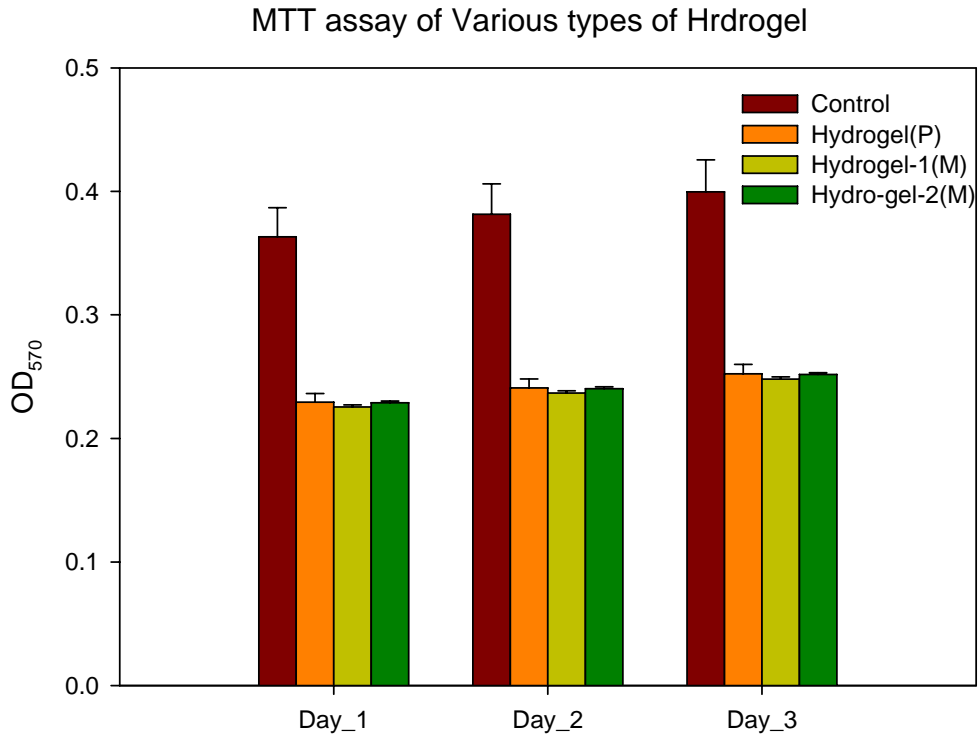


(二)細胞貼附測試

由於材料為塊狀不透光彈性體，所以將細胞貼附其上後，難以光學顯微鏡直接觀察，故於細胞貼附於材料表面後，移除多餘細胞，使用 MTT assay 與 LDH assay 分析貼附其上的細胞活性。

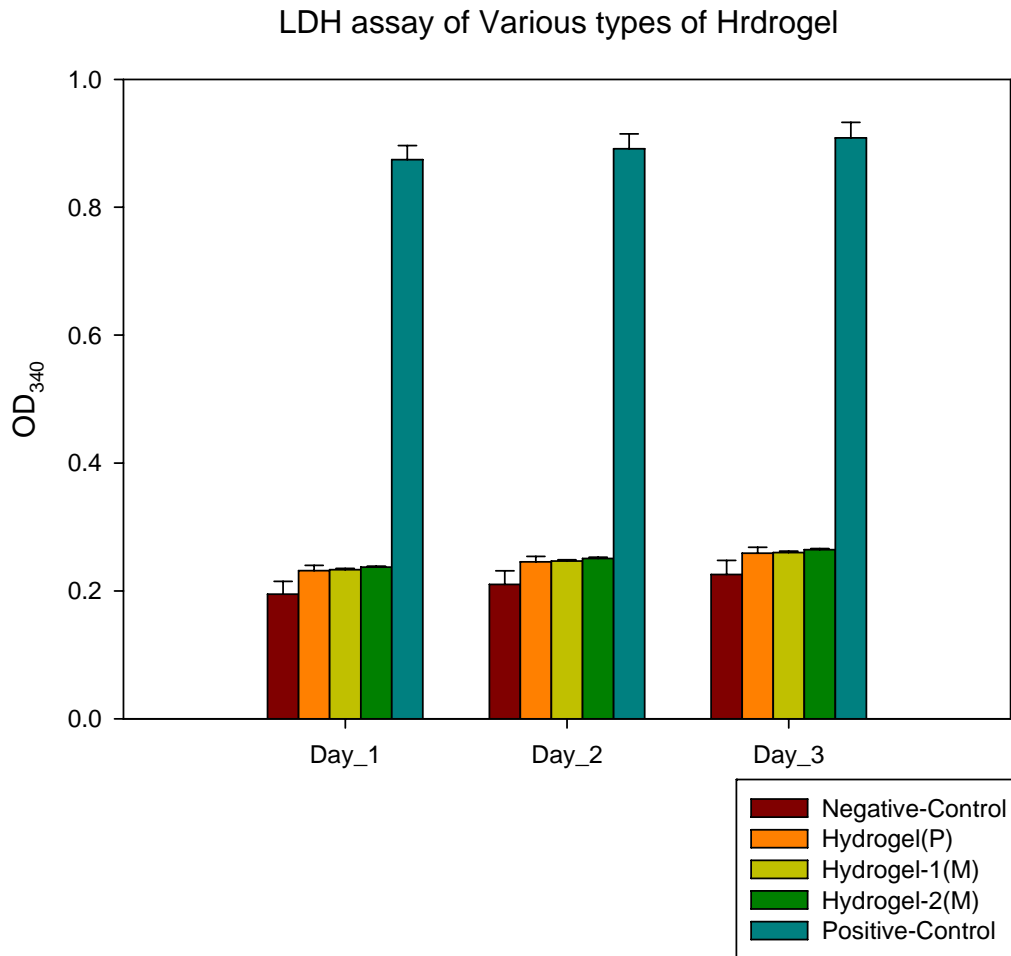


## . MTT assay 實驗結果



使用 MTT assay 測試細胞存活率(cell viability)，L929 細胞株於材料表面貼附(overnight)後，共同培養 3 個小時後(Day\_1)進行波長 570nm 吸光值量測，並且在共同培養 24 小時(Day\_2)、48 小時(Day\_3)分別量測 OD<sub>570</sub> 吸光值。實驗結果顯示由於細胞於材料表面生長情形與在培養盤中生長有所差異，所以細胞於材料表面存活率不高。

## 2. LDH assay 實驗結果



使用 LDH assay 測試細胞毒性(cell cytotoxicity)，L929 細胞株於材料表面貼附(overnight)後，共同培養 3 個小時後(Day\_1)進行波長 340nm 吸光值量測，並且在共同培養 24 小時(Day\_2)、48 小時(Day\_3)分別量測  $OD_{340}$  吸光值。實驗結果顯示材料具有良好的生物相容性且具有低細胞毒性。

### 二、結論

本研究新型生醫材料為以感溫性單體 N-異丙基丙烯醯胺(N-isopropyl acrylamine, NIPAAm)、丙烯酸(Acrylic acid, AAC)以及交聯劑 N,N'-亞甲基雙丙烯醯胺(N,N-mathylene

bisacrylamide, NMBA) 製作而成之高強度及低摩擦水膠之生物可吸收的生物載體新式的醫療用複合骨材。本次研究試著將材料製作成為三種型式，分別為粉狀水膠、彈性塊材、具彈塑性塊狀水膠，並透過符合醫療器材管理風險評估 ISO-14971 精神規範，已成功建立合宜的新型醫療用骨材材料開發流程。

在水膠材料進行體外試驗部分，先進行水膠材料細胞毒性評估，以 MTT assay 量測水膠材料對於細胞存活率的影響，實驗結果發現水膠的生物相容性良好，細胞存活率皆在 85% 以上。以 LDH assay 量測水膠材料對於細胞毒性的影響，實驗結果發現水膠材料的細胞毒性低，顯示其生物相容性良好。

接著進行細胞與材料表面貼覆試驗，目的在於量測細胞與材料表面貼附親和性，由於材料本身為立體結構，且不具透光性，故於光學顯微鏡下並無法判斷。故本研究利用 MTT 與 LDH assay 進行細胞貼附材料表面生長情況評估。使用 MTT assay 測試細胞存活率 (cell viability)，L929 細胞株於材料表面貼附 (overnight) 後，共同培養 3 個小時後 (Day\_1) 進行波長 570nm 吸光值量測，並且在共同培養 24 小時 (Day\_2)、48 小時 (Day\_3) 分別量測 OD570 吸光值。實驗結果顯示由於細胞於材料表面生長情形與在培養盤中生長有所差異，所以細胞於材料表面存活率不高。另一方面，使用 LDH assay 測試細胞毒性 (cell cytotoxicity)，L929 細胞株於材料表面貼附 (overnight) 後，共同培養 3 個小時後 (Day\_1) 進行波長 340nm 吸光值量測，並且在共同培養 24 小時 (Day\_2)、48 小時 (Day\_3) 分別量測 OD340 吸光值。實驗結果顯示材料依然具有良好的生物相容性且具有低細胞毒性。



#### 肆、參考文獻

- 1.Hsu-Wei Fang\*, “Trends and Challenges of Cartilage Tissue Engineering”, Biomedical Engineering
- 2.Chih-Hung Chang, Hsu-Wei Fang\*, Yi-Ching Ho, Chun-Yen Lin, Chun-Hsiung Huang, Charng-Bin Yang, “Combined effects of polyethylene wear particle size and dosage on macrophage responses “, Biomedical Engineering-Applications, Basis and Communications, 22(4), pp. 279-291, 2010.
3. Hsu-Wei Fang\*, Shiuh-Bin Fang, Jen-Shiu Chiang Chiau, Chun-Yan Yeung, Wai-Tao Chan, Chuen-Bin Jiang, Mei-Lien Cheng, Hung-Chang Lee, “Inhibitory effects of Lactobacillus casei rhamnosus on Salmonella lipopolysaccharide-induced inflammation and epithelial barrier dysfunction in a co-culture model using Caco-2/peripheral blood mononuclear cells”, Journal of Medical Microbiology, 5, pp. 573-579, 2010
4. Bacterial endotoxin test. Chapter 85, USP version 34.
5. Transfusion and infusion assemblies and similar Medical devices. Chapter 161, USP version 34.
6. Guideline on validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for human. animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services.