ƒ ‹ F | Œfia‹ ˙'e›ß• |–M^D‹ ª¤s›p e ƒ¤"G‡ł§i

¤ª˜ ––' °¥h⁄AæQ·X⁄B»E` /»E¤¯»˜⁄ ‰ƒƒb ⁄ † ´·ƒA¥˝⁄§¶}

o»P ‡¥ ¸‹ ª¤s

›p e^ §¡G §O«‹›p e

›p e‰ ¸s„¡GNSC93–2314–B–038–037–

ıƒ · ¶¡¡G93 ƒ~08⁄°01⁄ ƒ 94 ƒ~07⁄°31⁄Ø

ıƒ ‡ ƒ ¡G» O ¥´ ˙⁄j ˙⁄ œ ˙¤t

›p e¥ D œ⁄¡HG§ ı ‡·›

ƒ ƒP¥ D œ⁄¡HG… B ¤ ƒ t A•¤¥¿'

‡ł§i^ «‹¡G" °†‡ł§i

‡ B † zŁ¡fG¡¥»›p e¥ ł‰¶}‹ ¸d

⁄⁄ ¥` Œ 94 ƒ~10⁄°24⁄Ø

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ■ 成 果 報 告
□期中進度報告

具釋控性去乙醯幾丁聚醣/聚乳酸水膠在導引組織再生之開發與應用研究

計畫類別：■ 個別型計畫　□ 整合型計畫
計畫編號：NSC 93 － 2314 － B － 038 － 037 －
執行期間： 93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：李勝揚 教授
計畫參與人：楊正昌、詹進忠、李憲坤

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：■精簡報告 □完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：
□赴國外出差或研習心得報告一份
□赴大陸地區出差或研習心得報告一份
□出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
□國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢
□涉及專利或其他智慧財產權，□一年□二年後可公開查詢

執行單位：台北醫學大學/牙醫學研究所

中 華 民 國 94 年 10 月 24 日

具釋控性去乙醯幾丁聚醣/聚乳酸水膠在導引組織再生之開發與應用研究

李勝揚

台北醫學大學/口腔醫學院/牙醫學研究所

計畫期間：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

計畫編號：NSC 93-2314-B038-037-

中文摘要

將吸收性高分子結合組織導引再生術(Guided Tissue Regeneration, GTR)之觀念而應用到治療牙周病上，不僅具免除二次手術之優點，更在臨床醫療上證實新骨質之生成，然而在手術後為減少或舒緩發炎反應，往往需藉助抑菌漱口水或使用抗生素藥物，甚至在 GTR Barrier 產品中添加 Doxycycline，而具水溶性之抗生素在劑量設計時常不易兼顧安全性與持久性，故本計畫之目的在發展出兼具操作便利性與長效抑菌性之新型 GTR Barrier 阻隔材。研發構想上，係以可注射式之吸收性聚乳酸共聚物溶液系統為基礎，透過導入具有抑菌功能與促進骨癒合功能之幾丁聚醣，有效地提供長時間之抑菌效果降低發炎反應及加速癒合以縮短療程。研究重點在探討幾丁聚醣與聚乳酸共聚物溶液之相分離行為以增進對薄膜孔洞大小控制之瞭解，並探討浸泡時間對不同組成配方之抑菌性影響，為產品配方上兼顧整體療效與便利性之設計基礎。

關鍵詞：組織導引再生、吸收性植入材、去乙醯幾丁聚醣、聚乳酸

Abstract

The improvement in surgical technique and the barrier materials have made the GTR (Guided Tissue Regeneration) technology successfully applied in periodontal therapy. A variety of resorbable barrier materials have been marketed during these few years offering the benefit of second-stage surgery free as well as the promotion of new cementum formation and connective tissue fiber attachment. Although these resorbable GTR barriers showed some promising results, the development of post-surgical infection control is still needed. Our goal is to develop an injectable GTR Barrier with a long-lasting antibacterial function and wound healing to meet specific human biology requirements. A resorbable PLA/NMP solution system formulated with the addition of Chitosan. The phase separation behavior of the Chitosan/PLA/NMP solution system was studied to gain the control of pore-formation in membrane for cell occlusion. The soaking time dependence of antibacterial effect of various GTR barriers was evaluated to compare the lasting period of effectiveness.

Keywords: GTR, Resorbable implant, Chitosan, PLA

一、前言與研究目的

根據統計，三十五歲以上的成年人罹患程度不等的牙周疾病的比例高達 80%，牙周病的成因是來自牙菌斑及牙結石，其內包含很多細菌導致牙齦發炎、紅腫，若未及時治療則細菌會引起慢性發炎反應，導致牙齒周圍支持組織，包含齒槽骨及牙周組織之吸收破壞。組織引導再生(Guided Tissue Regeneration, GTR)技術本質上是將膜片植入患處，藉以阻隔生長較快之上皮細胞不當之增生，同時預留空間，以利生長速率較慢之其他組織細胞能重新聚集在骨缺損區，進一步形成骨質再生之治療方式。目前市面上暨有之 GTR membrane 商品超過 15 種以上，其中國內具代理商之商品則多達 8 家，而目前國內尚無廠家生產，醫療上之需求全賴進口供應，顯示出 GTR membrane 在醫療上之重要性，與國人積極投入研發之重要性。

綜觀市售 GTR 膜片商品種類雖多，然而臨床實務上，在 GTR 手術後之 3 - 6 週為減少或舒緩發炎反應，往往需藉助抑菌漱口水，必要時甚至使用抗生素藥物，並起有 Atrisorb-D®產品在 GTR Barrier 中添加 Doxycycline 以解決術後發炎問題，然而 Atrisorb-D®係以將聚乳酸與抗生素溶於 NMP 溶劑中使其具流動性方便施打，操作時則需藉由水之沖洗移除溶劑 NMP，使聚乳酸固化成具孔洞之薄膜，然而因 Doxycycline 為具水溶性之抗生素，易伴隨 NMP 移除時被洗出而流失，再者由 Atrisorb-D®之經體外釋放控制測試研究指出，在 24 小時之內 Doxycycline 釋放的比例高達 90％以上，使得抗生素之劑量設計時常不易兼顧安全性與持久性。

幾丁聚醣(Chitosan)為一種具有抑菌性之天然多醣類 (Polysaccharide) 高分子，文獻已證實對於在牙周病病原菌中常見的 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.A)和 *Porphyromonas gingivalis* (P.G)的生長抑制，促進傷口癒合，與新骨增生上也有不錯的效果，而 Chitosan 在酸性水溶液(pH < 6.3)中之溶解度雖依其去乙醯度之不同而異，但在鹼性環境中並不溶解，而在口腔中正常唾液的 pH 值介於 5.6 到 7.6 之間，故在配方設計上選擇以添加幾丁聚醣來提供 GTR barrier 持久之抑菌功能。

因此本研究之目的係以可注射式之吸收性聚乳酸共聚物溶液系統為基礎，透過導入具有抑菌功能與促進骨癒合功能之去乙醯幾丁聚醣，有效地提供長時間之抑菌效果降低發炎反應及加速癒合以縮短療程。

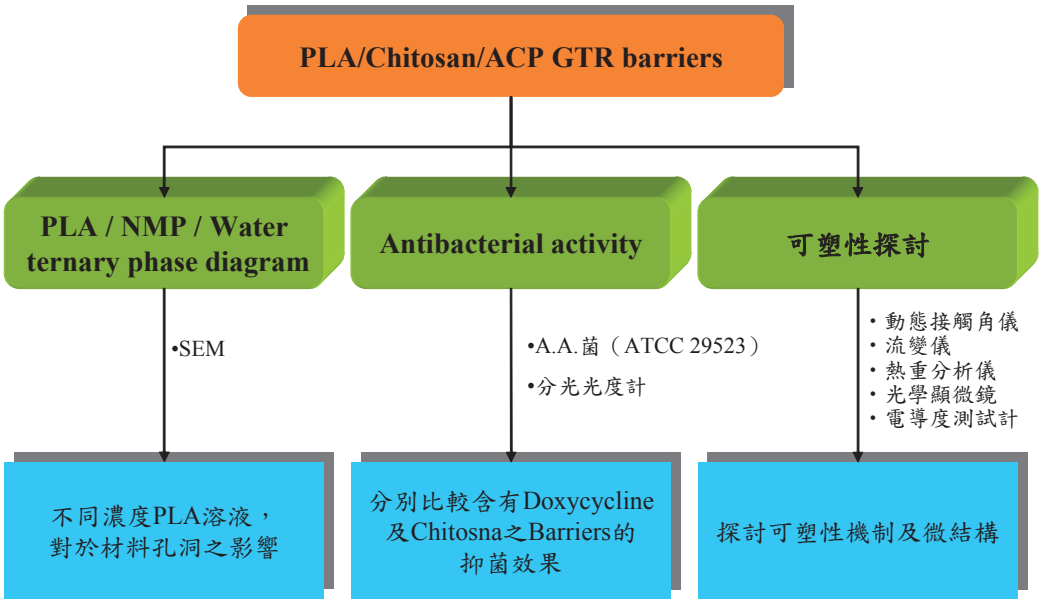
二、材料與方法

2.1 材料

- Poly(D/L-lactic acid), 20KDa, BMG Inc., JAPAN。
- Chitosan (DD=95％, 35KDa), 世展科技。

- Amorphous calcium phosphate (Ca/P = 1.5), 實驗室製備。
- N-Methyl-2-pyrrolidinone (NMP), ACROS。
- Lactic acid, 90%, ACROS。
- Bacterial : ***actinomycetemcomitans***（**ATCC 29523**）

2.2 實驗流程圖

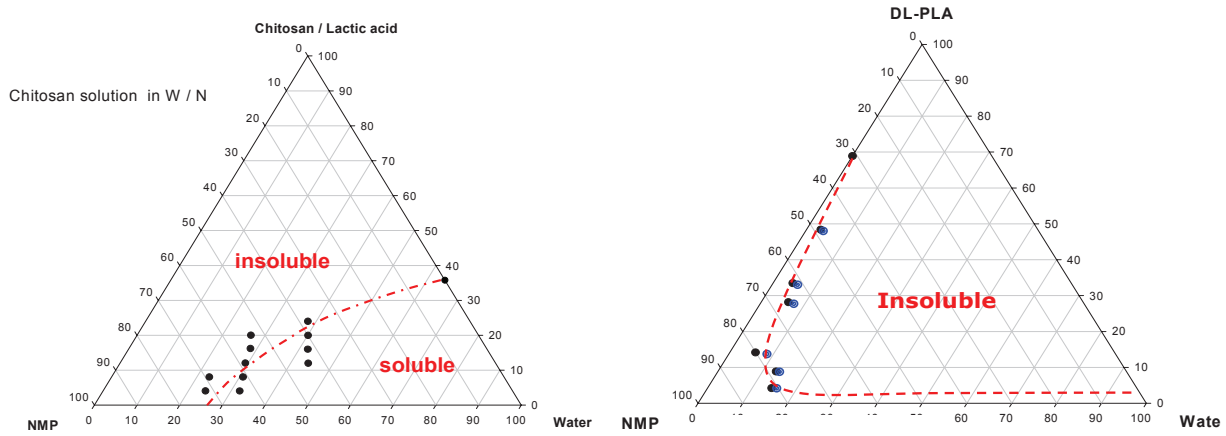


三、結果與討論

3.1 PLA 與 Chitosan 之溶液相行為

因聚乳酸PLA之接觸角(Contact Angle)約為 73°，特性上較為疏水(Hydrophobic)，需溶於NMP之強極性溶劑，卻不易溶於水，而Chitosan為親水性材料(Hydrophilic)，可溶於微酸性之水溶液，但不溶於NMP溶劑中，無法找到單一溶劑可以同時溶解PLA與Chitosan，故需找出特定混合比例範圍之Lactic acid/NMP共溶劑，以將此二種性質不同的材料進行混合。

首先將Chitosan溶於不同濃度之乳酸Lactic acid水溶液中，配製成呈鵝黃色之透明Chitosan/Lactic acid$_{(aq)}$溶液，再將溶液，加入不同比例之NMP溶劑，利用磁石攪拌均勻混合後觀察其靜置後溶液是否有沉澱物析出，據此判斷其組成份濃度對Chitosan溶液相行為之影響，將其組成份之溶解狀況標示於三相圖上，以虛線分隔soluble 及insoluble 區域，其結果如圖一(a)之Chitosan/NMP/water三相圖所示。而另一方面則是將不同濃度之PLA/NMP溶液增加水之含量，以平衡後觀察溶液系統中是否會有沉澱產生，作為判斷PLA/NMP/Water組成份為one-phase 或是two-phase產生相分離之依據，其結果如圖一(b) PLA/NMP/water三相圖所示。

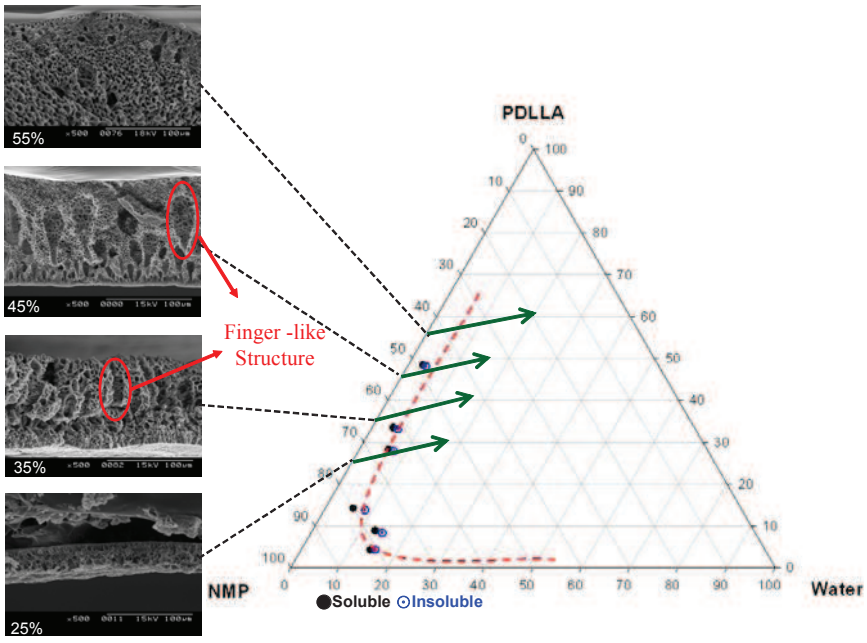


(a) Chitosan / Water / NMP　　(b) PLA / NMP / Water

圖一、PLA 及 Chitosan 分別在 Water 及 NMP 溶劑中之 Ternary Phase Diagram 關係

3.2　PLA/NMP/Water 之相行為

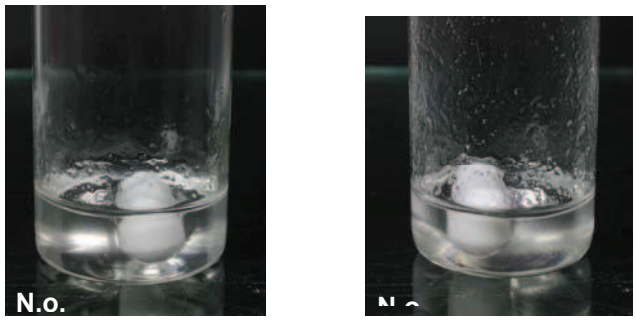
將不同濃度之PLA/NMP溶液於水中沉澱固化成形，並將材料進行乾燥後在經由SEM觀察薄膜之斷面（如下圖），可發現 25、35、45%之 PLA/NMP 溶液在固化後其斷面均有 Finger-like 較大之孔洞結構，而且孔洞大小之分布較廣，而在 55%之 PLA/NMP 溶液在固化後 Finger-like 孔洞結構明顯減少，而且孔洞大小之分布則較為均一，顯示 PLA/NMP 溶液在進行相轉變時，會因組成份不同而影響其固化路徑，而導致不同相轉變後之薄膜孔洞結構，而影響材料孔洞的大小及分佈。



圖二、 PLA/NMP 溶液固化成膜後之斷面形態

3.3 PLA/Chitosan 溶液之配製

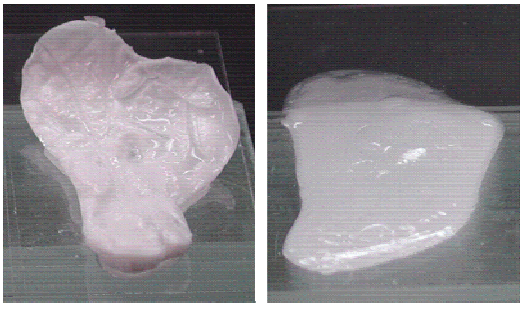
藉由Ternary Phase Diagram可瞭解其PLA及Chitosan在Water及NMP兩種溶劑下之比例關係，再經由分別配製之PLA/NMP與Chitosan/ Lactic acid$_{(aq)}$溶液，以不同之比例混合配製，以找出可以同時溶解PLA與Chitosan之Lactic acid/NMP共溶劑濃度範圍。在以 8%之Chitosan水溶液與PLA/NMP進行混合後均有沈澱物析出，並且考慮到其pH質較為低(pH=4.64)，對於細胞組織可能造成影響，故以 4%之Chitosan水溶液與 55%PLA 溶液進行混合，其溶液配製後之結果如照片所示，圖三**(a)** PLA/Chitosan = 87/1 無明顯之沉澱物析出，圖三(b) PLA/Chitosan = 69/1 配製後則會有透明析出物沾黏在瓶壁上，若將將PLA /Chitosan = 87/1 之溶液組經水洗固化沉澱後，直接換算成PLA/Chitosan之比例為 99.92/0.08，Chitosan的含量為 0.08%，並且在特定混合比例之Lactic acid/NMP共溶劑可得一均勻之PLA /Chitosan/Lactic acid/NMP/Water溶液系統。



(a) PLA /Chitosan = 87/1　　(b) PLA/Chitosan = 69/1

圖三、 PLA/Chitosan 溶液之配製混合比例與相容性之關係

將含 0.1%ACP 之 PLA/Chitosan/ACP 溶液置於去離子水中 24 小時，經水洗固化沉澱去除所含之 NMP(N-methyl pyrrolidone)及 lactic acid 混合溶劑後，形成白色片狀物(圖四(a))，即使延長在水中浸泡之時間達 5 天，並不影響成形物之外觀，但若將薄膜於靜置室溫下乾燥 48 小時後，其外觀則由原先具摺痕之白色固體薄片，轉變為體積膨潤呈半透明狀，並具有柔軟可塑特性之複合材如圖四(b)所示，此時如將複合材重新浸泡於水中，則可恢復如圖四(a)之白色固體。

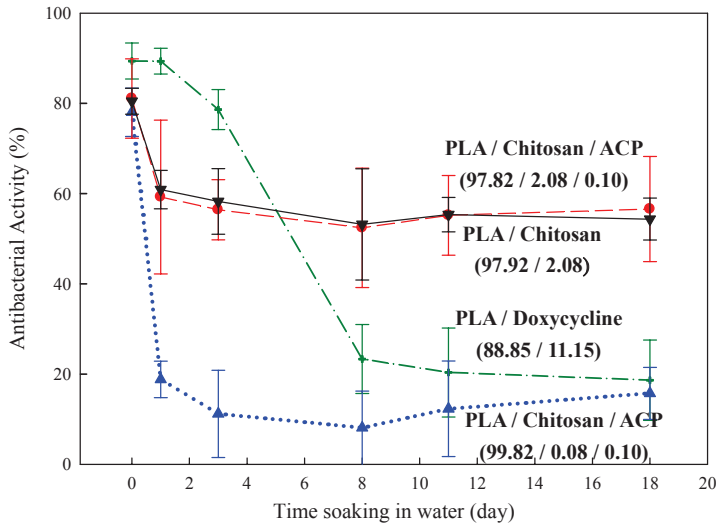


(a)固化後　　(b)靜置 48 小時後

圖四、 PLA/Chitosan/ACP 複合材之形態

3.4 GTR barrier 之抑菌持續性測試

為模擬與對比 Atrisorb-D® GTR Barrier 所含之 Doxycycline 在臨床應用時，其抑菌特性會依植入時間而變異，故配製四組不同組成份之 GTR Barrier 如下(a) PLA / Doxycycline (88.85 / 11.15) (b) PLA / Chitosan / ACP (99.82 / 0.08 / 0.10) (c) PLA / Chitosan / ACP (97.82 / 2.08 / 0.10) (d) PLA / Chitosan (97.92 / 2.08)，先在水中浸泡 5 分鐘固化成膜後，再分別持續浸泡在水中 1、3、8、11、18 天後取出，以添加 *actinomycetemcomitans*（ATCC 29523）菌種培養 24 小時後，以 ELISA 測試結果為其各別之抑菌性指標。含有 Doxycycline 之 GTR Barriers 在初期(1 ~ 3 天)呈現良好之抑菌性，而當隨浸泡時間增加(8 ~ 18 天)，其抑菌效果降至 20 ~30 %。對於 PLA/Chitosan/ACP GTR Barriers，剛固化後之樣品可能因內含殘留之 NMP 溶劑而均呈現具有抑菌效果，而對 Chitosan 含量為 0.08% 之樣品則抑菌性迅速下降至低於 20%，反觀高 Chitosan 含量 (2.08%)之樣品，在浸泡 1 ~ 18 天之間，持續地維持約 60% 之抑菌效果，並隨時間增加無顯著的差異。



圖五、 不同浸泡時間對 GTR Barrier 抑菌性之影響

四、結論

本研究植基於 PLA 與 Chitosan 各別之溶液相行為研究，找到可以同時溶解 PLA 與 Chitosan 之 Lactic acid/NMP 共溶劑濃度範圍，而 PLA/NMP 濃度在 55wt%，其孔洞分佈較緊密且平均，可直接與濃度 4%之 Chitosan 水溶液直接配製成均勻可注射式之 GTR Barriers，但在配方上由於其 Chitosan 僅佔整體固含量(PLA/Chitosan)之 0.08%，不足以提供預期之抑菌效果，若將 Chitosan 含量提高至 2.08%，可使 GTR Barriers 具有長效性之抑菌效果具有。

參考文獻

1. 侯連圍，劉謙美，王敏瑩，豐富，“引導組織再生術的科學原理和牙周細胞移植法在牙周骨缺損手術的應用”，中華牙周醫誌，2:209-215 (1997).
2. 黃啟洲，曾春祺，袁國，“拔牙後及時施行引導組織再生術以保留齒槽脊--病例報告”，中華牙周醫誌， 2:70-76 (1996).
3. 蔡尚文，黎永康，”引導組織再生術治療上顎第一大臼齒之第三級根叉侵犯病例報告”，中華牙周醫誌，2:145-151 (1997).
4. 黃國精，曾春祺，”運用 ITI 植牙做為牙齒外傷缺牙區之贋復治療：病例報告”，中華牙周醫誌， 5:219-223 (2000).
5. 凌久惠， 陳立民，曾春祺，”以引導組織再生術治療伴隨有牙根表面牙結石狀沉著物 的齒根尖周圍病灶--病例報告”，中華牙周醫誌，4:33-37 (1999).
6. 曾春祺，黃啟洲，袁國, “Atrisorb 可吸收再生膜的現況與臨床應用”，中華牙周醫誌，4:97-103 (1999).
7. 董醒任，藍文謙，陳瑞雲，楊世芳，”骨髓基質與牙齦造纖維細胞在阻隔膜上的附著與形態表現”，中華民國醫誌，4：25-32 (1999).
8. 呂炫，吳銘芳，李長佑，“豬皮膠原蛋白膜之組織整合性”，中華牙周醫誌， 5:15-21 (2000).
9. 陳瑞雲，董醒任，”膠原蛋白膜於牙周再生的應用”，中華牙周醫誌， 4:173-188 (1999).
10. 黃國光，江正陽，謝耀東，沈一慶，傅鍔，“運用骨成形蛋白質於提升上顎竇手術之效果”，中華牙周醫誌 4:153-162 (1999).
11. 王敏瑩，陳勝弘，”Metronidazole 與 Amoxicillin 兩種抗生素合併使用對治療牙周病之臨床效果探討”，中華牙周醫誌，3:65-70 (1998).
12. 王敏瑩，黃卉雯，“四環黴素纖維應用於牙周病治療”，中華牙周醫誌，4:135-142 (1999).
13. J.H. Goedemoed, W.E. Hennink, U.S. Pat. 5,980,948 (1999).
14. J.A. Jansen, J.E. de Ruijter, P.T.M. Janssen, and Y.G.G.J. Paquay, “Histological Evaluation of a Biodegradable Polyactice® /Hydroxyapatite Membranr, Biomaterials, 16, 819-827 (1995).