

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

生物吸收性多孔質聚乳酸 / 氫氧基磷灰石複合體之 活體內及活體外相關研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC89-2213-E-038-006

執行期間：89年8月1日至90年7月31日

計畫主持人：曾厚 台北醫學大學醫學研究所

共同主持人：李勝揚 台北醫學大學口腔復健醫學研究所

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

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

生物吸收性多孔質聚乳酸/氫氧基磷灰石複合體之 活體內及活體外相關研究

Study of Porous PLLA/ HA Composites as Biodegradable Materials:
in vitro and *in vivo* study

計劃編號：NSC89-2213-E-038-006

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：曾厚 台北醫學大學醫學研究所

共同主持人：李勝揚 台北醫學大學口腔復健醫學研究所

一、中文摘要

本研究目的是觀察利用燒結的方法製作多孔性氫氧基磷灰石(HA)燒結體，加入聚左乳酸(PLLA)製成 PLLA/HA 的複合材，作為生物硬組織可吸收性的修補材料的組織變化。複合材是以砂糖及食鹽當作 Filler 及 Binder，其中 HA:砂糖:食鹽為等比例，然後壓製(5-45kgf/cm²)成型，再以高溫燒結的方法製作多孔性的氫氧基磷灰石(HA)燒結體，浸入分子量約 8 萬的 PLLA 使 PLLA 能浸入 HA 燒結體內外孔洞上，最終製成多孔質 PLLA/HA 複合材。從毒性測試的結果可知未洗過的 HA 對細胞造成的毒性最高，而使用氯仿洗過的 HA 毒性最低。接著滅菌之後，以英國小獵犬(Beagle Dog)為主進行 *in vivo* study 即把 PLLA/HA 及 pure HA 分別植入 14 隻 Beagle Dog 的下顎骨 angle 部，在 1, 2, 3, 4, 8, 12, 26 週後取出。觀察的部分包括組織切片查看發炎反

pressing them under 5-45 kgf/cm² for 2 to 5 minutes, dissolving the sucrose at 220 °C and then sintering under 1345°C for 10 hours. The obtained porous HA was immersed into PLLA solution while the used PLLA was prepared via a thermo degradation method. The three points bending strength of the composites is 13.56 MPa, which is quite high for porous materials. HA without any purification have a highest toxicity and HA washed with chloroform have a lowest toxicity against gingival fibroblast were found.

After sterilization, the composites are implanted into the mandible bones of 14 Beagle dogs. Two kinds of implants were used – HA with PLLA and without PLLA. 1, 2, 3, 4, 8, 12, 26weeks after implantation, the samples were examined histologically by light microscopy. SEM will be used for histomorphometric analysis of the bone-implant interface.

Key words: poly(L-lactide), hydroxyapatite.

酸而成為高分子硬組織取代材中運用最多的材料之一。另一方面，無機物羥氫氧基磷灰石(hydroxyapatite, HA)具良好生物相容性亦具生物活性的磷酸鈣陶瓷材料，也是脊椎動物硬組織中的自然無機成分，不會引起過度的發炎反應或排斥反應[2]與骨頭有強大的結合能力，可與骨頭功能性的合而為一；且於非骨組織中，不會誘導新的骨力，可與骨頭功能性的合而為一；且於非骨組織中，不會誘導新的骨頭生成，也不會刺激骨頭生長加快；並且有特殊的骨傳導(osteoconductive)特性[3]，因此常被用來修補非病理性骨缺損[4]。而臨床治療上，以 HA 的燒結體埋入活體的骨組織後均生成一種較低強度的骨組織-HA 複合體[5]，但 HA 並不會吸收。這是因為市售人工合成的 HA 為八面體結晶，無法溶解所造成它的不可吸收性。而為了改善此不可吸收性，一般是將氫氧基磷灰石進行結構改質，使其能夠分解[6]。目前具可吸收性的 HA/PLA 複合材或是 PLA/HA 複合材應用於骨科及牙科，當作骨折或是骨缺損時的填充材料，以及不需要太大的支撐力的部分骨頭的取代材料。亦有應用在整形外科及組織工程學上，即將複合材當成鷹架，提供一個適合組織再生的模版[3]。過去我們以糖及食鹽當作孔洞成型劑，並在適當的燒結下產生的多孔質氫氧基磷灰石的孔洞效果最佳，在將之浸入一中低分子量的聚左乳酸以提高其韌性，三點彎曲強度可高達 13.56 MPa 的複合材。

這兩類生物醫學材料至今已有許多相關研究報告指出其實用性乃在於

術的大鼠股骨，研究二者材料的生物相容性及固定性質。結果顯示，在骨組織中沒有發炎或異物反應，D 型聚乳酸吸收快於 L 型聚乳酸，吸收的方向是由植體的外圍向內部且逐漸由新骨所取代，而此自體強化聚乳酸在大鼠骨中為生物相容物，吸收緩慢，且具有足夠的機械強度，可作為骨切開術後固定用。Koskikare 等人提出以板狀自體強化聚乳酸固定 29 隻接受遠心股骨骨切開術的兔子，24 週後骨完全堅實癒合，因此認為此自身強化聚乳酸是適合於荷重海綿骨的骨切開術後固定用。而 Shikinami 等人以(MWv: 25 萬)聚乳酸含 30 wt%之 HA/PLLA 複合材，其彎曲強度為 280 MPa，已滿足皮質骨骨折內固定之要求。Furukawa 等人在 2000 年以 Shikinami 等人在 1999 年所合成 30 wt%之 HA/PLLA 複合材，植入兔子皮下及骨髓中結果發現在皮下四週後形成一纖維組織層且隨時間愈益成熟，在兩種植入區皆看不到多核吞噬細胞，沒有不良組織反應印証組織反應方面良好。因此可推知 HA/PLLA 複合材是相當良好的生醫材料。

但 PLLA/HA 的植入相關的動物實驗則至今尚無相關論文的出現，因此本研究的目的除了瞭解在加入中低分子量的 PLLA 製備而成的 PLLA/HA 之部份活體外性質之外，主要是針對 PLLA/HA 在 Beagle dog 植入後的組織反應。

三、研究方法及進行步驟

1. 氫氧磷灰石燒結體之製作

接觸及吸附的情形。先培養五代牙齦纖維母細胞，調整至 2.5×10^4 cell/ml medium 的濃度加入 well 內，並在每個 well 加入 0.4 ml 的細胞及培養液，使最終細胞濃度為 1×10^4 cell/ml。在 37°C 、5% CO_2 下培養。24 小時之後，以 MTT assay 進行毒性評估。

3. 乳酸寡聚物之製作

首先，將 12 萬的 PLLA 放入高溫混料系統內，以螺桿於特定溫度下，停留 20 分鐘，然後再將液狀 PLLA 自螺桿中擠出，以空氣自然冷卻後，可得到分子量約 7.5 萬的 PLLA 塊。

4. 聚乳酸/氫氧基磷灰石複合材 (PLLA/HA composites) 的製作

將 PLLA 溶於 Chloroform 或是 dichloromethane 中製作成濃度 2%、5%、10%、20% 的溶液，再把 HA 燒結物放入濃度低的聚乳酸溶液中進行超音波震盪，乾燥後再放入濃度較高的聚乳酸溶液使用超音波震盪，再進行乾燥。乾燥後即為 PLLA/HA composites。

5. 動物實驗

A. 複合材的植入

將 Beagle dog 用 Phenobarbital (25~30 mg/kg) 麻醉後，以 15 號刀片於皮下黏膜牙齦緣切入，將骨膜由頰側撥離，暴露出牙齦，接著在兩側下顎約在白齒下方的骨頭利用圓頭鑽針製造出一 $2 \times 4 \times 2 \text{mm}$ 的傷口，將複合材植入，然後再以 5-0 可吸收

包埋塊沿著植體正中長軸(long axis)依照前後縱切，分為兩塊後，一塊依序縱切，一塊依序橫切，先切為 120 到 150 μm ，再用 Petrographic Grinding technique 將切片減為 40 μm 左右，由 Stevenel's Blue 及 Van Gieson's Picro-fuchsin 的混合液染色，此種染色可清楚分辨骨(bone)，類骨質(Osteoid)和纖維結締組織(fiber connective tissue)，於光學顯微鏡下觀察可明確分辨。

D. 組織學量化分析

標本製備與染色後，每個植體可依序挑出縱切 10 片，橫切 10 片，將每片切片輸入電腦，以 Image Analysis Method 軟體分析骨接觸率(Bone contact ratio)。

四、結果與討論

1. 材料的製備

把高分子量的聚合物降解為低分子量聚合物的方法有以下幾種：(1)酸降解法，如 $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ (2)鹼降解法，如 $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ (3) 高溫降解法；本研究採用高溫降解法，此法可得到分子量分佈較佳的中低分子量 PLLA。

多孔質的硬組織再生材中，孔洞的大小以及數量對於促進骨細胞的生長是很重要的，因此製作出適合的孔洞是我們努力的目標。據 Hulbert 等人 1970 年的文獻中指出，孔洞的大小必須要大於 $100 \mu\text{m}$ 骨細胞才可以生長，要達 $200 \mu\text{m}$ 時氫氧基磷灰石材且有骨導道的特性。多孔質的燒結體

低的優點。接著的壓製成形的過程，若在壓力 15kgf/cm^2 超過 5 分鐘，後來燒結後會容易碎掉，而若在壓力超過 15kgf/cm^2 下只要 1、2 分鐘也會造成上述的結果，因次壓製過程的壓力與時間控制對後來的材料脆性影響很大。

燒結完成的氫氧基磷灰石先切成 $2\times 4\times 2\text{mm}$ 的大小，再浸入聚乳酸寡聚物的溶液中，目的是增加氫氧基磷灰石燒結體的表面積，讓聚乳酸寡聚物能大量的附著在其孔洞上，一方面增加燒結體強度，一方面讓複合材在體液中形成酸性環境，幫助氫氧基磷灰石的代謝。

2. HA 的毒性測試

由結果中可以得知使用蒸餾水及氯仿洗過的氫氧磷灰石對細胞的毒性最低，O.D 值為 0.2-0.3；未洗過以及只用蒸餾水洗的 HA 顆粒毒性最高，O.D 值為 0.7 左右。而由顯微鏡觀察發現細胞對使用氯仿洗過及使用氯仿、乙醇、丙酮等溶劑洗過的氫氧磷灰石的附著性較佳。未洗過的氫氧磷灰石對細胞具有毒性，與細胞培養在一起時，會使細胞死亡。而醫用的氫氧磷灰石則會有細胞附著上去。在顯微鏡下，實驗用的氫氧磷灰石為尖銳的菱形，或是尖銳的不規則型，可能是因為這個原因造成細胞的附著性並不是很好。

3. 動物實驗

複合材的植入位置在 Beagle dog 的下顎骨 angle 位置是因為此位置不是受力骨，本研究的複合材強度 13MPa 較適合作

reduction using a biodegradable materials, J. Oral Surg, 29,393-397(1971)

[2] N. Ignjatovic, S. Tomic, M. Dakic, M. Miljkovic, M. Plavsic, D. Uskokovic, Synthesis and properties of hydroxyapatite /poly-L-lactide composite biomaterials, Biomaterials, 20, 809-816 (1999)

[3] R. Zhang. P. X. Ma, Poly(α -hydroxy acids)/ hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology, Journal of Biomedical Materials Research, 33, 446-455 (1999)

[4] 黃慧平, 聚乳酸薄膜及複合材之性質研究, 台北醫學院口腔復健醫學研究所碩士論文 (1998)

[5] 曾厚, 吸收性硬組織再生材之研發, 行政院國家科學委員會專題研究計劃書 (1998)

[6] K. A. Hing, S. M. Best, W. Bonfield, Characterization of Porous hydroxyapatite, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 10, 135-145 (1999)

[7] E. Hirvensalo, Fracture fixation with biodegradable materials : Forty-one cases of severe ankle fractures, Acta Orthop Scand, 60, 601-606(1989)

[8] Y. Matsusue, T. Yamamuro, M. Oka, Y. Shikinami, S. H. Hyon, Y. Ikada, In vitro and in vivo studies on bioabsorbable ultra-high-strength poly(L-lactide) rods, J Biomed Mater Res, 26, 1533-1567(1992)

[9] S. H. Hyon, K. Jamshidi, Y. Ikada, Synthesis of polylactides with different molecular weights, Biomaterials, 18(22), 1503-1508(1997)

[10] A. Tegnander, L. Engerbretsen, K.