

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性試驗之應用研究

**Application study of pre-clinical biological testing for orthopedic
biomaterials**

計畫編號：1012001INER061

受委託機關(構)：國立台北科技大學

計畫主持人：方旭偉

聯絡電話：02-27712171 # 2521

E-mail address：hwfang@ntut.edu.tw

核研所聯絡人員：伍德馨

報告日期：2012 年 11 月 30 日

目 錄

中文摘要	1
ABSTRACT.....	3
壹、計畫緣起與目的	5
一、計畫緣起	5
二、計畫目的	8
貳、研究方法與過程	10
一、細胞毒性測試	10
二、體外降解行為實驗	12
三、動物熱源試驗	13
參、主要發現與結論	15
一、實驗結果	15
二、結論	23
肆、參考文獻	25

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。目前自體骨常為外科手術應用之填補材料，但由於臨床應用上自體骨有不可預期之吸收，供應區產生併發症等問題而造成病情的複雜化。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，配合近來被廣泛臨床應用的血小板膠，合成有效促進骨缺損癒合之高值化醫療奈米複合骨材，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。結合血小板膠與核研所為主研究團隊開發之PAA-PNIPAA-NM水膠支架應用於重建骨缺損材料上。但醫療用骨材上市前，需要以符合法規的檢測方法進行臨床前試驗，以實驗數據來降低未來實際臨床應用開發材料之風險。本研究希望透過含血小板之醫用複合水膠骨材之熱原測試建立，消除材料合成中可能造成熱原污染之因素，降低材料污染機率，並增加含血小板之醫用複合水膠骨材臨床適用性。

本研究已完成之工作項目包含，建立含血小板膠之醫用複合水膠骨材體外檢測平台，建立水膠骨材及水膠-血小板膠骨材體外降解

行為實驗評估模式以及配合團隊合作醫院進行臨床前動物植入含血小板膠之醫用複合水膠骨材實驗與骨缺損組織修復型態評估。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。

關鍵字

水膠、血小板膠、骨缺損

Abstract

With the increasing need of biomedical implants for orthopedic diseases, the orthopedic biomaterials become the focused items in biotechnology industry. Currently, autogenous bone graft is the most commonly used material for surgical operation. However, autogenous bone has un-predictable resorption and may result in donor site complications. We have used biocompatible osteoconductive scaffold mixed with platelet glue to performe the biocompatibility tests for a composite bone graft material made of PAA-PNIPA-NM and be applied for bone re-construction. The pyrogen tests will be performed to evaluate the safety and applicability of this composite bone graft material pre-marking. The aim of this project contents three tasks, one for establishment of medical composite bone graft with platelet glue in vitro detection platform, two of establishment of the new composite materials in vitro degradation behavior assessment model experiments, and the other for the efforts will be made to assist the development of animal testing model with the collaborative hospital. By applying the ISO-14971 based risk assessment procedures, it is expected to develop an appropriate testing procedure for new developed orthopedic biomaterials.

Keywords: hydrogel, platelet gel, bone defect

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，因應為經濟發展之重點，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，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，配合近來被廣泛臨床應用的血小板膠，合成有效促進骨缺損癒合之高值化醫療奈米複合骨材，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。

本研究材料之來源由核研所為主研究團隊製作，包含以丙烯酸 (Acrylic acid, AAC) 以及感溫性單體 N-isopropyl acrylamide(NIPAAm)，利用 γ -ray 照射製作而成之高機械強度和結構緊密之雙層網狀(Double-Network, DN)水膠並且富含血小板膠新式的醫療用複合骨材，經測試分析其壓縮強度高達 40 MPa 以上，而其平均壓縮強度亦達到 20 MPa，同時其表面磨擦係數約為 2×10^{-3} ，其高強度以及低表面磨擦係數性質極適合作為重建骨缺損材料。100 年本研究團隊結合原能所、三總、國立台北科大等先進研究能量，業已完成材料本身主要生物相容性相關研究，初步獲得良好的結果。

填補材料的研發由於其植入人體的風險性高，驗證期程長，研發費用龐大等特點使得國內廠商對於投入人體植入醫療器材的開發

腳步緩慢，國外相關骨填補材料產品則大量應用於國內醫療院所，為外商創造龐大的商業利益。目前為外科醫師所廣泛使用的骨填補材料以 hydroxylapatite(HAp)材料為主，目前已由相關文獻證明此一材料具有良好的骨傳導性(Osteoconductive scaffold)，而且具備良好的生物相容性。但是此類材料由於缺乏骨誘導能力(Osteoinduction)所以骨質新生之能力有限，僅限於植入物的之邊緣，對於受損面積較大的骨缺損區域，幫助有限。結合生長因子等具有骨誘導性質的材料與具有骨傳導能力的基材互相結合的複合醫材開發已成為目前骨植入物材料發展的主要方向。但是目前受限於實驗數據以及相關管理法規制定未盡完善，讓此類結合基材與生長因子的複合醫材常常成為新型的醫材植入物，延長商品上市流程，造成國內廠商開發上市期程遙遙無期的主要因素之一。

本研究計畫基於以往的研究成果，研發出具有良好生物相容性之材料混合富有血小板濃厚液(Platelet Rich Plasma, PRP)的複合醫材，並且於老鼠的顱骨缺損動物實驗中獲得初步良好的骨缺損彌補療效。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)，並且配合放射線 γ -ray 照射製作而成之高強度及低摩擦水膠結合近來被廣泛臨床應用的血小板膠，合成有效促進骨缺損癒合之高值化醫療奈米複合骨材。

為完整高值化醫療奈米複合骨材臨床前試驗評估與設計快速上市流程，協助國內生技醫療產業研究發展。本期研究希望透過臨床需求導向與快速上市規畫流程，進行相關實驗設計，並完成此複合

骨填補材料上市前的療效統計資料，以加速材料上市期程。所採用實驗方法為將已合成之富含血小板膠之醫療用複合骨材進行體外生物相容性測試，並且進行與市售商品的實質性體外試驗評估。並且於研究團隊進行合作結合動物臨床實驗結果共同建立此醫療用骨材之標準植入較大型動物實驗模式，逐次評估生物體內之安全性。透過符合醫療器材管理風險評估 ISO-14971 精神規範，建立合宜且迅速的新型醫療用骨材材料開發上市流程。

二、計畫目的

1. 含血小板膠之醫用複合水膠骨材體外檢測平台技術建立

本研究希望透過含血小板之醫用複合水膠骨材之熱原測試建立，消除材料合成中可能造成熱原污染之因素，降低材料污染機率，並增加含血小板之醫用複合水膠骨材臨床適用性。由於本研究獨創的生醫材料屬中長期(植入體內逾 30 天)植入式醫療器材，上市前應符合 ISO 10993，USP 與 ASTM 等規範。雖然 ISO/FDA 對於醫療器材執行生物相容性評估之建議執行試驗項目，並非需全部強制執行試驗，為求本研究之含血小板之醫用複合水膠骨材能夠縮短研發與驗證期程，本研究希望建立如熱原試驗、細胞毒性等生物安全性評估 (biosafety assessment) 與醫療功效性評估技術平台。其主要驗證技術平台建立要點如下：

(1) 含血小板膠之醫用複合水膠骨材醫材檢測法規資料收集與整理，將植入式醫療器材上市查驗登記所需要的檢測數據，依據材料與活體接觸位置、接觸時間、溶血性質、材料毒物生理特性等法規，依上市地點、法規需求等分門別類進行整理與分析，建立含血小板膠之醫用複合水膠骨材醫材檢測規範做為研究團隊修正材料性質，符合臨床需求的參考。

(2) 評估含血小板膠之醫用複合水膠骨材混合比例功效並進行體外骨修復療效分析，依材料特性進行高溫烘乾、冷凍乾燥以及常溫真空等方式，針對材料本身孔隙度、孔洞大小、細微結構、與血小板膠接觸情形等進行 SEM 觀察，並且透過免疫標定等方式，進行血小板膠與醫用複合水膠骨材混成性質分析，於體外細胞培養實驗中，找出最適合成骨細胞生長的細胞支架條件，並且結合動物實驗模

型，進行討論與實驗結果驗證。

2.水膠骨材及水膠-血小板膠骨材體外降解行為實驗評估模式建立

水膠骨材與血小板膠混成之後的複合型膠體結構分析可以模擬植入活體後的降解行為是否符合臨床骨缺損癒合實際所需。所以本研究希望透過研究水膠骨材與血小板膠於仿體液環境之體外降解行為實驗，對後續動物植入實驗進行評估。此項研究重點方向有二：

(1)依材料植入部位以及體液環境等因素，導入含血小板膠之醫用複合水膠骨材體外降解行為實驗評估，特別是材料降解速率、pH值變化、機械應力變化等要素進行模組化試驗，提供給動物植入實驗參考。

(2)處理多種複合材料型態，如水膠粉體與血小板膠混成材料、水膠塊材與血小板膠混成材料，比較其成膠後之型態、水膠與血小板膠混成均勻性分析、複合水膠機械強度分析等，作為動物植入實驗材料型態考量之參考，並且進行模擬體內環境植入物降解實驗比較，修正並建立此體外測試技術平台，評估後續進行活體植入實驗模式。

3.臨床動物植入含血小板膠之醫用複合水膠骨材實驗與骨缺損組織修復型態評估

與醫院共同合作進行臨床動物植入含血小板膠之醫用複合水膠骨材實驗與骨缺損組織修復型態評估，透過病理切片、免疫螢光染色、micro CT、MRI 等造影技術進行成骨缺損修復面積觀察，評估動物植入促進骨缺損組織修復實驗療效，並且與體外試驗結果進行比對，來修正體外試驗測試參數。

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-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 μ L DMSO，使用 vortex 震盪至紫色 formazan 顆粒完成溶解為止。取 200 μ 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、體外降解行為實驗

建立醫療用骨材及生長因子於仿體液內之降解行為實驗，建立後續活體試驗之模式。

a. 觀察醫療用複合骨材降解過程中的降解失重變化：

實驗方法為將材料經過冷凍乾燥後，測量其重量 (W_0)，隨後放入含有 PBS 的離心管中，再放入溫度為 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培養箱裡，分別經過 4、7、14、28 及 42 天之後取出各組材料，再經相同步驟的冷凍乾燥處理後測量重量 (W_t)，依以下公式計算出降解失重比率。

$$\text{Degradable weight loss ratio}(\%) = \frac{W_0 - W_t}{W_0} \times 100\%$$

b. 觀察醫療用複合骨材降解過程中的 pH 值變化

實驗方法為將材料經過冷凍乾燥後，隨後放入含有 PBS(pH 值為 7.4， 25°C) 的離心管中，再放入溫度為 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培養箱裡，分別經過 4、7、14、28 及 42 天之後量測各組材料萃取液 pH 值，紀錄材料降解過程中的 pH 值變化。

三、動物熱源試驗

動物熱源試驗主要作為動物接受外來熱源導致體溫升高的測試，透過注射萃取液到動物體內的方式來檢測受試的醫療器材所含熱源是否為標準之內。在此熱源指的是會引起人體或是動物體溫升高的物質，一般可區分為外源性以及內源性兩種。外源性熱源如由細菌所分泌出的外毒素(成分為蛋白質)及 Gram-negative 菌細胞壁所含有的內毒素(成分為脂多醣)。由於蛋白質可以由加熱程序抑制其活性，而且其分子量大而易於以過濾方式移除。故一般引起人體或是動物體溫升高的物質常為不易抑制以及移除的內毒素，而內毒素的特性為 100°C 加熱 30 分鐘仍具有活性的熱穩定因子。

內源性的熱源則如人體或動物體內免疫細胞所分泌的物質，如干擾素等。一般醫療器材所採用的熱源檢測方式以醫療器材萃取液注射到動物體內觀察其體溫變化為主，而實施熱源測試的目的在於檢測器材與細菌毒素所引起的熱源反應，用來判定材料製作以及包裝過程是否具有減少外部熱源的機制，或是無外部熱源參與的工作環境。

本動物熱源試驗的檢測方式依循 2005 USPC, Inc. Official 111105-3/31105 General Chapters: <151>PYROGEN TEST 的測試方式進行。實驗動物選用檢康的紐西蘭種的大白兔，注射材料萃取液依照單次注射 10 ml/kg 的比例注射到兔子的耳多血管中。分別選用 3 隻動物，每隻動物進行 5 次的體溫量測數據做為觀察動物體溫升高的紀錄，並且判斷動物熱源反應的結果。實驗步驟如下。

(1)動物進行體溫量測時，僅提供水作為食物，避免其他食物造成受試動物體溫產生變化。

- (2) 注射前，將材料萃取液回溫到 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，並且進行動物耳朵血管注射。注射後 1~3 小時間進行每 30 min 一次的動物體溫量測。
- (3) 注射材料萃取液後，如果動物的平均體溫變化少於 0.5°C ，或是不高於 control 組的體溫，則判定材料不會引起動物熱源反應。

參、主要發現與結論

一、實驗結果

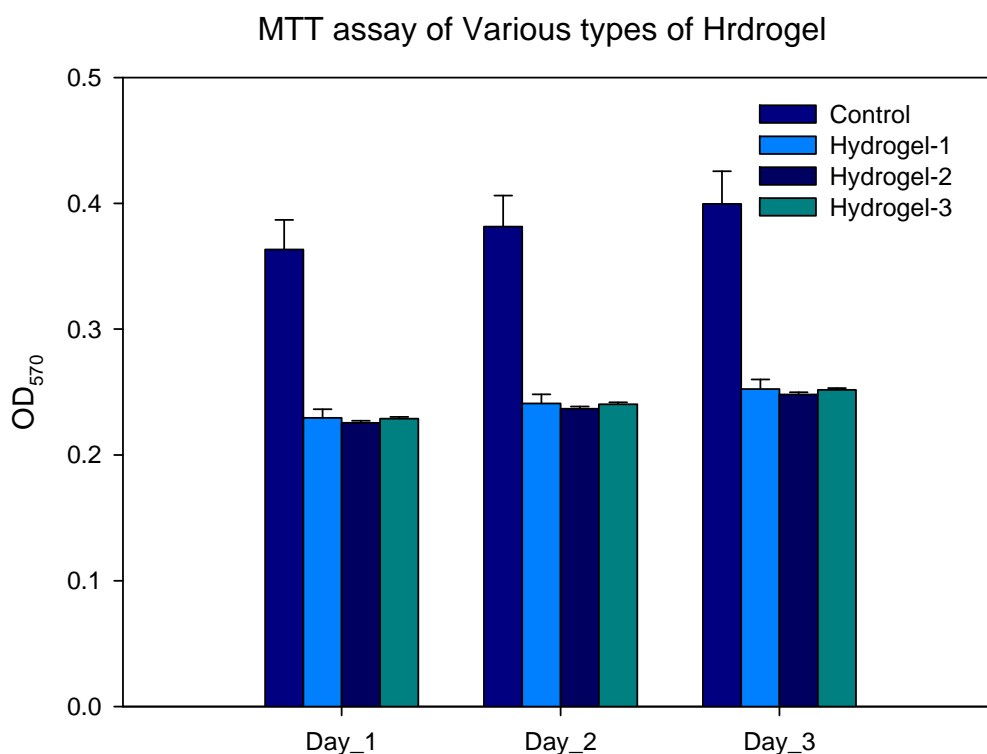
(一)細胞毒性測試

使用 MTT assay 分析細胞活性(OD570)，LDH assay(OD490)分析細胞毒性，來評估水膠材料毒性。

材料型態	原能所編號	材料實驗編號
水膠塊狀	101.3-(100.8,3)-PIN-PAA-N I-1b	Hydrogel-1
水膠塊狀	10104-A-N-12-20-6-LAL	Hydrogel-2
水膠塊狀	10109-12-15-a	Hydrogel-3

1.MTT assay 實驗結果

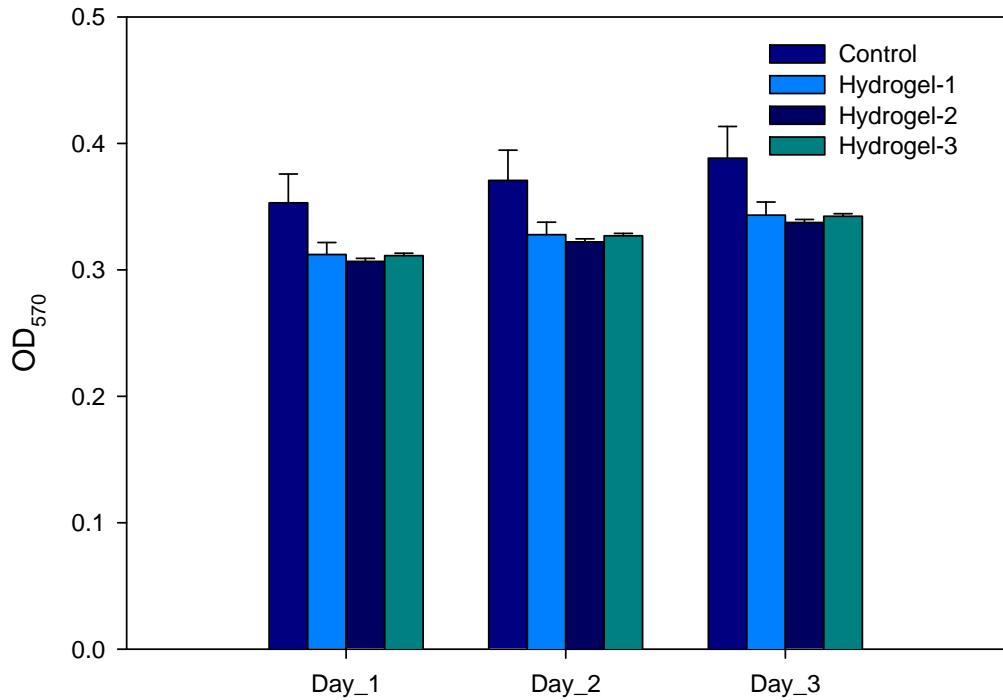
使用 MTT assay 測試細胞存活率(cell viability)，L929 細胞株與材料萃取液共同培養 3 個小時後(Day_1)進行波長 570nm 吸光值量測，並且在共同培養 24 小時(Day_2)、48 小時(Day_3)分別量測 OD570 吸光值，並且與 control 組進行吸光值的比對。實驗結果顯示材料具有良好的生物相容性，細胞存活率皆有 85%以上。



水膠材料與 PRP 固定重量混合(1:1)，靜置一段時間，之後使用 MTT assay 測試細胞存活率。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 OD570 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。

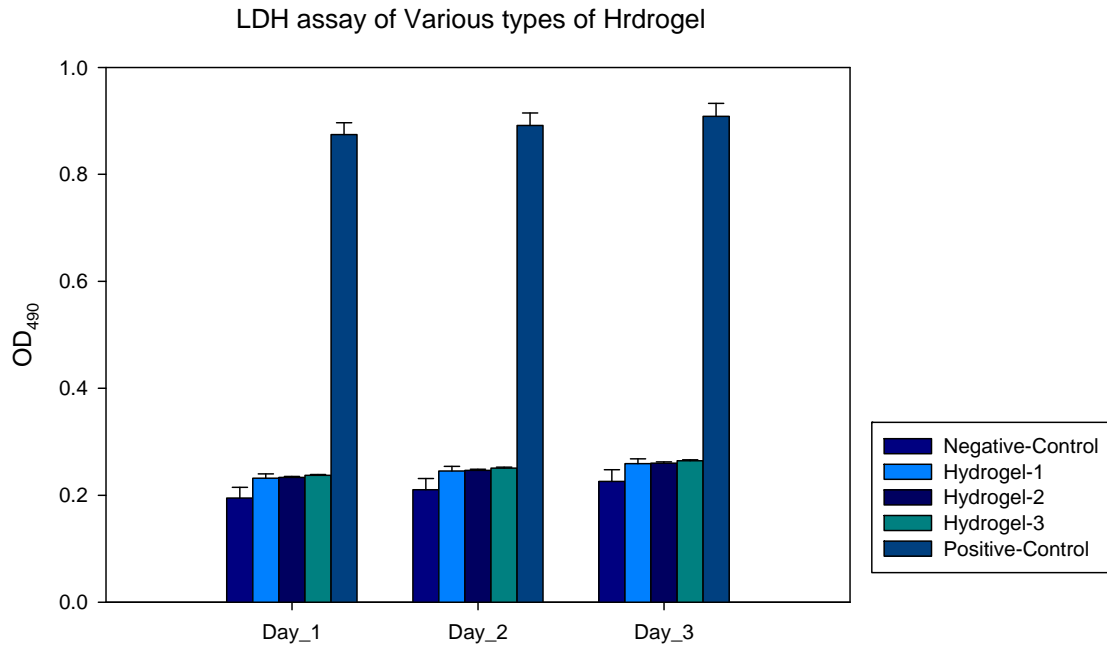
與未混合 PRP 之材料比較，添加 PRP 混合之材料的 MTT assay 結果，顯示對於細胞存活率有所提升。

MTT assay of Various types of Hrdrogel



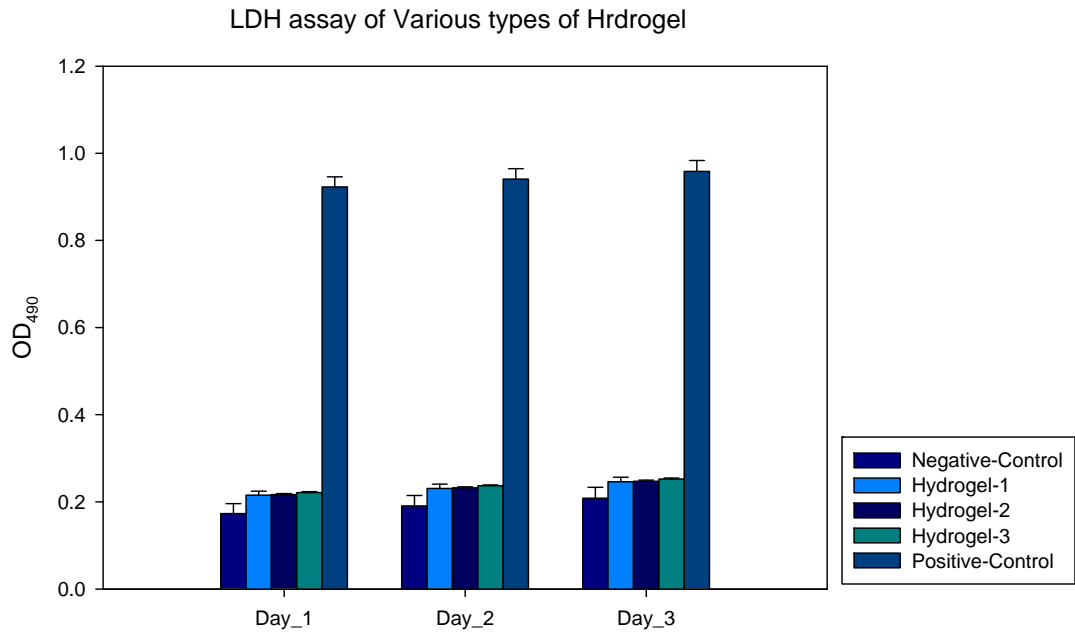
2.LDH assay 實驗結果

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 490nm 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 OD490 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。



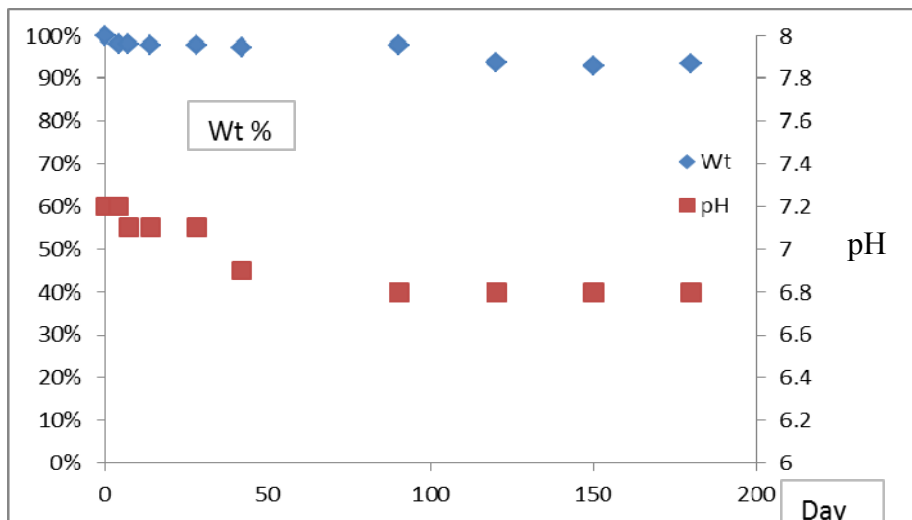
水膠材料與 PRP 固定重量混合(1:1)，靜置一段時間，之後使用 LDH assay 測試細胞存活率。L929 細胞株與材料萃取液共同培養 3 個小時後(Day_1)進行波長 490nm 吸光值量測，並且在共同培養 24 小時(Day_2)、48 小時(Day_3)分別量測 OD490 吸光值。實驗結果顯示材料具有良好的生物相容性，具低細胞毒性。

與未混合 PRP 之材料比較，添加 PRP 混合之材料的 MTT assay 結果，顯示添加 PRP 對於材料細胞毒性無顯著影響。



(二)體外降解行為實驗

實驗方法為將材料經過冷凍乾燥後，測量其重量 (W_0)，隨後放入含有 PBS 的離心管中，再放入溫度為 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培養箱裡，分別經過 4、7、14、28 及 42 天之後取出各組材料，再經相同步驟的冷凍乾燥處理後測量重量 (W_t)，依以下公式計算出降解失重比率，並且記錄 pH 值變化。



在材料置放一段時間之後，記錄其重量與 pH 值的變化，在重量損失部分材料分解約僅 6.7%，而 pH 值則是在 7.2~6.8 之間變化，量測條件為室溫下。

(三)動物熱源試驗

所有動物的體溫量測值皆在 39.8°C 以下，且體溫個別差異在 1°C 間。由測試實驗結果判定材料萃取液內並不含有引發動物熱源的物質存在。

(四)材料內毒素測試

依照中華藥典第六版附錄之”細胞內毒素檢驗法”來進行熱原測試。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，以已知濃度之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。

材料與方法

1. 試劑

- a. LAL 試劑(K50-641W, sensitivity(λ)=0.01 EU/mL)
- b. 內毒素標準品試劑 (CSE, E50-640)
- c. 無熱原水(LRW, W50-640)
- d. 成色基質(S50-640)
- e. 反應終止劑(Stop Solution) -25% v/v Glacial Acetic Acid in Water。

2. 檢量線

- a. 將 CSE 加入 1.0mL 之 LRW 後，攪拌(Vortex)最少 15 分鐘。溶泡後，依試劑所附之確校表，將 CSE 稀釋成 1EU/mL 之效價(Potency)濃度。
- b. 泡製所需試驗標準液之各濃度稀釋液，如下表：

試管	LRW	CSE	濃度
S1	1mL	1mL from 1EU/mL	0.50EU/mL
S2	0.75mL	1.00mL from tube S1	0.25 EU/mL
S3	0.9mL	0.25mL from tube S1	0.1 EU/mL

3. 樣品處理

a. 於 37°C、1 小時條件下，以 10 ml LRW 萃取樣品。

b. 最大有效稀釋倍數(MVD)

醫療器材中內毒素規範值為 20EU/件，測試樣品以 10mL 無菌水浸泡或者沖洗，則最大內毒素可容許量為 20EU/10mL (= 2EU/mL)。所使用的 LAL 試劑之靈敏度(λ)為 0.1EU/mL，則此產品之 MVD 為： $(2\text{EU/mL})/(0.1\text{EU/mL})=20$ 。

c. 樣品測試倍數:以 2 倍稀釋倍數進行實驗。

4. 內毒素含量測試

a. 分別加入陰性對照組(LRW)、檢量線溶液與各稀釋倍數的樣品萃取液於 96 孔盤中。96 孔盤放入加溫器之加溫板上，使 96 孔盤保持 37°C 之溫度。

b. 各加入 50ul 已溶泡之 LAL 試劑於上述 96 孔盤內，反應 20 分鐘。

c. 各加入 100uL 已溶解之成色基質(Substrate)反應 6 分鐘。

d. 當計時到達 6 分鐘時，加入 Stop-Solution 各 100uL。

e. 以波長 405 之 96 孔盤式比色儀判讀。

內毒素含量計算法

a. 幾何平均值之計算：檢品溶液、陽性對照液等，其於依次濃度遞降系列中，最後成陽性之濃度(E)為其終點濃度。按照下列公式計算其幾何平均終點濃度。

幾何平均終點濃度= $(\Sigma e/f)$ 之逆對數值

e：為 E 之對數值

Σe ：為各終點濃度對數值之總和

f：重複試驗次數

b. 內毒素含量之計算：計算檢品內毒素含量濃度之 EU/mL(或 EU/g 或 EU/mg)時，首先計算終點濃度 E，再以各個系列之終點濃度係試度之倒數，乘以 LAL 試劑標誌靈敏度 λ (EU/mL)，而檢品之內毒素幾何平均終點濃度即為 $\Sigma e/f$ 之逆對數值。

結果之判定

檢品之內毒素含量濃度不超過正文中該藥品項下規定之限量者，即符合內毒素檢驗法之規定。

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。為了避免植入式醫療器材在製造過程可能產生的內毒素對人體造成影響，必須審慎測試並評估其使用上的安全性。本研究以 LAL 分析(Limulus Amebocyte Lysate)，來測試水膠、粉狀水膠在使用時可能釋放出的內毒素含量。樣品根據 USP <85>, <161> 文件所敘述的方法與條件進行處理及測試。

二、結論

本研究針對自行研發之水膠與 PRP 混合之醫用骨材進行生物相容性與體外降解性檢測，由實驗結果得知，在水膠材料與水膠材料混合 PRP 進行體外試驗部分，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 量測水膠材料與水膠材料混合 PRP 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，混和 PRP 之後對材料毒性無顯著影響，顯示其生物相容性良好。

體外降解實驗部分，經過近半年的觀察，材料於 PBS 中的降解情形約只有損失 6.7%。而為了避免植入式醫療器材在製造過程可能產生的內毒素對人體造成影響，必須審慎測試並評估其使用上的安全性。植入式醫材中對於內毒素的管制相對嚴格。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。本研究利用動物熱源測試來檢測水膠材料本身是否具有造成動物體溫升高的熱源物質，由實驗結果顯示受試動物無體溫上的可觀察變化，本材料的生物相容性良好。

本計畫所研發合成之有效促進骨缺損癒合之高值化醫療奈米複合骨材，材料本身具有良好的骨傳導性，配合具有骨誘導性的血小板膠，合成極適合作為重建骨缺損材料。而目前產業上開發骨填補材料腳步緩慢的原因，主要皆考量植入人體的風險性高，驗證期程長，研發費用龐大等特點。也因此考量臨床實際應用情形，結合生長因子等具有骨誘導性質的材料與具有骨傳導能力的基材互相結合的複合醫材開發已成為目前骨植入物材料發展的主要方向。

本研究計畫基於以往的研究成果，研發出具有良好生物相容性

之材料混合富有血小板濃厚液(Platelet Rich Plasma, PRP)的複合醫材，並且於老鼠的顱骨缺損動物實驗中獲得初步良好的骨缺損彌補療效。本期研究也透過臨床需求導向與快速上市規畫流程考量，參考國內外測試法規，進行相關實驗設計，完成此複合骨填補材料上市前的療效統計資料，建立符合醫療器材管理風險評估 ISO-14971 精神規範，且合理迅速的新型醫療用骨材材料開發上市流程。未來本研究團隊進行合作結合動物臨床實驗結果共同建立此醫療用骨材之標準植入較大型動物實驗模式，逐次評估生物體內之安全性。

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.