

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

全人工膝關節元件損壞原因之探討及改善方法之研究(III)—子計畫三:金屬對金屬全人工膝關節之可行性探討

計畫編號: NSC 89-2213-E-002-072

執行期限: 88年8月1日至89年7月31日

主持人: 連雙喜 國立臺灣大學材料科學與工程研究所

協同主持人: 宋晏仁 國立陽明大學解剖學研究所

計畫參與人員: 江宏仁 國立臺灣大學材料科學與工程研究所

一、中文摘要

隨著科技的發達,近幾年生醫材料已被廣泛的使用。本篇嘗試使用高壓感應熔煉(HPIM)法來加氮及精煉人工膝關節常用之CoCrMo合金,並測試其生物反應。利用HPIM熔煉,可減少合金內的介在物及偏析,可增加金屬強度及增長材料使用壽命;又加氮可增加合金的表面硬度,可減少磨碎物的產生進而減少發炎反應。

本研究主要分為兩個實驗方向進行:第一,是材料的機械性質,第二是材料和細胞的生物相容性。在機械性質方面,先利用EPMA、x-ray等實驗儀器確認材料的顯微結構和組成,並探討合金的強度與微結構的關係。第二是用不同的表面粗糙度的CoCrMo和鼠巨噬細胞RAW 264.7培養在一起,然後觀察細胞的型態並測量細胞分泌物的多寡來判斷合金是否可被人體接受。利用Elisa reader測量NO、IL-1等細胞分泌物。經過實驗的結果發現,貼附在光滑表面的細胞數比貼附在粗糙表面的少,而光滑表面所產生的細胞分泌物卻比粗糙表面的多。

關鍵詞: CoCrMo、發炎反應、鼠巨噬細胞、細胞分泌物

二、英文摘要

The biological compatibility of implant biomaterials is directly related to their

surface properties. Improper surface processing and alloy manufacturing procedures have been attributed to the harmful effects observed after the implantation of materials and, consequently, have limited the employment of these biomaterials as joint prostheses. However, recent advancement in alloy processing techniques has made it possible to generate metallic biomaterials with improved surface properties that are more biocompatible. The present work utilized addition of nitrogen into Co-Cr-Mo alloys with HPIM (high pressure induction melting) techniques to enhance alloy strength and wear properties. Alloys so melted were examined for nitrogen content, mechanical properties, alloy phases, and hardness. The macrophage RAW264.7 was cultured in the presence of a bacterial endotoxin with various CoCrMo specimens, LPS, as proinflammatory stimulant and production of NO, IL-1 β and TNF by these cells was measured as indicators of inflammatory response. Different surface roughness polished with diamond powder (smooth surface) or wheel grinding (rough surface) had significant impact on cellular responses. The rough surface was significantly more preferable than the smooth surface for macrophages to adhere.

三、緣由與目的

近幾年來,生醫材料不論是在化學或物理性質,甚至在生物相容性也都有相當

的發展。早期，在人工關節置換術中使用聚乙烯 PE 來代替已損壞的股骨(femur)和髌骨(patella)，後來經過臨床的研究，發現到 PE 材料的磨損非常的嚴重。所以發展出金屬對 PE 人工關節，以避免這種情況。雖然已經改善了材料的磨損，但是，經過幾年，發現部分裝有人工關節的病人都有鬆脫的現象；後來經過研究發現，由材料磨損下來的顆粒會產生發炎反應

【1】，例如：NO、IL-1、TNF- α 等。而這些分泌物經過證實會去刺激蝕骨細胞 (osteoclast)，而蝕骨細胞就會使骨質加速流失，最後就會造成生醫材料的鬆脫。基於這些原因，後來又發展出金屬對金屬人工關節改善上述之情況。而常用的材料通常為 CoCrMo 或 Ti6Al4V 生醫材料，在機械性質研究方面，CoCrMo 的耐磨耗性比 Ti6Al4V 好【2】，而生物相容性方面兩者均不錯，因此，我們採用 CoCrMo 作為研究的材料。

商業用的有鑄造 F-75，其碳含量高達 0.35 wt%，有人經過研究發現，C 會對人體產生致癌因子【3】，因此我們研發高氮低碳 CoCrMo，利用密閉式可充保護氣體之電渣重熔爐，可避免精煉鈷鉻鉬合金時氧化，並可得到良好機械性質與耐磨性的 CoCrMo，然後利用氮原子來取代碳原子在合金中的地位，並減少介在物和合金缺陷(bulk defects)，控制顯微組織結構，使材料耐磨性改善及降低碎屑粒子之數目，又有降低致癌因子的優點。

由於此生醫材料，成份上的改變雖然在材料規範內，除了機械性質的測試以外，仍需做生物相容性的測試。當一種材料要植入人體時必須經過層層的生物測試甚至動物實驗後，才能植入人體，以避免和人體組織產生嚴重的反應甚至造成組織的壞死。因此本研究也對材料方面做生物相容的實驗。第一，我們觀察不同氮含量的 CoCrMo 合金及不同表面粗糙度對巨噬細胞的影響；巨噬細胞是人類單核吞噬細胞系統中的一種，具有的功能包括：吞噬病原菌、趨化作用(chemotaxis)、抗原呈現(antigen presentation)、分泌酵素及細胞激

素等物質及抑制腫瘤細胞生長【4】。巨噬細胞在執行這些功能前，必須先讓細胞處於“活化”(activated)狀態，才有能力去完成複雜的功能。可使巨噬細胞活化的物質有很多，包括細胞激素(cytokines)、生長因子(growth factors)、聚落刺激因子(colony-stimulating factors)等，其中被研究最清楚的當屬細菌內毒素。內毒素(endotoxin 或稱 lipopolysaccharide；簡稱 LPS)是革蘭氏陰性細菌細胞膜之主要成分，屬於醣脂質(glycolipid)，其分子之 lipid A 部分是造成內毒素之生物毒性的主要成分。

許多研究對於失效人工植入性合金的離子釋放(ions release)以及因金屬間對磨所產生的合金細屑或粒子所引發的生物毒性著墨甚多，但是對植入性塊狀合金 (bulk) 表面性質對於巨噬細胞生物毒性之影響卻甚少研究。

四、結果與討論

成分分析方面，利用 EPMA (JEOL JXA-9600SX)、ICP-MS、氮氧分析儀(LECO YC-136 782-200)等分析所熔煉的材料，結果如表一。可知實驗室熔煉的 CoCrMo 合金成分和商業用的合金相近，而氮的含量比商業用的高。

在顯微結構方面，先將合金鑲埋、拋光、腐蝕，然後利用光學顯微鏡和 SEM 觀察金相，並使用 Scion image (NIH, 1998) 影像處理軟體分析晶粒型態。如圖一。經過分析後，發現 CoCrMo 鑄錠樹枝狀晶粒會隨著氮含量的增加而減小，其原因可能為氮原子形成氮化物在凝固過程中成為多的核種散佈在金屬液內，樹狀晶粒較小，使得含氮量較高之鈷鉻鉬合金的樹狀晶型態結構較低氮鈷鉻鉬合金小。此種現象亦可以解釋加入氮原子具有強合金的功能，加入氮原子使得樹枝狀晶結構變小會讓晶粒叫不易滑移，造成合金機械性質變佳。

除了 OM、SEM 外，本合金尚利用 X 光繞射做定性分析，判別可能形成的合金相(phase)。圖二分別為 CON0、CON1、CON2

的 XRD 結果，並以 JCPDS CARD 來計量繞射峰的值，發現在此合金中，具有 FCC 及 HCP 兩個混合結晶構造，FCC 的晶格面分別為(111)、(200)、(311)角度分別位於 48.86°、51.06°、92.48°，HCP 的結晶面則為(1010)、(1011)角度則為 41.34°、47.20°。

由圖 3 觀察亦可以發現，FCC 相與 HCP 相的比例會隨著合金氮含量的增加而變化，因為氮原子是 FCC 相的穩定元素，所以當含氮量增加，其合金的 FCC 相也愈加重要，此種 FCC/HCP 的比例與合金的耐磨性和延展性有密切的關係。之前研究提出 FCC 相因為具有較多的滑移系統，所以當合金中 FCC 相比例增加時，其延展性會提高。

鈷鉻鉬合金在不同氮含量的熱處理條件後，以 HV 微硬度測試儀(model MXT 70, MATSUZAWA SEIKI, Japan) 的 Vicker 壓子測得合金硬度值。其數值如表二所示，鑄造鈷鉻鉬合金的硬度會隨著氮含量增加，而有增加的趨勢，表二的數據顯示合金硬度值會隨著氮原子的增加而提高，可見氮原子會強合金的機械性質，這是因為氮原子會阻擋鈷鉻鉬合金中的差排移動，使得高氮的鈷鉻鉬合金硬度增加值。

生醫材料在植入人體之後，與血液及體液直接接觸的地方正是材料表面，以微觀來看，材料表面就是許多原子聚集排列的地方。為了探討鈷鉻鉬合金表面的氮原子是否會影響 RAW264.7 細胞釋放一氧化氮，首先利用鈷鉻鉬合金 CON0 (含氮量 138 ppm) 及 CON1 (含氮量 1370 ppm) 與 RAW264.7 細胞共同培養於一培養皿系統，培養系統給予細菌內毒素 LPS (1 µg/ml) 刺激 RAW264.7，使其產生大量細胞分泌物。由實驗結果發現以不同濃度 LPS 刺激下，CON0 與 CON1 RAW264.7 共同培養後 24 小時所產生的分泌物並無顯著差異。結果顯示合金氮含量並未刺激 RAW264.7 細胞增加 NO 濃度之產製。為了進一步精確地檢證共同培養系統中，合金含氮量是否會刺激 RAW264.7 細胞產生 NO，我們將合金含氮量的差距加大。本實驗使用 CON0(含

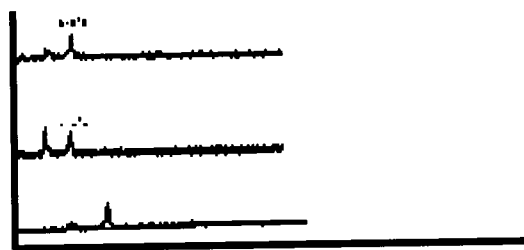
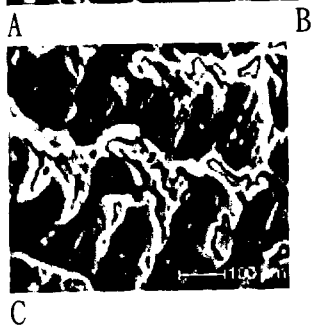
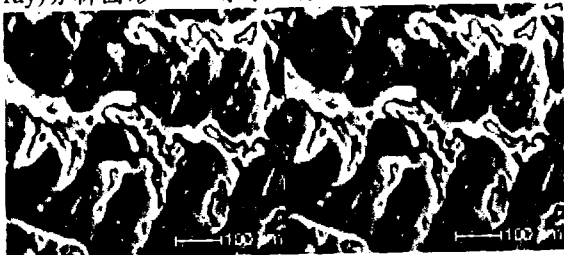
氮量 138 ppm) 及 CON2(含氮量 2880 ppm)，並重複上述的實驗，實驗結果發現不同濃度 LPS 刺激下，CON0 與 CON2 與 RAW264.7 共同培養後 24 小時所產生的分泌物並無顯著差異。再度顯示含氮量的差異並不影響巨噬細胞的活性。

有關合金表面粗糙度和 RAW264.7 細胞釋放分泌物的關係，本研究利用 CON0 及 CON2 的鈷鉻鉬合金分別以 0.1 µm 鑽石粉及砂輪機研磨合金表面，設計兩個粗糙度差異極大之合金表面，並重複上述實驗，由實驗結果(圖三)發現，RAW264.7 細胞與 0.1 µm 鑽石粉研磨過合金表面之合金培養系統中，加入細菌內毒素(LPS 1 µg/ml) 刺激處理組之分泌物均比以砂輪機研磨之合金培養系統來得高，統計結果顯示，彼此之間分泌物的產量有顯著的差異。

骨質的蝕失是因為藉由破骨細胞不斷進行清除老化及改變骨組織，因此破骨細胞扮演主要角色，而巨噬細胞、造骨細胞、T 淋巴細胞及來自骨髓的其他細胞分泌之細胞激素則扮演協助的角色。噬骨細胞進行蝕骨作用主要透過兩種途徑，一是破骨細胞數增加，其次是活性增加，在這過程中細胞激素可能扮演活化破骨因而加強其活性表現【5】。以前的研究量測已活化之白血球之培養上清液，結果發現上清液中含有 TNF-α 會促使培養骨組織發生骨質蝕失的現象，在 1993 年 Roodman 亦證實了除了 TNF-α 之外，IL-1β 等細胞激素亦具有活化破骨細胞的功能(Roodman, 1993)。這些實驗證實細胞激素的確在發炎反應及骨質蝕失的機轉中，扮演著重要的角色。就植入性人工膝關節生物力學角度而言，為了降低關節磨耗係數以增加使用年限，在設計關節的同時，常將合金表面研磨得十分細緻，本研究的結果顯示，細緻鈷鉻鉬合金表面反而會增加鼠巨噬細胞株 RAW264.7 的 NO 及細胞激素產量，為了降低人體組織內的 NO 及細胞激素以避免發生骨蝕失現象，今後應該在關節合金製程及設計上增加不需對磨部分合金表面粗糙度。

	F-75	CON0	CON1	CON2
Co	Bal.	Bal.	Bal.	Bal.
Cr	27-30	29.5	29.93	29.163
Mo	5-7	6.005	5.912	6.005
Ni	1	0.155	0.0146	0.152
Fe	0.75	0.112	0.56	0.101
Si	1	0.049	0.028	0.039
C	0.35	0.027	0.031	0.016
N	-	0.0138	0.1371	0.2883

(表一) 鈷鉻鉬鑄錠的 EDX(Energy Dispersive X-ray)分析圖形 wt%原子百分比, wt%重量百分比

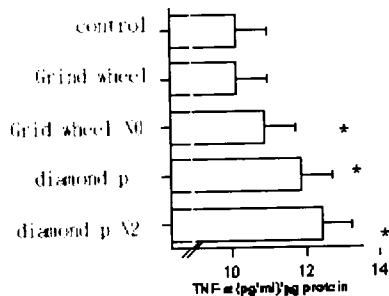


圖二. CoCrMo 鑄錠的 X-ray 繞射圖形, 由繞射圖 (X-ray diffraction chart) 所求之繞射峰(peak) 之θ角, 利用Bragg's Law: $2d\sin\theta=n\lambda$, 其中
d: 晶體原子面距離
θ: 繞射角度
λ: 入射X光的波長求出合金晶格

	HV
CON0	331.887

CON1	335.875
CON2	339.354

(表二) CoCrMo合金硬度表



(圖三) The effect of surface morphology of CON0 and CON2 on TNF-α production by Raw264.7 cells in response to 1 μg/ml LPS treatment (n=6)

六、參考文獻

1. Gebhard, J.S., Amstutz, H.C., Zinar, D.M., and Dorey, F.J. (1992). A comparison of total hip arthroplasty and hemiarthroplasty for treatment of acute fracture of the femoral neck. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 123-131
2. Wang, R.R., Welsch, G.E., and Monteiro, O. (1999). Silicon nitride coating on titanium to enable titanium-ceramic bonding. *Journal of Biomedical Materials Research* 46, 262-270.
3. Lasfargues, G., Lison, D., Maldague, P., and Lauwerys, R. (1992). Comparative study of the acute lung toxicity of pure cobalt powder and cobalt-tungsten carbide mixture in rat. *Toxicology & Applied Pharmacology* 112, 41-50
4. Territo, M.C. and Cline, M.J. (1977). Monocyte function in man. *Journal of Immunology* 118, 187-192.
5. Roodman, G.D. (1993). Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcified Tissue International* 53 Suppl 1, S94-S98