

國立臺灣大學醫學院暨工學院醫學工程學研究所



碩士論文

Institute of Biomedical Engineering

College of Medicine and College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

使用超音波刺激之全椎間盤培養系統之開發

Development of an Ultrasound Stimulated Whole Disc

Culture System

楊子巧

Tzu-Chiao Yang

指導教授：王兆麟 博士

Advisor: Jaw-Lin Wang, Ph.D.

中華民國 105 年 8 月

Aug, 2016

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

使用超音波刺激之全椎間盤培養系統之開發
Development of an Ultrasound Stimulated Whole Disc
Culture System

本論文係楊子巧君（學號 R03548045）在國立臺灣大學醫學工程
學研究所完成之碩士學位論文，於民國 105 年 8 月 18 日承下列考試
委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

王北麟

（指導教授）

趙丰秀

劉浩禮

所長：

醫學院、工學院醫學
工程學研究所長 陳中明




誌謝

走過這兩年的碩士生涯，首先想要感謝指導教授王兆麟老師在這兩年的教導，不論是在實驗上的教學或是處理問題的方式，感謝老師包容我曾經犯過的錯誤。另外還要感謝老師提供我們出國的機會，第一次去美國覺得好大好新奇，第二次的時候因為 Oral 覺得很緊張(再度感謝老師幫忙救援 Q&A)，都是難能可貴的回憶！

剛進實驗室時，很喜歡實驗室融洽的氣氛，感謝當時的博班學長文凱在我們還是嫩嫩碩零時教導我們各種知識，雖然你半年後就離開實驗室了 QQ，不過從你那傳承下來的 D80 在這一年半間記錄了許多美好的畫面，謝謝文凱帶我入相機坑。感謝 Andy 哥在一年級上學期時教導我們有關臨床方面的概念與思考，還有在準備 ORS 的 Oral 時也給了我許多建議，雖然常常會害怕跟你搭話但還是感謝你這兩年的照顧！感謝進實驗室前就畢業的博班學長于鈞，在我碩二開始做培養之後給予了許多建議，雖然最後還是沒有養成功 QQ，但很感謝你不厭其煩地回答我的各種問題！感謝當時的碩二允辰、佳慶、碩亨、典翰，你們都是很有趣的人！另外要特別感謝典翰在回來當研究助理時給予的幫助與建議，希望你在國外能夠順利完成學業，我會記得你抱著兔兔或鸚鵡甩他們的手打人的情景的哈哈。

感謝一起度過一年的學長姊們——俐好、家豪與宗興。俐好只能用猛來形容，在校時就創業畢業後直接變成副總！感謝你在我準備 Oral 期間讓我問了許多問題幫助我建構要說的故事。家豪是拍照好夥伴，想當年去美西旅遊時我們一堆攝影團，好喜歡你拍我拿相機的那一張~~~等著看你接下來的作品！另外也懷念我們一起剃豬頸椎的時候，肉好好吃喔可惜現在沒在做頸椎了。宗興衝的梗每次看到宗興就會再度想起來，身為 A 區魯三人好夥伴在你畢業後我也努力的一個人鎮守在 A 區。

感謝這兩年來一起走過來的敬婷與鈺堂。不管說了什麼笑話或冷梗，林敬婷總是很捧場反應很快很常找到梗在哪，然後每次都會說很跳 tone 的夢境，能跟你一起說冷笑話真的是一件很開心的事！也感謝你平時的幫忙，還記得碩零的暑假時



我把雨傘忘在公館捷運站就回淡水了，沒想到你居然去捷運站幫我看雨傘還不在，直到現在想起來都還覺得感動，謝謝你。石鈺堂是實驗室最可靠的支柱，是最常問問題的對象，每次你說你懂嗎的時候我還在消化前面的長篇大論不知道該說懂還不懂，然後還有很多時候我們會誤解彼此的意思，但在我心中還是認為你是良師益友。

感謝碩二這一年陪著我們東奔西跑的碩一好戰友們——柏鈞、淳風、茂維。嚴柏鈞以後在台北的大學同學們揪出來盡量出現啦，不然他們都說我跟你不合排擠你。風哥太 carry 了，感謝你在很多事情上的幫助，身為超音波組的設備工程師剩下一年繼續加油！感謝茂維這一年來跟著我做實驗，真的是非常任勞任怨的學弟我都要哭了，希望未來一年可以看得出一些成果順利畢業！

感謝雅林學姊這半年來的幫助，身為實驗室的即戰力，在生物方面有學姊的幫忙感覺踏實了許多，然後在最後幾個月也拉著你發了一些牢騷哈哈，謝謝你聽我說話~希望你之後待在實驗室的日子能順順利利，你一定可以做到的！加油！

實驗室好朋友的毓甯以及碩零的如意、姿萱、恬君、漪翎、振學，歡迎你們來到這個實驗室，希望你們在實驗室能度過開心且有意義的時間！還有要跟家琪學長說掰掰，雖然身為隔壁桌但只有到最後幾個禮拜才有跟學長聊天，希望你在走出自己的路後能夠實現自己想做的事。

感謝琦美姊、黃姊和宇寧姊這兩年的照顧，在許多行政方面的事情上幫了很多忙。感謝在實驗上給予幫助的大家：回答我許多培養方面問題的潘兆萱、劉邦欽和溫新民學長、幫我分析材料的陳允友、提供市場檢體處理方法的一家學妹、讓我們借用並幫忙操作 Confocal 的 Double 老師家的孫宇均學長、幫我取二次水的文齊以及聽我發牢騷的大學同學們。

最後要感謝我的家人們在生活上給予的支援與體諒，謝謝。

中文摘要



目的：開發含有超音波刺激的全椎間盤培養系統，包含生物反應器之設計與特性探討、超音波刺激系統之建置與校正以及豬隻椎間盤的培養測試。

背景簡介：椎間盤退化是常見的脊椎病變，臨床上除了在退化末期使用侵入手術方法治療以外，目前尚未有有效的預防方法。低能量脈衝式超音波(Low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)是個安全且非侵入式的治療方法，已被證明可以用來促進骨折癒合與骨質增生。LIPUS 已被證明於細胞層級可以促進髓核細胞的增生與細胞外基質之合成，但就組織與器官層級而言尚未見到相關的研究。本研究目的為開發一全椎間盤培養系統，此一系統可用於日後椎間盤生物與生化性質、分子擴散量、流變學及動力學、組織結構是否會因 LIPUS 刺激而改善的研究。

材料與方法：(一)全椎間盤培養系統之設計：系統包含生物反應器、培養液循環系統、氣動負載系統與超音波系統，生物反應器提供裝有培養液的營養環境；培養液循環系統供給椎間盤養份循環(流速 200 μ l/min)；氣動負載系統模擬椎間盤於人體內所受到的負載(16 小時動態負載 0.2-0.8MPa 0.2Hz；8 小時靜態負載 0.2MPa)；超音波系統則提供給椎間盤超音波刺激。(二)超音波探頭校正：使用聲功率計與超音波機台將探頭的輸出能量調整與額定能量(0.2W, 1W, 2W, 3W)相符，先調整探頭的最大響應頻率，再調整放大倍率。(三)生物反應器內能量場分布量測：使用 1MHz 沉水式探頭和熱電偶分別從量測能量與升溫來觀察生物反應器內的能量場分布，施打超音波頻率為 1MHz、能量為 3W。沉水式探頭量測生物反應器內 7 個空間點的能量，並使用 MatLab 中的 3D 繪圖表示；熱電偶量測施打 15 分鐘超音波後，置入椎間盤前後周圍環境的升溫差異，以及椎間盤內部的升溫現象。(四)豬隻椎間盤培養測試：為了驗證本系統在培養豬隻椎間盤時能達到一定的存活率，將豬隻椎間



盤分為新鮮試樣組(0 天)與培養 7 天試樣組，新鮮試樣組在試樣處理完後，進行細胞存活測試；培養 7 天試樣組則先進行培養，7 天後取出進行細胞存活測試，並比較兩組的存活率。

結果：(一)超音波探頭校正結果中，額定能量與輸出能量的線性斜率接近 1，可確定此探頭為準確的輸出源。(二)量測生物反應器內的能量場，沉水式探頭量測結果顯示超音波發射源正前方的能量不易衰退，但往上下左右偏離時量測到的能量變小許多；熱電偶量測結果顯示升溫無法判斷能量於生物反應器內的分布情形，但從中得知能量有傳遞至椎間盤內並轉化成熱量被吸收。(三)培養的豬隻椎間盤試樣目前無法存活至 7 天，為了解培養其間細胞存活率的變化，改為拍攝 3 天與 6 天之 Live/Dead 影像，0 天與 3 天存活率較接近，6 天則有明顯的下降。培養時感染的情形嚴重，推測可能原因為試樣取得來源、操作手法以及設備問題。

結論：使用超音波刺激之全椎間盤培養系統的硬體建置已完成，包含確定探頭打出能量、基本的能量分布狀況，另外，也透過升溫現象確認超音波可打入組織內並使其吸收。目前本研究中感染為此設備尚未解決的問題，因無法順利培養豬隻椎間盤至 7 天，仍需持續改善。

關鍵字：全椎間盤培養系統、低能量脈衝式超音波、超音波校正

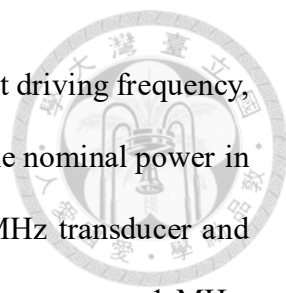
Abstract



Objective: To develop a whole disc culture system with ultrasound stimulation.

Summary of background data: Intervertebral disc degeneration is one of the most common spinal disorders. Nevertheless, no effective treatment or preventative strategies are available in the management of degenerative disc disease. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS), which has been proved to be affective in assisting bone healing and stimulating bone growth, is a safe and non-invasive treatment modality. Bench top studies conducted at the cellular level have shown the evidence of LIPUS stimulation in nucleus pulposus proliferation and extracellular matrix regeneration. Nevertheless, the potential effect of LIPUS on the intervertebral disc at tissue or organ level are yet to be explored. Therefore, the goal of the current project is to develop an ultrasound stimulated disc culture system used for the study of effectiveness of LIPUS on the biomechanical, biological and biochemical properties of the degenerative disc.

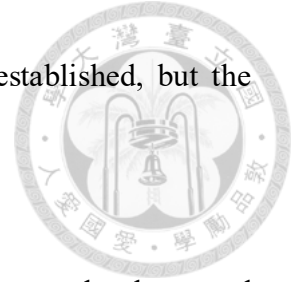
Methods: (1) Development of the disc culture system: The system includes bioreactor chamber, media circulation system, pressure loading system and ultrasound system. The bioreactor chamber served as a culture environment for disc. Media circulation system supplied disc nutrient cycling with flow rate 200 μ l/min. The loading system mimics the daily disc loading in human body, which provided the dynamic loading at 0.2-0.8 MPa for 16 hours and static loading at 0.2 MPa for 8 hour. The ultrasound system was able to stimulate the disc at different power, frequency, and duty cycle. (2) Calibration of ultrasound probe: Acoustic power meter and ultrasound machine were used to calibrate



the output power of probe. First, the frequency was tuned up to its best driving frequency, then the magnification was adjusted to match the output power and the nominal power in 0.2W, 1W, 2W, 2W. (3) The energy field inside the bioreactor: 1 MHz transducer and thermocouples were used to measure the energy field. The input frequency was 1 MHz, and the power was 3 W. This experiment is divided into two parts. In the first part, we measured ultrasound energy in seven points inside bioreactor. In the second part, we recorded temperature in 15 mins with and without disc, and calculated the temperature rise and heating rate. (4) Organ culture test using porcine discs: Live/Dead assay were used for the assessment of disc viability. To verify the survival rate, discs were assigned to two groups, the intact group and the cultured group. The cell viability rate of the intact group was measured at day 0, and the cultured group was measured after 7 days of incubation.

Result: (1) The calibration rate of ultrasound probes are closed to one, the probes are therefore determined as accurate output sources. (2) From the measurement of energy field inside the bioreactor, we knew that output energy did not attenuate in front of ultrasound probe, but it reduced when transducer moved to other two directions. In addition, the results of thermocouple have shown that the energy passed through the disc and was absorbed. (3) Specimens did not survive over 7 days at present; thus, two groups were changed to three groups for better understanding of the cell viability in the culture process, which were intact group, 3 days group, and 6 days group. The cell viability rates of intact group and 3 days group were close, but the 6 days group shown a significant decrease. The potential infection risks may be the source of specimen, such as the endophyte generated inside the disc, human contamination, and liquid leakage from the connections of bioreactor.

Conclusion: The construction of whole culture system has been established, but the infection is an issue that needs to be solved.



Keywords: whole disc culture system, low-intensity pulsed ultrasound, ultrasound calibration

目錄



誌謝.....	I
中文摘要.....	III
Abstract.....	V
圖目錄.....	X
表目錄.....	XII
第一章 緒論.....	1
1.1 椎間盤的基本構造.....	1
1.2 椎間盤退化.....	1
1.3 超音波於醫療方面的應用.....	2
1.4 低能量脈衝式超音波於細胞方面的研究.....	3
1.5 體外全椎間盤培養.....	3
1.6 實驗目的.....	4
第二章 材料與方法.....	5
2.1 全椎間盤培養系統之設計.....	5
2.1.1 生物反應器.....	5
2.1.2 培養液循環系統.....	7
2.1.3 氣動負載系統.....	7
2.1.4 超音波系統.....	10
2.2 系統測試.....	10
2.2.1 超音波探頭校正.....	10
2.2.2 生物反應器內環境能量場量測.....	12
2.2.3 豬隻椎間盤培養測試.....	16
第三章 實驗結果.....	19



3.1	超音波探頭校正	19
3.1.1	探頭校正結果.....	19
3.1.2	自製機台與市售聲功率計的量測數值比較.....	19
3.2	生物反應器內環境能量場量測	20
3.2.1	能量量測	20
3.2.2	溫度量測	21
3.3	豬隻椎間盤培養	23
3.3.1	試樣培養天數.....	23
3.3.2	細胞存活比.....	23
第四章	討論	25
4.1	自製聲功率計量測結果討論	25
4.2	生物反應器內超音波場能量量測討論	25
4.3	生物反應器內超音波場溫度量測討論	26
4.3.1	施打超音波時急速升溫現象討論	26
4.3.2	各位置於放置椎間盤前後之溫度差異.....	28
4.3.3	熱電偶於生物培養器內升溫原因討論.....	28
4.4	豬隻椎間盤培養感染可能原因討論.....	29
4.4.1	感染培養液之觀察	29
4.4.2	感染可能原因討論	30
4.4.3	培養天數與感染原因的關係討論	31
4.5	實驗限制.....	32
第五章	結論與未來展望	34
5.1	結論	34
5.2	未來展望.....	34
參考文獻	35

圖目錄



圖 1.1 椎間盤結構示意圖	1
圖 2.1 放置於生物培養箱內的全椎間盤培養系統	5
圖 2.2 自製生物反應器	6
圖 2.3 培養液循環系統示意圖	7
圖 2.4 動力系統配置示意圖	8
圖 2.5 單動向氣壓缸 (A)實體圖 (B)壓力與推力的關係圖	8
圖 2.6 負載系統整體示意圖	9
圖 2.7 控制系統配置圖	9
圖 2.8 超音波機台 ULS-1000, ZMI, TW	10
圖 2.9 市售聲功率計 UPM-DT-10AV, OHMIC, USA	11
圖 2.10 (A)自製聲功率計示意圖 (B)量測原理示意圖	12
圖 2.11 (A) 超音波場量測實驗儀器架設 (B) 1MHz 沉水式探頭套上 90 度反射鏡	13
圖 2.12 溫度量測實驗儀器架設.....	14
圖 2.13 量測生物反應器內超音波場實驗流程架構	14
圖 2.14 熱電偶配置示意圖	15
圖 2.15 溫度量測參數示意圖	16
圖 2.16 細胞存活觀察實驗流程架構	17
圖 2.17 椎間盤橫剖面示意圖	18
圖 2.18 影像分析流程圖	18
圖 3.1 自製機台量測精準度	20
圖 3.2 各點於空間分佈中的數值大小	20
圖 3.3 無椎間盤時不同位置之溫度差	21

圖 3.4 無椎間盤時的溫度變化率.....	21
圖 3.5 放置椎間盤時不同位置之溫度差.....	22
圖 3.6 放置椎間盤時不同位置之溫度變化率.....	22
圖 3.7 培養試樣存活天數.....	23
圖 3.8 三個組別拍攝的活/死細胞分佈影像圖.....	24
圖 3.9 細胞存活比.....	24
圖 4.1 無椎間盤時施打超音波時的溫度變化圖.....	27
圖 4.2 放置椎間盤時施打超音波的溫度變化.....	27
圖 4.3 各位置於放置椎間盤前後的溫度差比較.....	28
圖 4.4 各位置於放置椎間盤前後的溫度變化率比較.....	28
圖 4.5 於第 1 日失敗之試樣培養液照片(左) 培養液顯微鏡照片(右).....	29
圖 4.6 於第 6 日失敗之試樣培養液照片(左) 培養液顯微鏡照片(右).....	30
圖 4.7 生物反應器中容易漏水處.....	31



表目錄



表 2.1 LIVE/DEAD 染劑特性表	18
表 3.1 探頭校正精準度	19
表 3.2 自製機台與市售聲功率計量測數值比較.....	19

第一章 緒論



1.1 椎間盤的基本構造

椎間盤位於脊椎兩椎體之間，作為連接上下兩椎體的纖維軟骨盤，具有緩衝、吸震、承受外力等作用。椎間盤主要由中央的髓核(Nucleus pulposus, NP)、外圍的椎間環(Annulus fibrosus, AF)以及位於上下連接椎骨的椎終板(Endplate)三部份所組成，髓核主要組成第二型膠原蛋白以及蛋白多醣¹⁻³，其中蛋白多醣具有高度親水性容易吸引水分子，因此椎間盤內含有大量的水分，在承受壓力時可以將負載均勻分散，藉此承受來自身體各方的壓力、緩衝過多的應力⁴；椎間環主要由第一型與第二型膠原蛋白所組成，第一型膠原蛋白主要集中於外層，排列較為平行，內層的纖維束走向則近於十字交錯⁵，多層的纖維束組成的層狀結構使椎間環相當穩固，除了可防止水份從髓核處向外流出維持其靜水壓以外，還可保持脊柱的穩定性，使椎節和椎節間不會走位；椎終板是高度小於1mm的纖維軟骨，上頭有許多微孔，為進行養分傳輸與新陳代謝的重要通路，對於無血管分布的椎間盤而言，是獲得養分的主要來源^{6,7}。

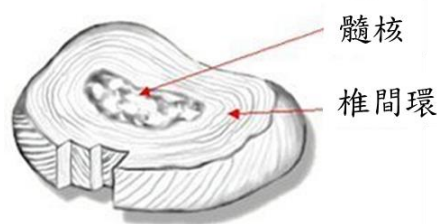


圖 1.1 椎間盤結構示意圖

1.2 椎間盤退化

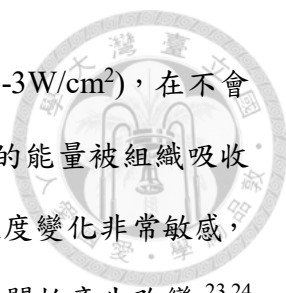
椎間盤退化是常見的脊椎病變，主要造成原因為人體的自然老化，此病症隨著社會老化人口增加而增加。常見的成因為髓核內的組成成分因老化使得內部結構逐漸改變^{8,9}，第一型膠原蛋白增加、第二型膠原蛋白與蛋白多醣減少⁷，第一型膠

原蛋白增加表示椎間盤內逐漸纖維化，而蛋白多醣的減少影響椎間盤的保水能力，產生脫水現象，含水量降低表示傳遞及緩衝外力的能力降低，進而改變整個椎間盤的受力結構¹⁰，將承受外力的結構從髓核轉移至椎間環，長期下來，椎間環容易出現裂縫¹¹，導致椎間盤突出，進而引發下背痛(Low back pain)或其他相關病症^{12,13}。

治療脊椎退化可分為保守治療方法與外科治療方法，保守治療方法主要運用藥物治療與物理治療同時配合¹⁴，目標為減緩患者的病症。當保守治療方法無法舒緩病症時，會採取外科治療方法，常見治療方式有脊椎融合手術¹⁵、椎間盤置換¹⁶、椎間盤修補¹⁷、椎間盤再生等。除了在退化末期使用侵入式手術方法治療以外，尚未有有效的預防方法。目前在治療或預防椎間盤退化的想法是希望能藉由椎間盤細胞的增殖，能夠恢復細胞功能與緩解椎間盤的退化速度。主要作法有二：一是施打可促進細胞活性的生長因子，例如 TGF- β 、IGF-1、bFGF 等，促進細胞合成基質，提升椎間盤內基質的合成程度¹⁸；二是將椎間盤細胞或幹細胞移植入椎間盤內維持細胞數¹⁹⁻²¹。不論實施何種方法，都需要將載體植入椎間盤內，屬於侵入式的治療方法。因此，即便此類治療有效，仍有待證明其效益會大於因手術實施所帶來的風險與傷害。

1.3 超音波於醫療方面的應用

超音波在現今的醫療當中已被廣泛運用，主要應用於醫學影像與治療上。用於影像的頻率約在 2-15MHz、能量約在 0.05-0.5W/cm² 之間²²，頻率越高解析度越高，但相對的穿透深度會降低。醫學影像的原理為超音波探頭產生聲波打入人體，聲波於不同組織之間的界面會反射，探頭接收到反射的回波後，分析經過時間與信號強度等數據，並以圖形呈現。治療用的超音波使用的頻率較低，常見的頻率為 0.8MHz-3.3MHz，能量依照用途不同分為高能量超音波與低能量超音波。高強度聚焦超音波(High-intensity focused ultrasound, HIFU)利用大面積的探頭，得到較好的幾何聚焦特性，透過於焦點處產生高時間平均強度的超音波，用於燒灼腫瘤、震碎腎結石等治療，能量強度約於 0.2-100 W/cm² 之間。低能量脈衝超音波(Low-intensity pulsed



ultrasound, LIPUS)相對於高能量的 HIFU 使用較低的能量($0.005-3\text{W}/\text{cm}^2$)，在不會產生高熱和組織破壞性的同時保有聲波的機械傳遞能力，打出的能量被組織吸收後，因能量小的緣故升溫不超過 1°C ，有些酵素對於這種微小的溫度變化非常敏感，如基質金屬蛋白酶(MMP-1)，受到刺激的酵素作用使得內部成分開始產生改變^{23,24}，常被利用於促進骨癒合等物理治療。

1.4 低能量脈衝式超音波於細胞方面的研究

低能量脈衝式超音波相關的研究多為硬骨組織，如骨癒合方面的研究，於軟組織相關的研究甚少，不過這幾年有逐漸增加的趨勢。與椎間盤相關的研究中，Miyamoto et al. 2005²⁵ 使用 1.5 MHz , $30\text{ mW}/\text{cm}^2$ 之 LIPUS 刺激羊椎間盤細胞，發現內外椎間環的蛋白多醣含量有增加的現象。Hiyama et al. 2007²⁶ 使用 1.5 MHz , $30\text{ mW}/\text{cm}^2$ 之 LIPUS 刺激狗髓核細胞，發現了生長因子 TGF- β 1 的基因表現增加，另外也觀察到多醣蛋白的合成以及水份的增加。Kobayashi et al. 2009²⁷ 使用 1.5 MHz , $15-120\text{ mW}/\text{cm}^2$ 之 LIPUS 刺激人體椎間核細胞，發現蛋白多醣增加，一些生長因子的基因表現與受體，如 BMP2, FGF7, TGF β 1, EGFRF1, VEGF，也有增加的趨勢。細胞層級的研究已有些許成果可以證明 LIPUS 可以促進椎間核細胞的增生與細胞外基質之合成，但就組織與器官層級而言尚未見到相關的研究。

1.5 體外全椎間盤培養

研究椎間盤的治療方法時，驗證治療方法是否有效主要由生物與生化測試以及力學測試來觀察判斷。生物與生化測試觀察的是微觀的變化，如細胞內水分含量、多醣蛋白含量、膠原蛋白含量等生化方面參數的變化以及細胞活性、DNA 改變、細胞數量多寡等生物方面的參數。力學測試則是由巨觀呈現出的功能性來判斷變化，受測試樣需為完整椎間盤，測量參數通常為流變性質與動態性質。最佳的驗證治療方式為進行動物實驗，並取出活體椎間盤試樣進行測試，但此方法費用昂貴、飼養費時不易，且同時有道德倫理的衝突與考量。因此，許多學者退而求其次，將

細胞移植至培養基上，並進行生化測試，可能因為細胞脫離原本生長環境，測試結果多顯示細胞存活率及分化能力降低²²，且實驗成效僅侷限於細胞階段，無法驗證對於整體椎間盤的影響。

為了瞭解整體椎間盤的功能表現，近年來有學者開始進行椎間盤的體外培養²⁸⁻³⁰，此方法保留完整椎間盤構造並利用系統模擬符合其生理條件的環境。但此培養方式較為複雜，必須克服養分傳輸及失去椎骨構造限制可能產生的膨脹問題，因此有學者提出保留上下椎終板並使用抗凝血劑減少血塊阻塞^{31,32}，同時將椎間盤置於含有高濃度葡萄糖的培養液中，配合模擬正常椎體受力之動態式外力負載^{29,30,33}，並將整體系統放至於恆溫 37°C 之生物培養箱。

1.6 實驗目的

若能以椎間盤培養的方式檢驗退化椎間盤之生物與生化性質、椎間盤內分子擴散量、流變學及動力學與組織結構是否會因 LIPUS 刺激而改善，對於治療退化性椎間盤而言，則多出了一個非侵入式的治療選擇，有其發展的價值。所以本實驗目的為開發含有超音波刺激的全椎間盤培養系統，包含生物反應器之設計、超音波刺激系統之建置與校正與豬隻椎間盤的培養測試。

第二章 材料與方法



2.1 全椎間盤培養系統之設計

本實驗室先前已設計過一套全椎間盤培養系統，本研究以原型版本為概念，加入超音波刺激的功能，設計了新一代的全椎間盤培養系統。此系統包含了生物培養箱、生物反應器、培養液循環系統、氣動負載系統以及超音波系統。椎間盤放入裝有培養液之生物反應器內，再置入生物培養箱(恆溫 37°C、二氧化碳濃度 5%的無菌環境)進行培養；培養液循環系統供給椎間盤養份循環；氣動負載系統則是模擬椎間盤於人體內所受到的負載。

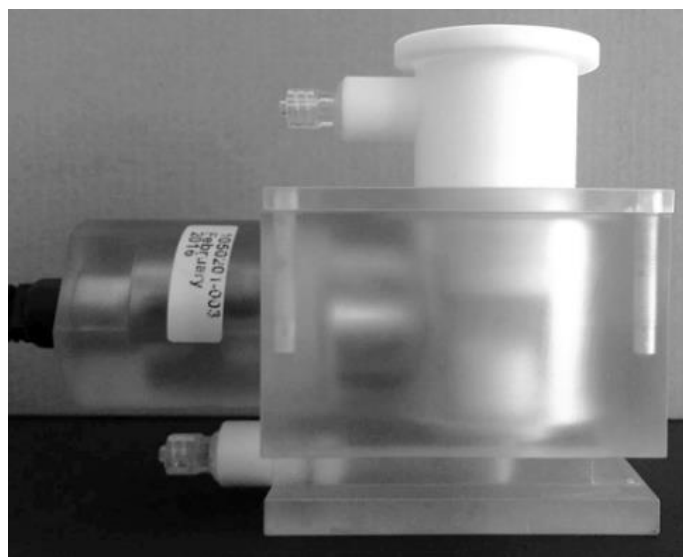


圖 2.1 放置於生物培養箱內的全椎間盤培養系統

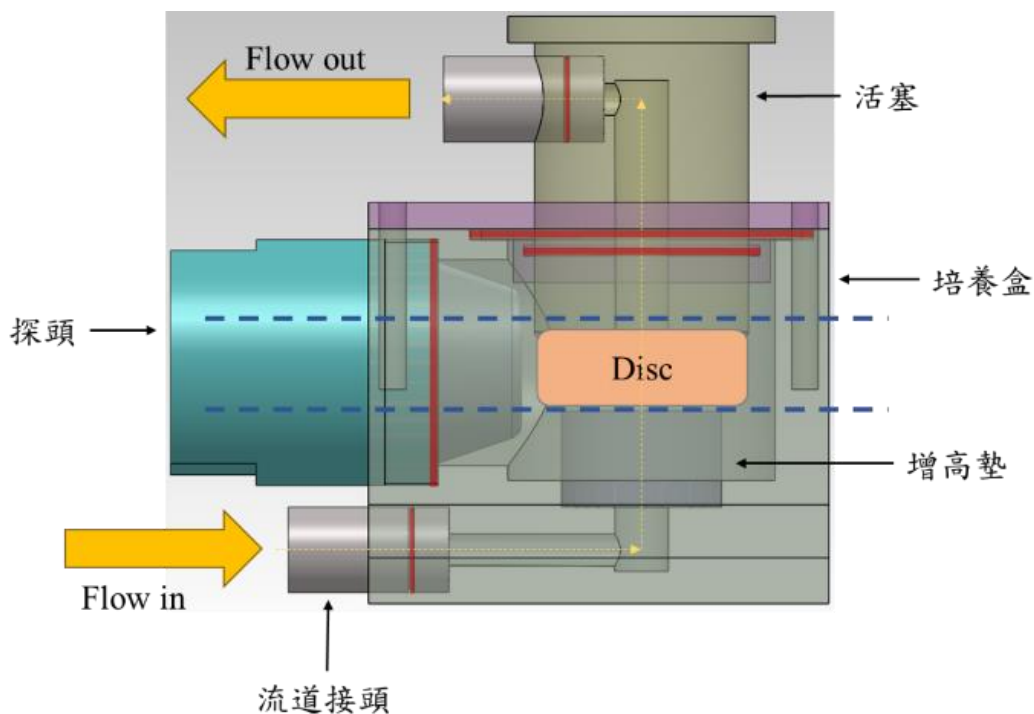
2.1.1 生物反應器

本研究設計之生物反應器包含一活塞、培養盒上蓋、培養盒、探頭塞、增高墊、兩個流道接頭、五個 O 型環及兩個靜脈帽(圖 2.2)。基於耐久性與生物相容性的考量，活塞、增高墊及流道接頭三部分材質選用聚四氟乙烯(俗稱鐵氟龍，polytetrafluoroethylene, PTFE)。培養盒上蓋、培養盒以及探頭塞三部分則使用聚碳

酸酯作為其材料。O型環選用生物相容之矽膠材質，分別配置在各部件接合處，用以防止動態負載作用期間培養液從接縫處洩漏流出。為方便接管，將作為快速接頭之靜脈帽以生物組織膠(Vetbond, 3M, USA)黏著於流道接頭上。兩個流道接頭分別為培養液的入液口及出液口，其位置位於培養器的下方及上方。



(A) 自製生物反應器側面照



(B) 自製生物反應器示意圖

圖 2.2 自製生物反應器



2.1.2 培養液循環系統

培養液循環系統用來模擬椎間盤於活體內養份傳輸的狀況(圖 2.3)，主要組成部件分為兩大部分，第一部分為存放培養液之血清瓶，血清瓶的蓋子使用自製的三孔蓋，其作用為吸取培養液、回收培養液以及氣體交換，氣體交換的孔會接上針筒過濾器(混和纖維膜製成、孔徑 $0.22\mu\text{m}$)過濾氣體中的顆粒與細菌。第二部分為放置於培養箱外部的微量蠕動式幫浦(TP400T, ChromTech., USA)，用以提供運輸動力，使培養液經由蠕動式幫浦的連續推動下前進，流速設定為 $200\mu\text{l}/\text{min}$ 。整體循環系統使用矽膠管相連，為防止培養液釋出速度過慢導致液體從接合處溢出，所以管徑採用小口徑入液管(內徑 2mm)及大口徑出液管(內徑 4mm)。

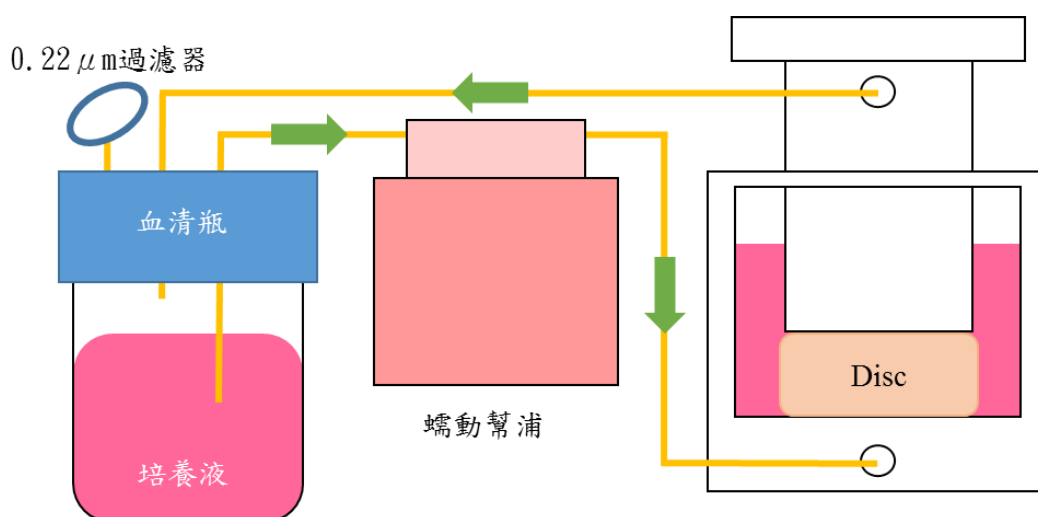


圖 2.3 培養液循環系統示意圖

2.1.3 氣動負載系統

氣動負載系統用來模擬人體內椎間盤的實際生理環境，如圖 2.4 所示，選用單動向氣壓缸(CSA 40X30, Koganei, Japan)配合空壓機(JA 12-40, Jun-Air, USA)、調壓閥與電磁閥組成的控制系統，每日給予椎間盤 16 小時的動態負載($0.2\text{--}0.8\text{MPa}$, 0.2Hz)及 8 小時的靜態負載(0.2MPa)。

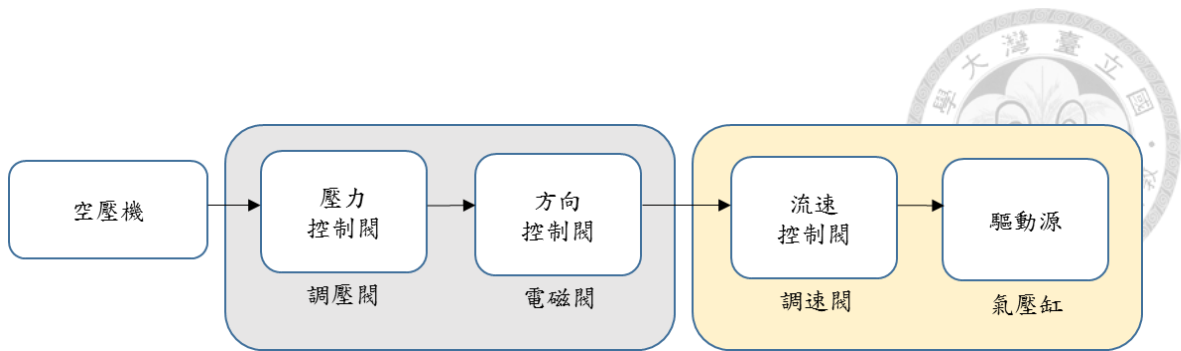


圖 2.4 動力系統配置示意圖

選用之單動向氣壓缸，缸徑 40mm、行程 30mm、推力在輸入氣壓 1MPa 下可達 1200N，可根據需要的施力調整輸入氣壓大小(圖 2.5)，此類型氣壓缸的空氣由單邊進出，當空氣進入時前方的活塞被推出，當壓力源消失時活塞會靠內裝彈簧自行復位。負載系統的架設為四組氣壓缸放置於不鏽鋼架板上，架板由不鏽鋼導桿及導桿架固定，底板則是設計用來放置生物反應器，使其在受到動態負載時能夠固定在原位(圖 2.6)。

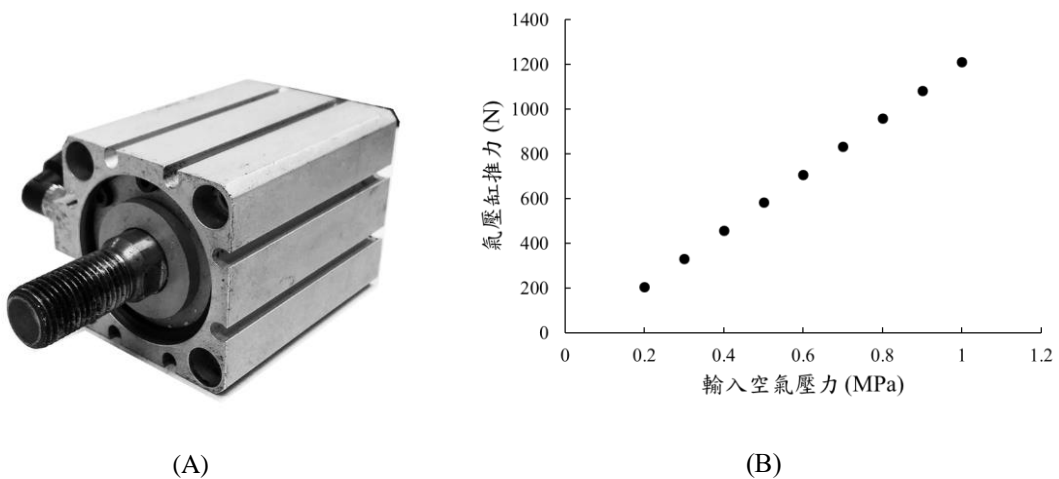


圖 2.5 單動向氣壓缸 (A)實體圖 (B)壓力與推力的關係圖

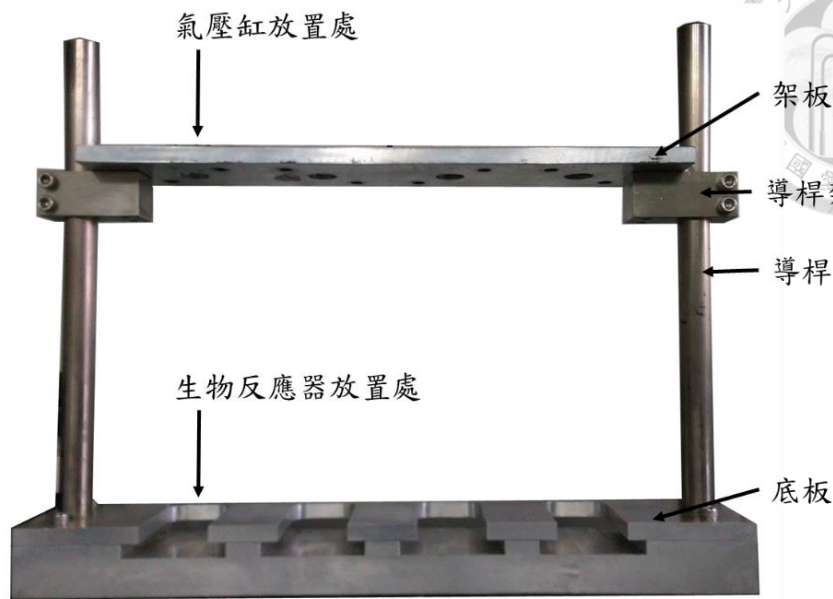


圖 2.6 負載系統整體示意圖

控制系統如圖 2.7 所示，以五口二位的電磁閥搭配計時器來調控氣壓大小及給氣頻率。當計時器 1 為 on 時為動態負載時期，60psi 的氣體會通過電磁閥，同時計時器 2 開始以 0.2Hz 的頻率持續開關，控制兩組電磁閥使其輪流進氣，此時氣壓缸呈現兩組推出、兩組彈回的情況，此設計是為了避免同時施力導致架板無法負荷。當計時器 1 為 off 時為靜態負載時期，20psi 的空氣會通過前後方的電磁閥，同時供給四組氣壓缸進行靜態負載。

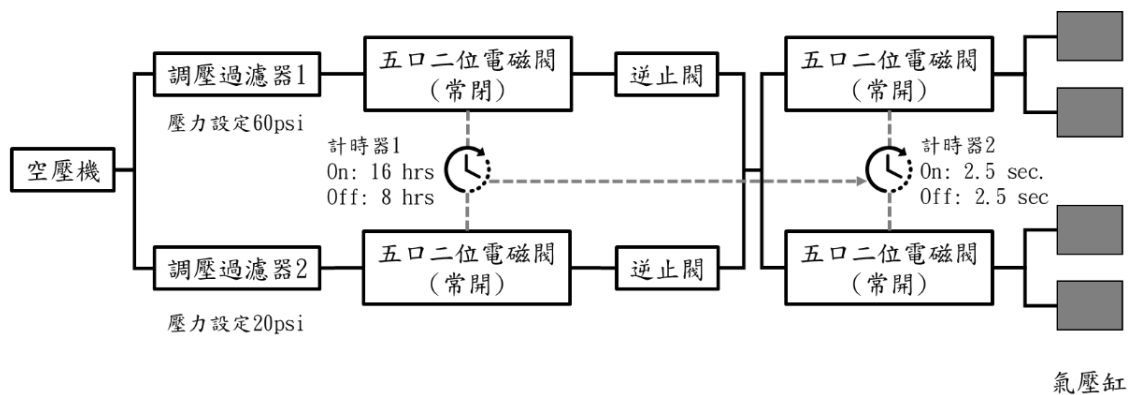


圖 2.7 控制系統配置圖



2.1.4 超音波系統

超音波系統選用傑邁的超音波機台(ULS-1000P, ZMI, Taiwan)(圖 2.8)作為超音波能量來源,此機台可提供頻率為 1MHz 與 3MHz,可輸出能量為 0.1W 至 3.0W,另外可選擇輸出時的工作週期(CONT.、1:1、1:3、1:9)。探頭端為實驗室自製的探頭配上傑邁提供之壓電元件組合而成,可與生物培養器相連接,直接施打超音波於培養環境內,探頭的有效輻射面積(Effective Radiating Area, ERA)於 1MHz 時為 1.7cm²; 3MHz 時為 1.2cm²。



圖 2.8 超音波機台 ULS-1000, ZMI, TW

2.2 系統測試

為確認此系統的可行性,本研究針對超音波能量來源、超音波於生物反應器的能量分佈情形與豬隻椎間盤的培養存活這幾點規劃了相關測試實驗。

2.2.1 超音波探頭校正

為確保探頭輸出的能量與額定能量相符,所以針對超音波探頭進行輸出能量的校正。此測試內容分為兩部分,第一部分為探頭校正的標準化流程,第二部分為實驗室自製的校正機台與市售機台的準確度比較。

2.2.1.1 實驗儀器

探頭校正的標準化流程所使用的實驗器材為超音波機台與聲功率計(UPM-DT-10AV, OHMIC, USA)(圖 2.9)。超音波機台可以針對每顆探頭調整其最合適的輸出

參數，可調整探頭的響應頻率以及輸出的放大倍率；聲功率計可量測超音波探頭發射的聲瓦大小，量測參數為重量(mgw)，另有內建將顯示的重量轉換為功率(W)的功能，因此可以直接觀察能量的大小。



圖 2.9 市售聲功率計 UPM-DT-10AV, OHMIC, USA

標準化流程實驗中使用的聲功率計為向長庚大學劉浩澧老師實驗室商借而來，本實驗室並無此設備，考慮到今後探頭校正的便利程度，本實驗室依據 Radiation Force Balance (RFB)的原理，使用實驗室現有的電子天秤自製了一聲功率計(圖 2.10)。RFB 為超音波能量傳遞時，於空間中擊中一個目標時所產生的應力，本實驗中設計了一半頂角為 45 度之圓錐體為被擊中的目標，此設計能讓超音波能量向下打，遇到此圓錐體後向側邊反射，避免駐波產生。自製校正機台的機構部分由壓克力組成，錐形接受器則是由鋁組成(直徑為 25mm)。機構分為水槽與支架兩部分，裝有去氣水的水槽提供超音波良好傳導的環境，支架放置於秤量台上，錐形接受器位於支架中間點，當接收到上方探頭打出之超音波能量時，錐形接受器產生向下的力量，透過支架傳遞至秤量台上，使電子天平的秤量讀值改變，此變化值即為接收到的能量的數值。

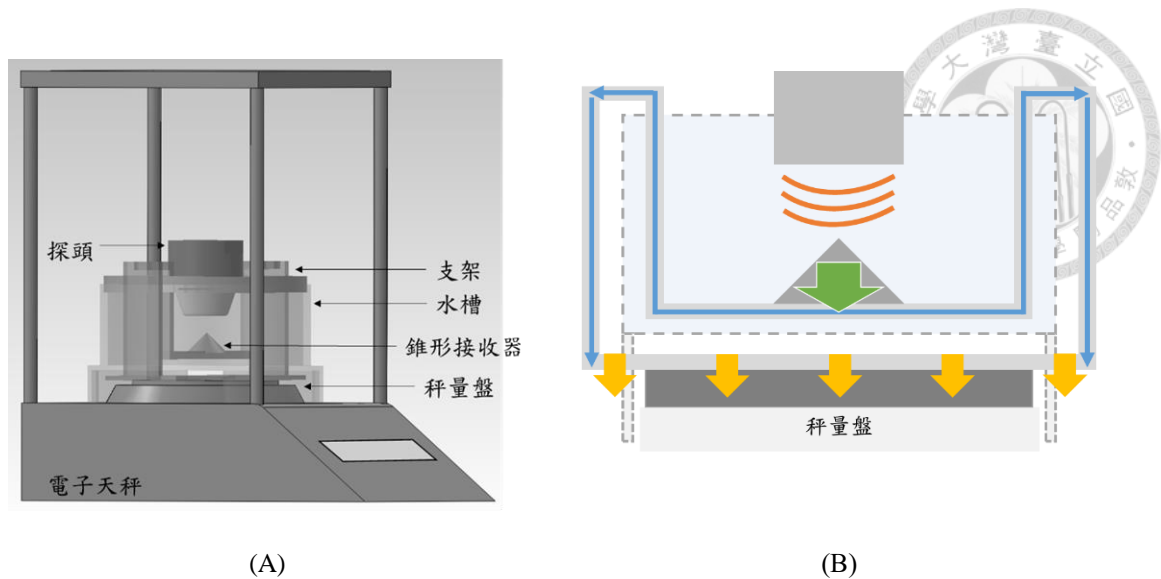


圖 2.10 (A)自製聲功率計示意圖 (B)量測原理示意圖

2.2.1.2 實驗流程

探頭校正標準化流程中，一開始先將待調整探頭置於聲功率計上，探頭與超音波機台連接後，進入超音波機台的探頭參數調整模式，首先調整探頭的響應頻率 (1MHz, 3MHz)，因每顆壓電元件所需的最佳響應頻率有些微不同，所以在此步驟調整至最佳的響應頻率以達到最大輸出能力；第二步驟為在最佳響應頻率下，選定額定輸出能量 0.2W、1W、2W、3W，分別調整於此能量時機台的放大倍率，使聲功率計上測得的能量呈現與額定能量相同或相近的數值，調整完後，超音波機台會記錄調整後各能量點的放大倍率，擬合一適用於輸出能量 0.1-3W 時的放大倍率曲線，使輸出能量能夠符合或接近額定能量。

自製校正機台與市售聲功率計的準確度比較實驗中，以經過市售聲功率計校正過的探頭為標準，量測頻率為 1MHz 與 3MHz 時不同能量的秤量讀值，並使用公式 $P = Fv$ (P ，功率 W； F ，力量 N； v ，超音波於水中傳遞的速度 m/s) 將重量轉為能量，比較自製校正機台與市售聲功率計的量測差異。

2.2.2 生物反應器內環境能量場量測

超音波在空間中傳遞時會因為傳遞介質的改變而產生反射、折射等現象，為了解探頭施打超音波的方向性質，以及考慮到施打於生物反應器內可能產生反射使

得此空間內能量分布改變，本研究使用超音波傳感器與溫度量測工具來量測生物反應器內的環境能量場。超音波傳感器能直接接收超音波能量，並以電壓的方式呈現於示波器上；溫度量測是用於觀察環境中能量的吸收所導致的升溫效應，透過升溫可推估水或軟組織各位置彼此吸收的能量差異。

建立生物反應器內的環境能量場對於未來置入椎間盤培養並施打超音波時，可以藉由此數據確定椎間盤所在位置能接收到預定的能量。

2.2.2.1 實驗儀器

本實驗量測了能量與溫度兩個參數，因超音波能量由側向打入生物反應器，所以能量的量測使用了 1 MHz 的沉水式探頭配上 90 度的反射鏡(圖 2.11)，並裝置在三軸移動平台上，沉水式探頭會接到示波器上，觀察接收到的能量的電壓。為配合沉水式探頭的接收方向性，實驗使用之三軸平台加裝了一 z 軸的旋轉平台，並以滴管夾固定住沉水式探頭，將 x 軸旋轉和 y 軸旋轉兩個自由度固定，可調整的自由度為 xyz 三方向的移動與 z 軸的轉動。

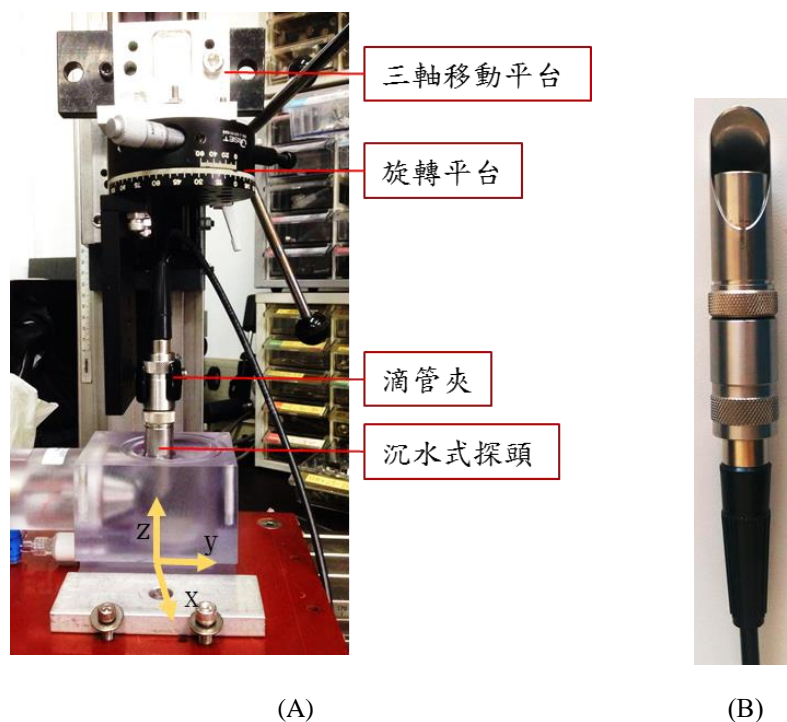


圖 2.11 (A) 超音波場量測實驗儀器架設 (B) 1MHz 沉水式探頭套上 90 度反射鏡

量測溫度的工具選用熱電偶，熱電偶是根據 Seebeck 效應所設計的感溫元件，主要由兩條不同材質的金屬線組成，藉由金屬兩端的溫度差使金屬內產生電流，不同金屬會產生不同大小的電流，兩金屬線的兩端各自接在一起時會產生一熱偶電壓，藉由此電壓可推算目前的溫度大小。本實驗使用之熱電偶為 T 型熱電偶，所使用導線為銅與康銅，測溫範圍從 -50°C 至 250°C 。熱電偶放入 16G 的針頭內，使其在生物反應器中量測溫度時可固定位置與高度，另外，本實驗自製了一塊壓克力夾具(圖 2.12)，上頭有若干孔位可用來裝設含熱電偶之針頭，孔位間彼此距離 5mm，正中心的孔位正對生物反應器腔室的中心。線路連接到 DAQ 訊號盒，經由 LabView 從電腦上抓取量測到的溫度訊號。

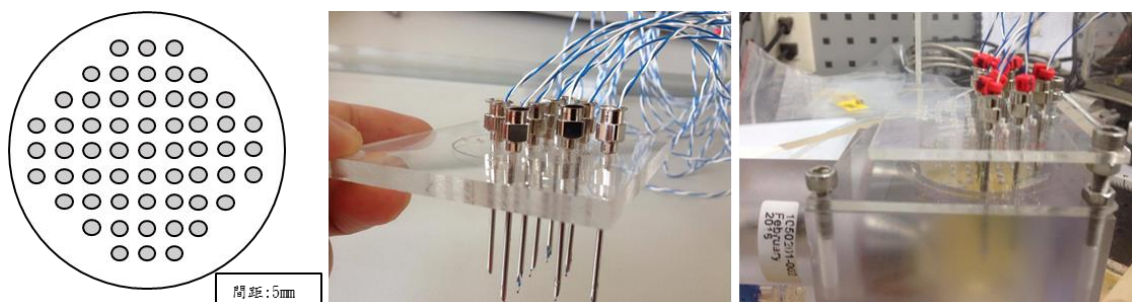


圖 2.12 溫度量測實驗儀器架設

2.2.2.2 實驗流程

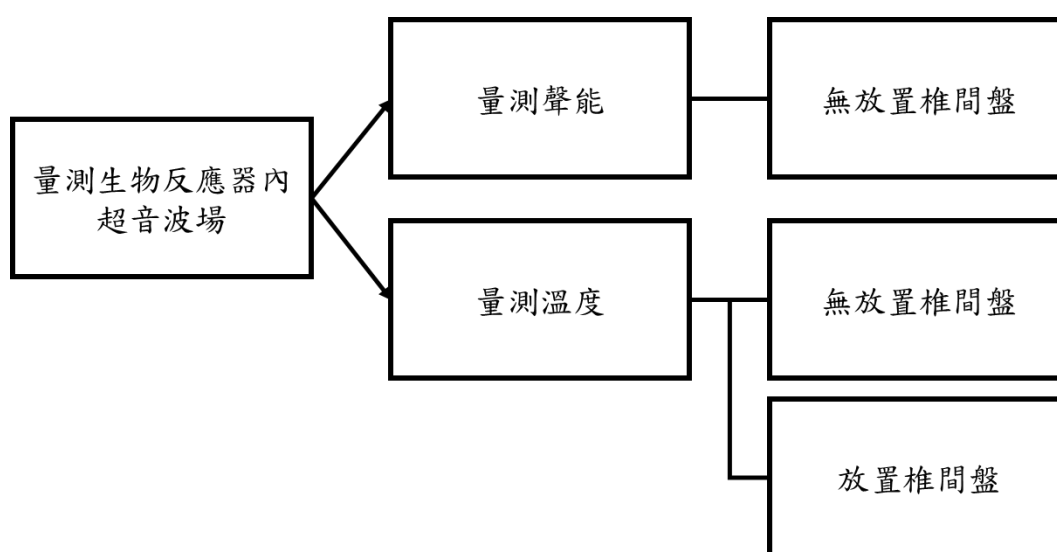


圖 2.13 量測生物反應器內超音波場實驗流程架構

量測生物反應器內的超音波場分為量測聲能與量測溫度(圖 2.13)，其中量測溫度又分為有放置椎間盤與無放置椎間盤兩個實驗，因能量實驗所使用的儀器體積較大，無法量測有椎間盤時的情形，故量測聲能中只有無放置椎間盤實驗。

量測能量的實驗中，機台架設好後，將探頭放入裝滿去氣水之生物反應器中，調整位置使其正對於探頭，確保能接收到最大能量。為量測方便，使用能量為 3W、工作週期為 Cont.，於生物反應器中點處測量完後，選定方向(x、y、z)移動 5mm 或 10mm 至下一位置進行相同的量測，因受限於空間大小，y 方向(前後)移動 10mm，x(左右)和 z 方向(上下)皆移動 5mm。量測資料經過處理後會得到平均最大振幅，表示各位置所接收的能量大小，接著使用 MatLab 中的空間圖表呈現量測能量的分佈圖。

量測生物反應器內溫度變化的實驗中，將熱電偶放入裝滿去氣水的生物反應器內(圖 2.14)，施打 1MHz 的超音波 15 分鐘，並記錄溫度變化。一般於治療時，施打的能量約為 0.3W，工作週期通常為 1:9，本實驗中為了便於量測，讓升溫現象變得明顯容易觀察，因此施打持續(工作週期：Cont.)能量 3W。熱電偶放置位置如圖 2.14 所示。

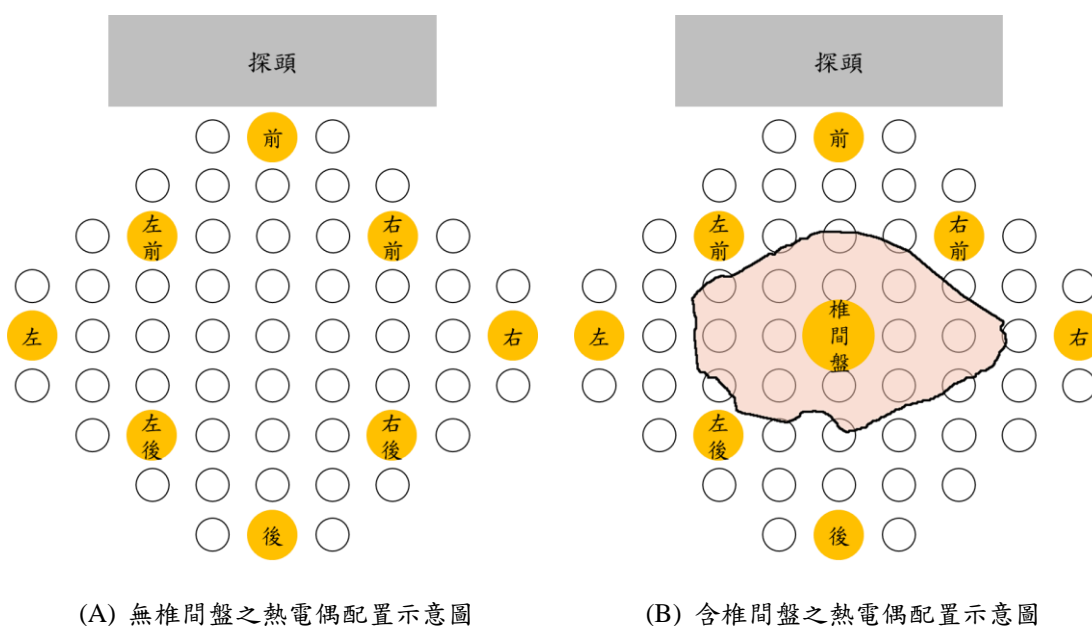


圖 2.14 熱電偶配置示意圖



量測放入椎間盤後，周遭與椎間盤內部的溫度變化。使用電動鑽頭從待測的椎間盤上椎終板處鑽至椎間盤內部，將熱電偶安裝進洞內，椎間盤放置於生物反應器中間位置，其餘熱電偶分布位置如圖 2.14 所示。

溫度資料的擷取頻率為 10Hz，本實驗從擷取下來的資料中算出溫度差與溫度變化率兩個參數(圖 2.15)。溫度差為施打超音波的 15 分鐘前後的溫度變化；溫度變化率則是其間的線性趨勢線斜率。

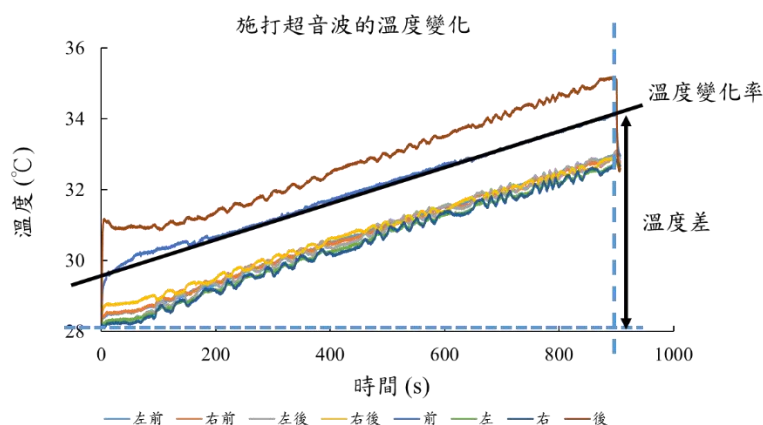


圖 2.15 溫度量測參數示意圖

2.2.3 豬隻椎間盤培養測試

全椎間盤培養系統的主要功能為培養豬隻椎間盤，使其在體外能夠維持生存狀態。為了驗證本系統在培養豬隻椎間盤時能達到一定的存活率，因此進行豬隻椎間盤的培養測試。

2.2.3.1 試樣準備

實驗前一天，實驗器具會先以高溫高壓滅菌釜進行無菌處理，不適合高溫高壓滅菌的器具會以 75%酒精浸泡 30 分鐘以上，並放置於紫外光下照射 1 小時。本實驗使用六個月大的年輕豬隻，於豬隻屠宰後 4 到 6 個小時內進行實驗。試樣取用上段胸椎，先用清潔劑清洗表面的血塊、異物等，再將其泡入 75%酒精內 30 分鐘進行消毒，消毒完後放進無菌操作台進行試樣處理。試樣取法為沿著上下椎終板邊緣平行切除，移去不必要之肌肉、韌帶、小面關節及後脊突等部位，最後取下完整

椎間盤包含髓核、椎間環以及上下椎終板。取下的試樣用含抗生素(Amphotericin 1%, Gentamicin 1%)之無菌生理食鹽水(phosphate buffered saline, PBS)加入沖洗數次，確認清除多餘血塊及組織後，將試樣浸泡於碘酒當中 2 至 5 分鐘後取出靜置風乾，最後使用含抗生素之食鹽水將表面碘酒沖洗乾淨，即可將處理完畢之椎間盤放入自製之生物反應器中。培養液配方如下：DMEM 4.5g/L, FBS 10%, HEPES 1%, p/s 1%, Amphotericin 1%。

2.2.3.2 實驗流程

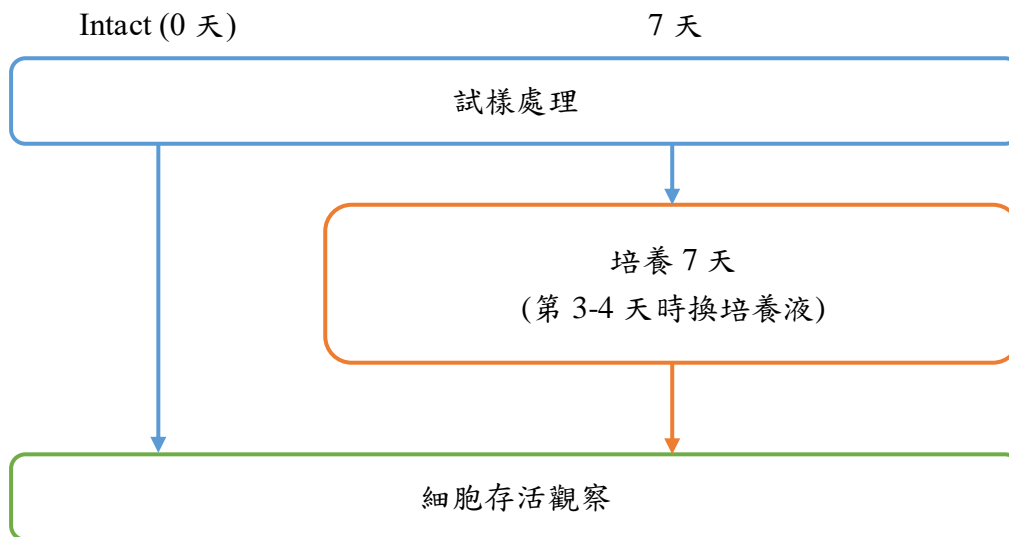


圖 2.16 細胞存活觀察實驗流程架構

本實驗架構如圖 2.16，分為新鮮試樣組(0 天)與培養 7 天試樣組，新鮮試樣組在試樣處理完後，進行細胞存活測試；培養 7 天試樣組則先進行培養，7 天後取出進行細胞存活測試。

2.2.3.3 細胞存活測試

本實驗使用兩種染劑來觀察細胞存活的狀態，分別為 Calcein AM 與 Ethidium homodimer-1 (EthD-1)，其染劑特性如下表 2.1。使用前先將兩種藥劑退冰，取 Calcein AM 2 μ l 與 EthD-1 1 μ l 溶於 2ml 生理食鹽水中，並將染劑混和液存放在包有鋁箔紙的離心管中，避免接觸光線。

表 2.1 LIVE/DEAD 染劑特性表

染劑種類	激發/放射波長	標定細胞	標定方式
Calcein AM	495 nm/515 nm	活細胞(綠)	染劑穿過細胞膜於細胞質中被酯酶水解為 Calcein，發出綠色螢光。
Ethidium homodier-1	495 nm/635 nm	死細胞(紅)	染劑通過死掉而破裂的細胞膜，與基因片段結合出現螢光。

用手術刀將完整的椎間盤試樣橫剖開，使用組織採樣器(Biopsy Punch)採集髓核(NP)、內椎間環(IAF)與外椎間環(OAF)三處的組織(圖 2.17)放置於培養皿中，在避光的環境下將染細胞的藥劑加進培養皿，藥劑須完全浸過組織，再用鋁箔紙將培養皿包覆好後放進生物培養箱中靜置 1 小時，使藥劑充分進入細胞染色。1 小時取出培養皿，將組織放置於蓋玻片上，移至共軛聚焦顯微鏡下進行影像拍攝。

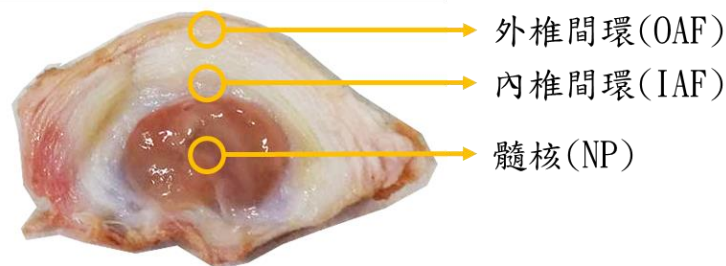


圖 2.17 椎間盤橫剖面示意圖

2.2.3.4 細胞存活比計算

本實驗使用 ImageJ 進行細胞存活數的分析，流程如圖 2.18，將影像分離成紅綠藍三塊色板，紅色色板與綠色色板分別為計算死細胞與活細胞所需，接著調整閾值使計算目標完整呈現，計算其細胞數量，計算存活比公式為活細胞數/總細胞數。

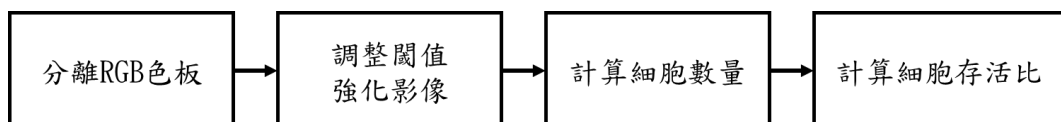


圖 2.18 影像分析流程圖

第三章 實驗結果



3.1 超音波探頭校正

3.1.1 探頭校正結果

本實驗使用市售聲功率計共校正了 3 隻探頭，結果如表 3.1，於 1MHz 下，以額定能量作為自變數，輸出能量作為依變數時，得出的斜率為 0.98、1.01 與 1.02；3MHz 下的斜率為 1.00、0.97 與 0.96。斜率等於 1 表示經過校正之後探頭的實際輸出能量符合額定能量。

表 3.1 探頭校正精準度

探頭	No. 1		No. 2		No. 3	
	斜率	R ²	斜率	R ²	斜率	R ²
1MHz	0.98	0.99	1.01	1.00	1.02	0.99
3MHz	1.00	0.99	0.97	0.99	0.96	0.99

3.1.2 自製機台與市售聲功率計的量測數值比較

以市售聲功率計數值為自變數，自製機台量測得到的數值作為依變數，求出之線性斜率結果如表 3.2，在頻率 1MHz 時，三個探頭分別為 0.64、0.57 與 0.52，表示自製機台量測到的數值約為市售的 5 至 6 成(錯誤! 找不到參照來源。); 3MHz 時則分別為 0.96、0.75 與 0.88，自製機台於 3MHz 時量測的數值約為市售之 8 至 9 成(錯誤! 找不到參照來源。)

表 3.2 自製機台與市售聲功率計量測數值比較

探頭	No. 1		No. 2		No. 3	
	斜率	R ²	斜率	R ²	斜率	R ²
1MHz	0.64	0.99	0.57	0.99	0.52	0.99
3MHz	0.96	0.99	0.75	0.99	0.88	0.99

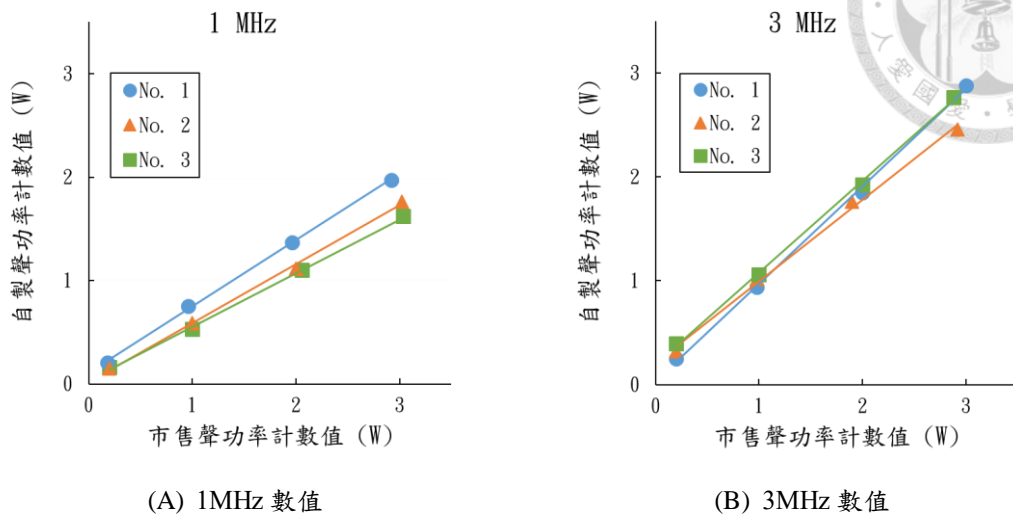


圖 3.1 自製機台量測精準度

3.2 生物反應器內環境能量場量測

3.2.1 能量量測

沉水式探頭接收頻率 1MHz 能量 3W 的超音波訊號，於位置上、下、左、右、前、後、中量測到的電壓分別為 1.034(0.589) V、2.061(0.495) V、1.818(0.378) V、1.306(0.164) V、2.551(0.118) V、2.433(0.119) V、2.615(0.050) V。前後中三個數值較接近，上下、左右相對於中間的數值差異較大(圖 3.2)。

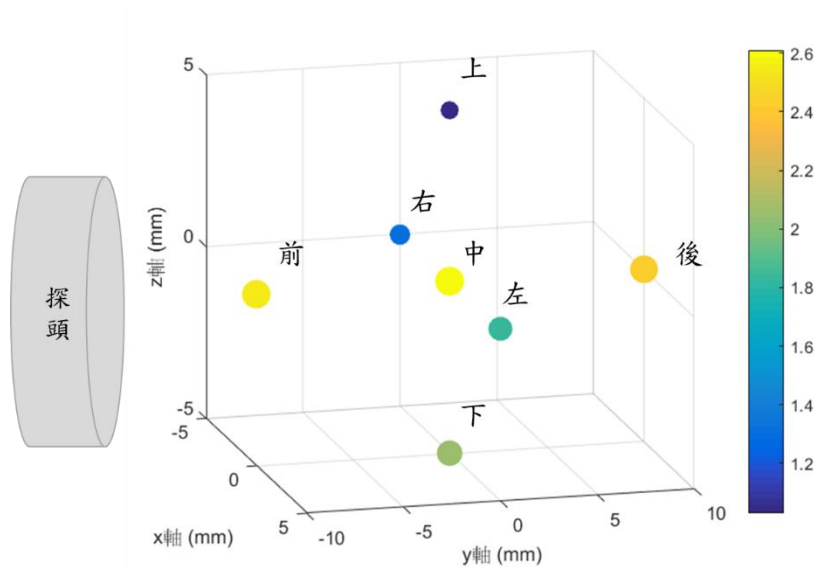


圖 3.2 各點於空間分佈中的數值大小



3.2.2 溫度量測

3.2.2.1 無椎間盤

無放置椎間盤時，施打頻率 1MHz 能量 3W 的超音波 15 分鐘，熱電偶於位置 (圖 2.14) 前、左、右、後、左前、右前、左後、右後量測到的溫度差如圖 3.3，分別為 6.03(0.84) °C、4.93(0.91) °C、4.97(0.92) °C、6.06(1.11) °C、5.05(0.82) °C、4.98(0.88) °C、5.14(0.78) °C、4.96(0.84) °C。除了放置於探頭前後兩位置之熱電偶溫度高其他地方約 1°C，其餘彼此間的數值無差異。

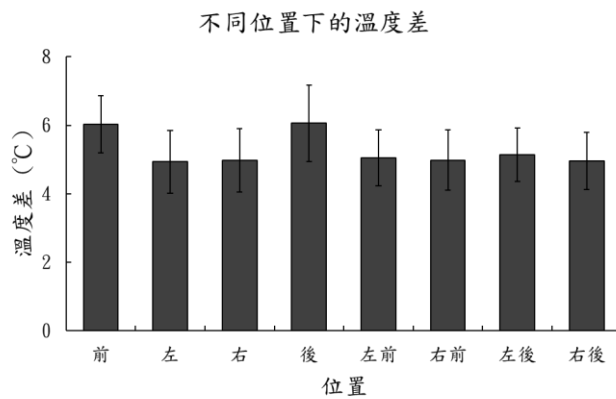


圖 3.3 無椎間盤時不同位置之溫度差

熱電偶於位置前、左、右、後、左前、右前、左後、右後的平均溫度變化率如圖 3.4，分別為 0.33(0.05) °C/min、0.34(0.06) °C/min、0.34(0.06) °C/min、0.34(0.06) °C/min、0.34(0.05) °C/min、0.34(0.06) °C/min、0.35(0.05) °C/min、0.34(0.06) °C/min。各位置之數值皆無明顯差異。

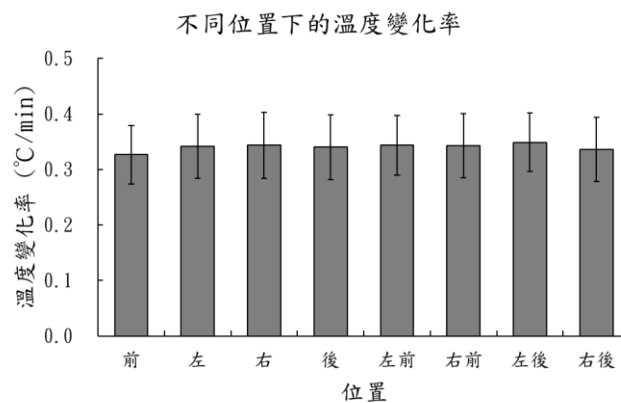


圖 3.4 無椎間盤時的溫度變化率



3.2.2.2 放置椎間盤

同樣施打頻率 1MHz 能量 3W 的超音波 15 分鐘，有放置椎間盤時，熱電偶於位置 (圖 2.14) 椎間盤、前、左、右、後、左前、右前、左後量測到的溫度差如圖 3.5，分別為 17.70(0.63) °C、7.43(0.22) °C、7.63(0.32) °C、7.29(0.23) °C、7.28(0.22) °C、9.00(0.29) °C、8.21(0.30) °C、7.51(0.18) °C。椎間盤的升溫明顯高於其他位置，其餘彼此溫度無明顯差異。

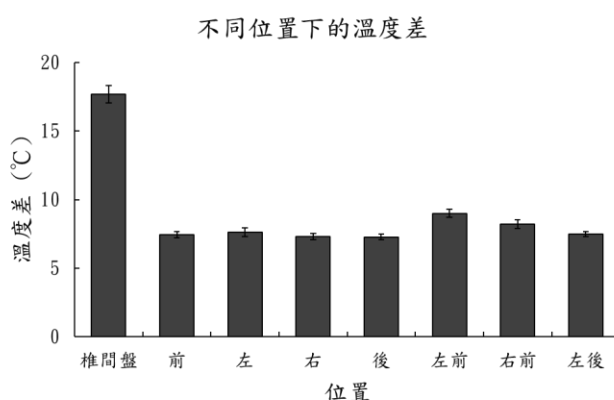


圖 3.5 放置椎間盤時不同位置之溫度差

熱電偶於位置椎間盤、前、左、右、後、左前、右前、左後的平均溫度變化率如圖 3.6，分別為 0.91(0.02) °C/min、0.45(0.02) °C/min、0.54(0.02) °C/min、0.51(0.01) °C/min、0.52(0.02) °C/min、0.55(0.01) °C/min、0.49(0.01) °C/min、0.53(0.01) °C/min。椎間盤內的熱電偶升溫率高於其他位置，其餘彼此之間則無差異。

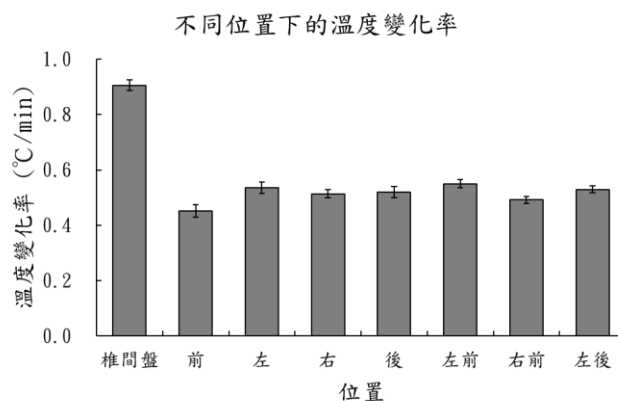


圖 3.6 放置椎間盤時不同位置之溫度變化率



3.3 豬隻椎間盤培養

3.3.1 試樣培養天數

本實驗並無達到當初預期的目標：無出現感染現象成功培養椎間盤 7 日。在椎間盤受到感染後檢討可能原因並持續試誤，最終進行培養測試的椎間盤共有 28 個，若出現感染現象即停止培養並記錄培養至當日的天數，培養天數統計如圖 3.7，培養天數 1 日的有 6 個，2 日的有 7 個，3 日的有 4 個，4 日的有 3 個，5 日的有 2 個，6 日的有 6 個，無椎間盤培養至第 7 日。

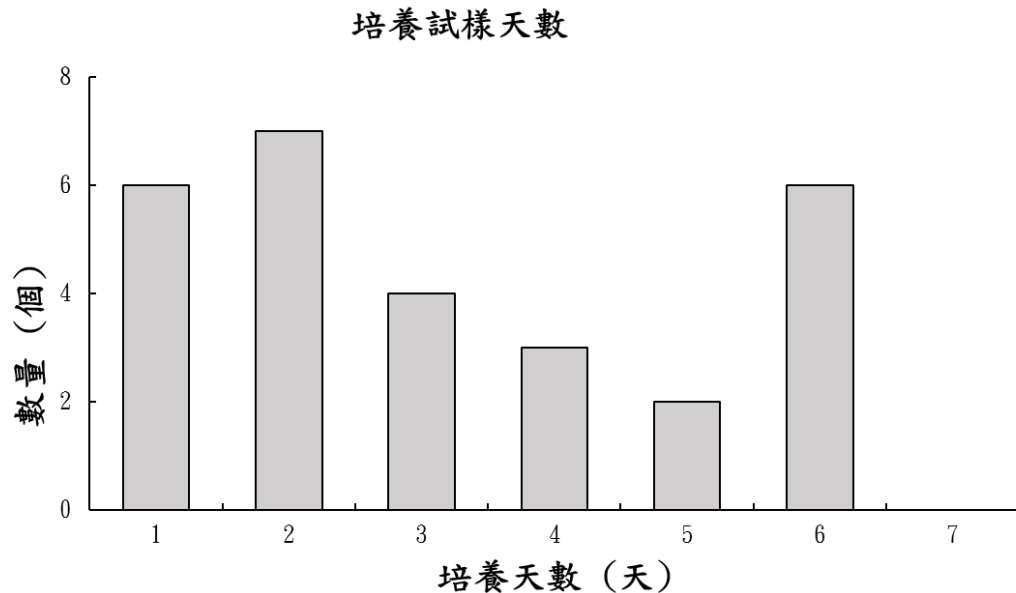


圖 3.7 培養試樣存活天數

3.3.2 細胞存活比

因無存活至 7 日的椎間盤，為了解椎間盤在培養過程中細胞存活的變化，所以改為拍攝培養 3 天與 6 天的試樣照片(圖 3.8)，總共拍攝組別有 0 天、3 天、6 天，拍攝的試樣數分別為 3 個、4 個、2 個。拍攝影像如圖 3.8，拍攝倍率為 20 倍，經過影像分析軟體計算出活細胞與死細胞數量，並求出細胞存活比。

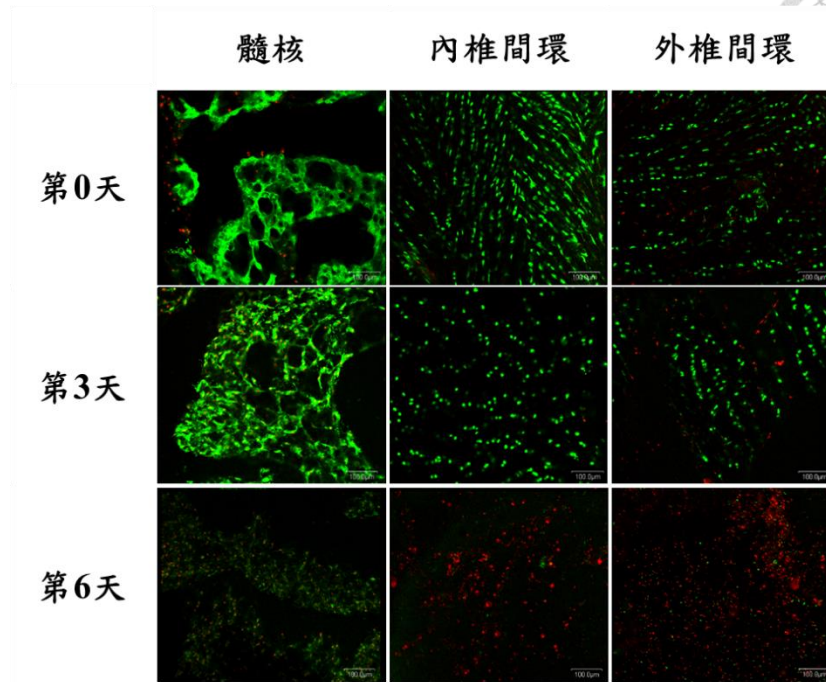
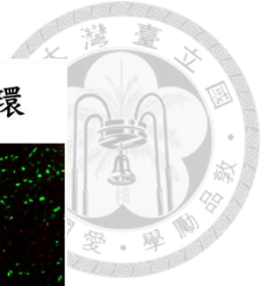


圖 3.8 三個組別拍攝的活/死細胞分佈影像圖

細胞存活比計算結果如圖 3.9，0 天試樣於髓核、內椎間環與外椎間環三處的存活率為 96(6) %、83(11) %、83(9) %；3 天試樣於髓核、內椎間環與外椎間環三處的存活率為 93(7) %、81(18) %、84(14) %；6 天試樣於髓核、內椎間環與外椎間環三處的存活率為 44(16) %、25(17) %、14(11) %。(圖 3.9)

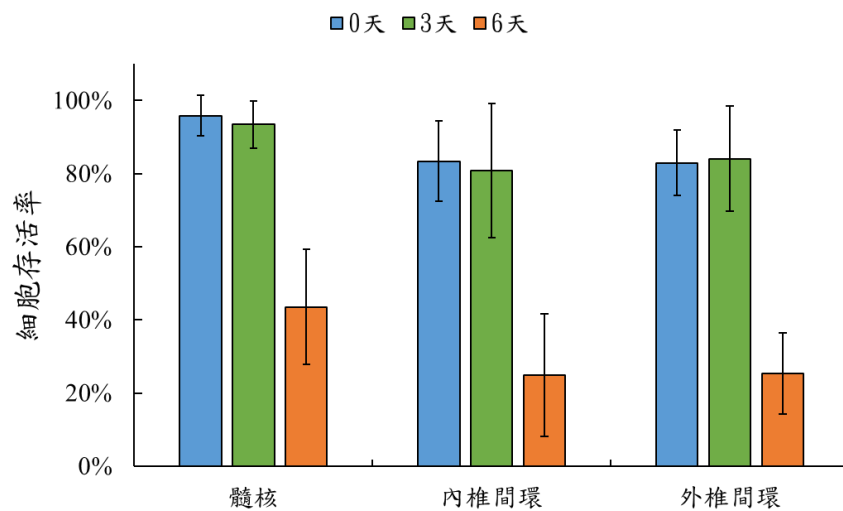


圖 3.9 細胞存活比

第四章 討論



4.1 自製聲功率計量測結果討論

自製聲功率計的量測數值中可看出在 1 MHz 時，自製機台量測到的數值約為市售的 5 至 6 成；3 MHz 時則是市售的 8 至 9 成，而線性回歸得出的 R^2 值為 0.99(表 3.2)，表示線性率非常高，由此可推論本實驗室自製的聲功率計在量測上雖然不準確但精度高。

而量測上不準確的差異應來自於使用的錐形接收器大小，錐形接收器大小若小於到達之超音波波束，會有無法接收到完整能量的狀況出現。國際電工委員會 (International Electrotechnical Commission, IEC) 是個負責電氣工程和電子工程領域中國際標準化工作的協會，其中的 IEC 61161 這項規範有針對錐形接收器的設計提供了一些考量與建議³⁴。一般而言，錐形接收器的半徑為發射源探頭的 1.5 倍最為保險³⁵，規範中有提供較為詳盡的算法，所需最低半徑主要與探頭的面積、發射頻率與間隔距離有關，其中頻率越大錐形接收器所需半徑可越接近探頭大小。

本實驗使用之市售聲功率計的錐形接收器直徑為 82 mm，自製聲功率計的錐形接收器直徑為 25 mm，而超音波探頭的直徑約為 25.56 mm，由此可見自製聲功率計的尺寸需要加大改善為直徑 75 mm 以上。

另外，1 MHz 與 3 MHz 量測效率不同的原因為頻率越高時，波束的發散會越小，所以當波束到達錐形接收器時，3 MHz 的能量會較 1 MHz 集中，故量測到的能量也較高。

4.2 生物反應器內超音波場能量量測討論

從量測結果中可以看出超音波探頭前方區域前後移動的能量差異不大，往上下左右偏移 5mm 量測到的能量差距較大，此現象是因為探頭打出來的能量並非均勻的分佈於探頭面積，而是中間部分能量較高，邊緣部分能量較低，不一致的超音

波放射線可防止熱力集中於一個點，避免組織傷害，此特性會以 BNR 值(光束不均勻比例，Beam Non-uniformity Ratio)表示。而前後移動能量差異不大的原因為水是超音波的良好導體，在傳遞時幾乎不會衰減。

由以上結果可得出若未來放置椎間盤於生物反應器內，需放置於探頭正中間的前方，以確保能接收到完整的能量，這也是本研究在設計生物反應器時規劃了增高墊的原因。

4.3 生物反應器內超音波場溫度量測討論

4.3.1 施打超音波時急速升溫現象討論

超音波一開始施打時，可以觀察到探頭前方的熱電偶(位置前與後)測得之溫度有明顯攀升；超音波停止時則有迅速下降的趨勢(圖 4.1)。推測是因為探頭前方中間區域超音波能量集中，影響熱電偶的量測，使其顯示之溫度驟升，因此量測結果中位置前與後的數值會略高於其他位置。但從溫度變化率上來看，每個位置皆無差異，表示並非為施打超音波使前方熱電偶的金屬升溫較高，而是干擾熱電偶，使其多出一段電壓差，不過此電壓差並非固定值，前後兩位置也無哪方較大較小之分別。若將位於探頭前方之熱電偶向隔壁移 1 至 2 格，觀察不到有電壓差的情形，推估是因為能量集中於探頭中間區域，打到生物反應器內壁產生駐波，影響到熱電偶的量測，但因生物反應器內壁為圓柱，離開正中間後，能量打到內壁會反射至其他方向，駐波現象較難產生，所以沒有出現干擾的情況。



施打超音波的溫度變化

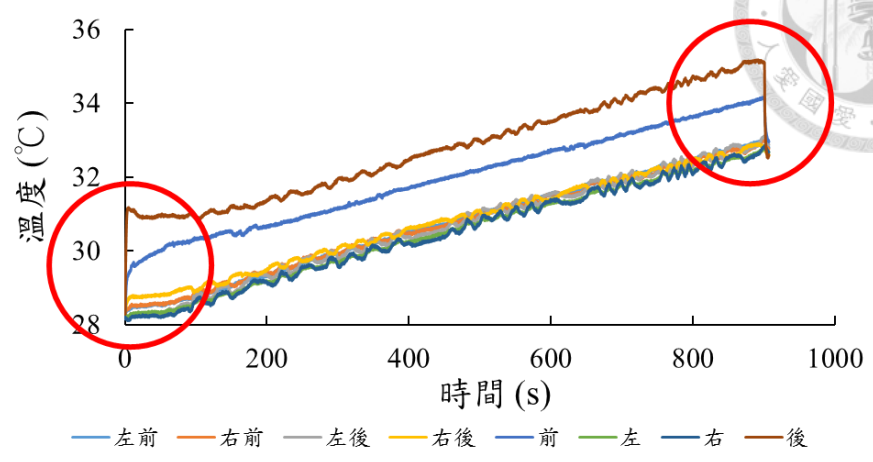


圖 4.1 無椎間盤時施打超音波時的溫度變化圖

有放置椎間盤時也可以觀察到同樣的現象(圖 4.2)，從圖中可以看出位置前的熱電偶在剛施打超音波時有明顯升溫的現象，放置於椎間盤內的熱電偶溫度則是逐漸爬升，應為實際升溫，左前與右前的熱電偶在剛施打超音波不久後溫度爬升較其他位置高，因並非開始施打時就迅速升溫所以推估為實際升溫。另外，超音波停止施打時的溫度驟降並未於放置椎間盤時觀察到，推估是因為有放置椎間盤時駐波較難產生的緣故。

施打超音波的溫度變化

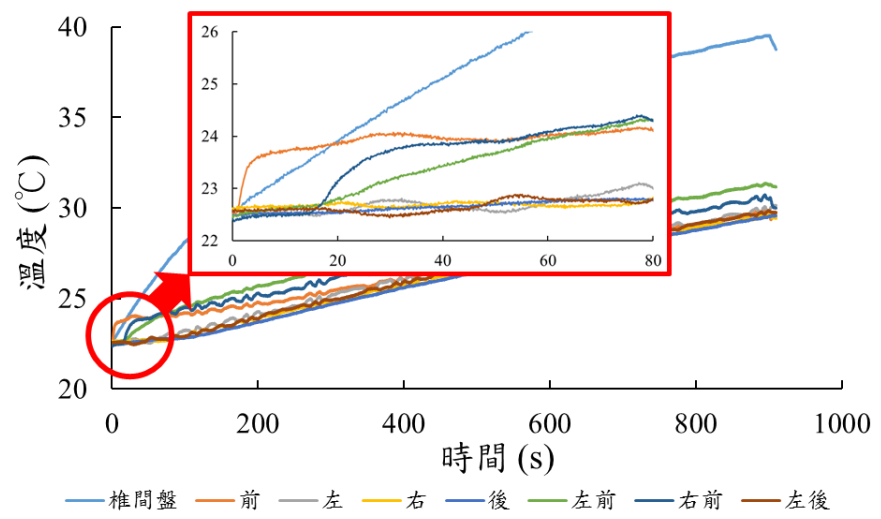


圖 4.2 放置椎間盤時施打超音波的溫度變化



4.3.2 各位置於放置椎間盤前後之溫度差異

因實驗可使用的熱電偶只有 8 隻，所以在比較各位置於放置椎間盤前後的溫度差異只有前、左、右、後、左前、右前、左後這 7 個位置。由圖 4.3 可看出各位置在放置椎間盤後，溫度有高約 1 至 2 °C；整體溫度變化率於每分鐘提高了約 0.2 °C(圖 4.4)。由此可知放置椎間盤後會提升整體的升溫。

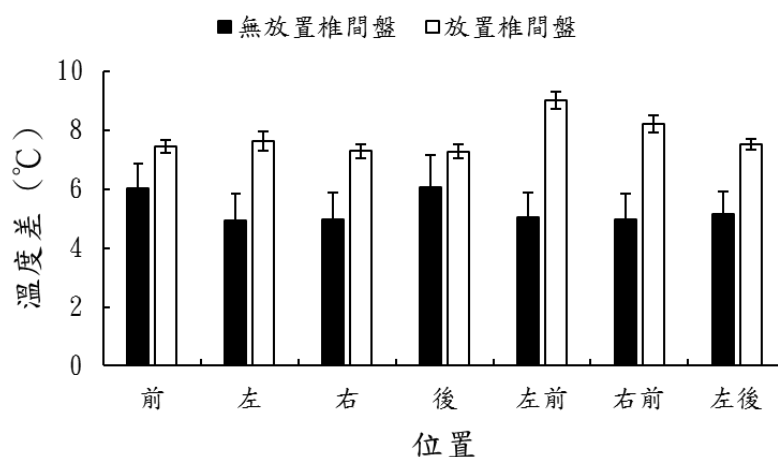


圖 4.3 各位置於放置椎間盤前後的溫度差比較

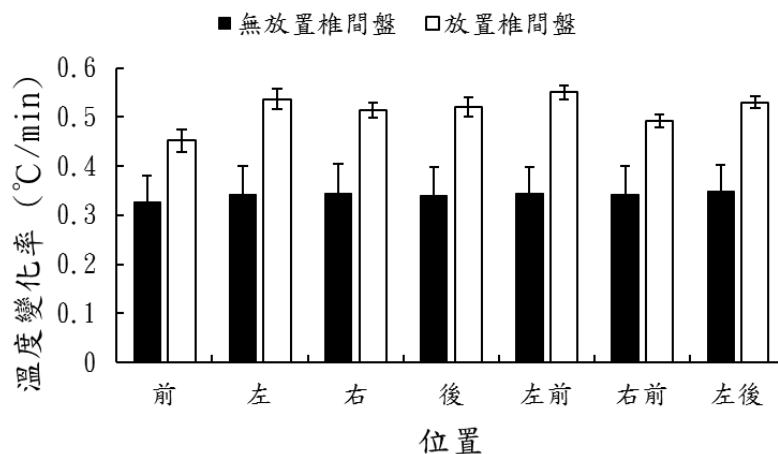


圖 4.4 各位置於放置椎間盤前後的溫度變化率比較

4.3.3 熱電偶於生物培養器內升溫原因討論

超音波於介質中傳遞時會有反射、折射與衰減這幾種情形發生，本實驗想透過超音波能量於水中衰減時，轉化為熱量被水吸收而升溫來推測超音波能量於水中

的分布情形。從實驗結果可得知各位置的升溫率並無差別，即無法從中了解超音波的能量分佈。水升溫的原因可能為超音波能量打至生物反應器時，因能量經過腔壁時大幅的衰減，使生物反應器溫度升高，進而傳導至水中使水升溫。

放置椎間盤時，能量打至椎間盤軟組織時，出現能量衰減的情形，衰減的能量轉化成熱量被軟組織吸收，故椎間盤的升溫高於其他於水中的熱電偶。放置椎間盤提高升溫原因可能為椎間盤吸收能量較生物反應器多，故傳導至水中的熱量也相對較多。

本實驗雖無法透過量測溫度了解超音波能量的分佈，但從放置於椎間盤內的熱電偶升溫中能夠得知超音波能量可以傳遞至椎間盤內並被其吸收。

4.4 豬隻椎間盤培養感染可能原因討論

4.4.1 感染培養液之觀察

本實驗於椎間盤受到感染後，抽樣採集其培養液，並放置於顯微鏡下觀察，希望能從中了解當次培養失敗的原因，並加以改進。

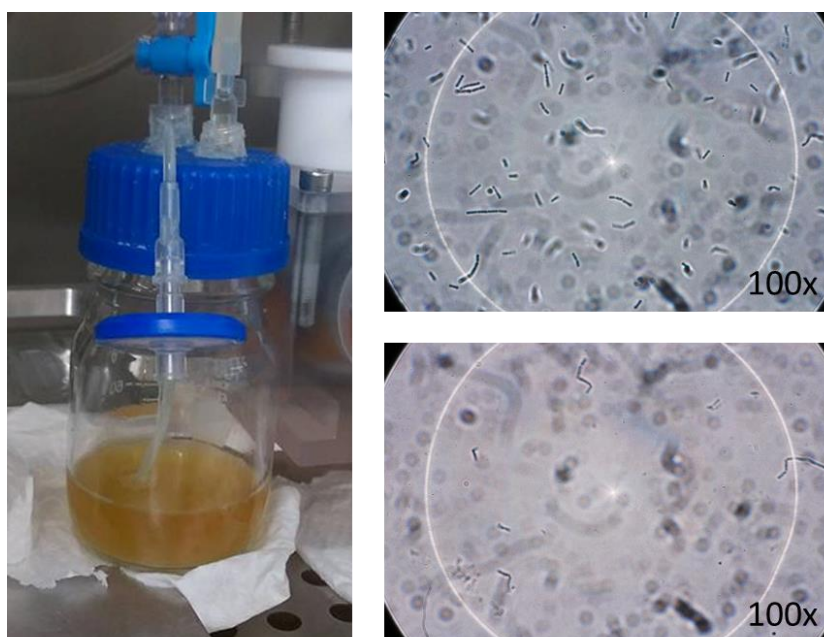


圖 4.5 於第 1 日失敗之試樣培養液照片(左) 培養液顯微鏡照片(右)

上圖 4.5 為第 1 日失敗試樣的培養液照片，以及 2 個第 1 日培養失敗之椎間盤的培養液於顯微鏡下的照片。照片於物鏡 100 倍下拍攝，使用相機為 Canon 的 60D。於照片中可以觀察到許多桿菌存在，拍攝當下也能從鏡頭中觀察到它們活動的樣子。

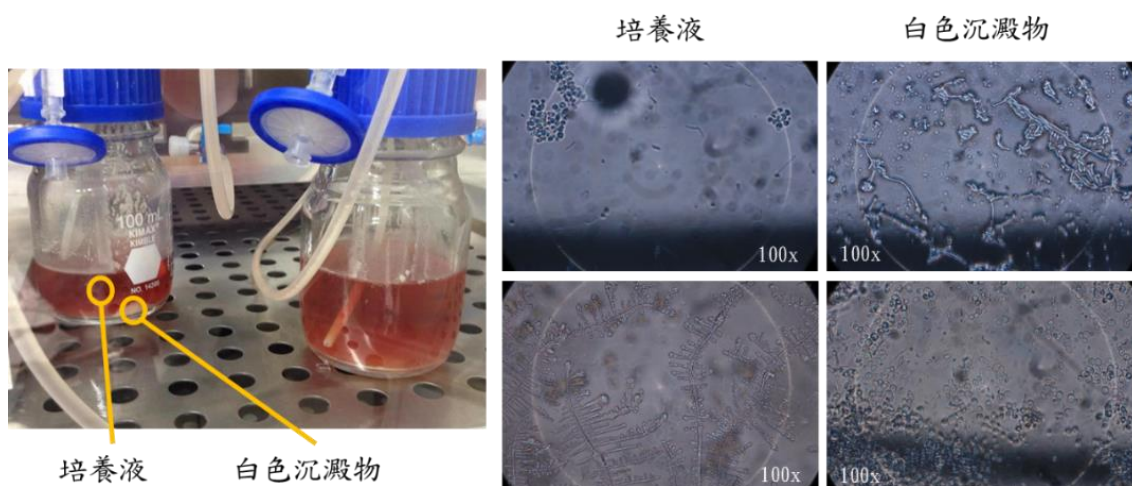


圖 4.6 於第 6 日失敗之試樣培養液照片(左) 培養液顯微鏡照片(右)

上圖 4.6 為第 6 日失敗試樣的培養液照片，以及 2 個第 6 日培養失敗之椎間盤的培養液於顯微鏡下的照片，第 6 日失敗試樣之培養液常發現其中有著白色的沉澱物，故也將其取出置於顯微鏡下觀察。從取樣照片中推測白色沉澱物可能是因為真菌感染而形成，培養液中也有觀察到菌落的型態。

4.4.2 感染可能原因討論

本實驗歸納了 3 點可能的感染原因：來源、操作手法與設備問題。來源方面的話，實驗所需的豬隻試樣是從市場取得，而市場的豬隻來源為屠宰場，豬隻於屠宰場犧牲，經 3 至 4 小時的車程後，到達市場再運送至實驗室內。豬隻送至市場前，內臟已先取出處理，椎間盤前側部分的肉相當少，沒有較多的組織包覆，所以在運送過程中暴露於環境當中的時間相當長，較難確定準備試樣時的消毒殺菌步驟對於取得的豬隻椎間盤是否有效。日後若能與動物實驗中心等單位合作取得手術犧牲後的豬隻脊椎試樣，應能降低此原因所造成之感染。

在進入無菌操作室處理試樣時，有時會因為操作手法不佳，例如手跨越過試樣或培養液上方，使細菌掉進試樣或培養液中，導致留置於內的細菌大量生長進而產生感染現象。此點於操作時多注意小心即可避免。

設備問題容易發生在部件接合處，本實驗所使用的生物反應器在設計時，於每個部件接合處皆有放置 O 型環，以防止內部液體洩漏出來，實際在運作時也無液體洩漏的情況發生。此生物反應器最常出現漏水的部位在靜脈帽黏接流道接頭處(圖 4.7)。

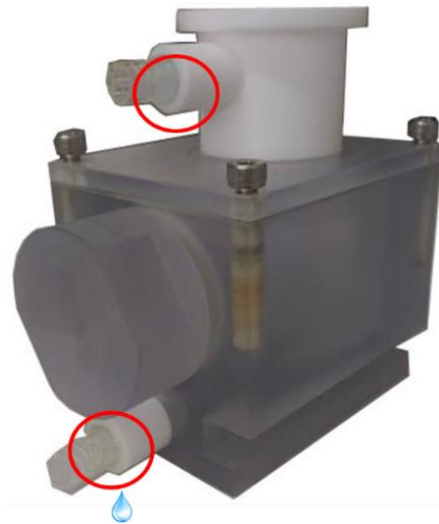


圖 4.7 生物反應器中容易漏水處

生物反應器在培養日程中每日需經歷 16 小時的動態負載，在接頭處的黏膠容易因震動而使黏著度降低，進而出現漏水現象，又因接頭由鐵氟龍所製成，鐵氟龍的化學惰性高，本身即不易黏著，即使黏著完也多為假性固定，在經歷動態負載之時鬆脫的機會較高，使漏水現象更加常見。要改善此點應將鐵氟龍接頭的部分改成較易黏著且可生物相容的材料。

4.4.3 培養天數與感染原因的關係討論

本實驗於持續的試誤中整理出不同培養天數中可能的感染原因。培養 1 日的試樣感染原因大多為操作手法不佳，在處理試樣過程中有細菌掉落，細菌於 1 日內大量繁殖，產生感染現象。



培養 2 至 3 日發生的感染現象多為設備問題，經歷過數日動態負載後，設備出現漏水現象，使生物反應器內外有流通的管道，因此，空氣中的細菌會跑入生物反應器內，進而使內部的培養液受到感染。

培養 4 至 6 日的試樣感染可能原因有兩種，一為第 3 至 4 日換培養液時因操作手法不佳使培養液受到感染，另一推測可能造成感染的原因為真菌感染。實驗使用之抗生素包含 p/s 1% 與 Amphotericin 1%，沖洗時有使用 Gentimacin 1%，就結果來看，使用之抗生素沒達到完全殺菌的效果，但有一定的抑制作用，使用的抗生素種類與劑量可能有殺死一些易殺的菌，不過一些難殺的菌等到環境好的時候便成長起來了。

4.5 實驗限制

在探頭校正的實驗中只了解到探頭打出來的能量是否符合額定的能量，因聲功率計主要是測量探頭的總能量，無法量測探頭面上的點能量。在治療用超音波探頭中，BNR 值(光束不均勻比例，Beam Non-uniformity Ratio)、ERA 值(有效放射面積，Effective Radiation Area)以及波束的型式皆是重要的參數，而要測量這幾項參數，需有測量空間中點能量的工具，如水聽器，若之後能了解這些資訊，相信對於今後實驗的一些參數設定會有幫助。

量測生物反應器內的超音波場實驗中，主要的實驗限制有沉水式探頭在生物反應器中量測的精準度以及定位的標準化。超音波能量是從生物反應器側邊打入，沉水式探頭因為尺寸的關係無法放入測量，於是加裝了 90 度反射鏡。90 度反射鏡能讓沉水式探頭接收到來自側向的能量，但量測到的能量比原先正對著的低許多，而且在實驗當中較難確定反射鏡開口處正對於探頭，若反射鏡開口稍偏離超音波探頭，便量測不到訊號，因此，能確定探頭於空間中的面向對於量測的精準度有莫大的幫助。另外，因為沉水式探頭體積較大，於生物反應器內能移動的空間有限，無法精確且完善的測量內部的能量分布，若未來有機會借到水聽器測量，可使超音波場的建立更加完整。

拍攝 Live/Dead 影像時，髓核部分容易有綠色背景值，影響到拍攝以及分析時閾值的調整。另外，因使用的機台疊圖功能較不完善，今後拍攝 Live/Dead 影像時，若能使用疊圖得到空間中完整的活/死細胞分布，而非片面的影像資訊，對於分析組織內的細胞存活率會更加的準確。

第五章 結論與未來展望



5.1 結論

使用超音波刺激之全椎間盤培養系統的硬體建置已完成，包含確定探頭打出能量、基本的能量分布狀況，另外，也透過升溫現象確認超音波可打入組織內並使其吸收。目前本研究中感染為此設備尚未解決的問題，因無法順利培養豬隻椎間盤至 7 天，所以無法確認本研究最初想要測試超音波對細胞的影響的目的。


5.2 未來展望

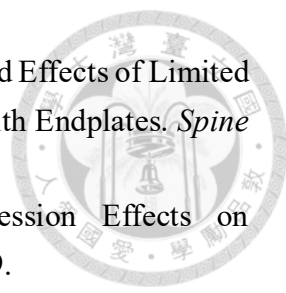
未來的目標為找出感染原因，並建立一可穩定培養 7 天的實驗流程。之後測試健康椎間盤對超音波刺激之生物、生化、力學功能反應，與觀察組織結構，建立比較觀察之基準線。

參考文獻



1. INOUE H. Three-Dimensional Architecture of Lumbar Intervertebral Discs. *Spine* 1981;6:139-46.
2. Raj PP. Intervertebral Disc: Anatomy-Physiology-Pathophysiology-Treatment. *Pain Practice* 2008;8:18-44.
3. Yu J, Peter C, Roberts S, et al. Elastic fibre organization in the intervertebral discs of the bovine tail. *Journal of Anatomy* 2002;201:465-75.
4. Johannessen W, Elliott DM. Effects of Degeneration on the Biphasic Material Properties of Human Nucleus Pulposus in Confined Compression. *Spine* 2005;30:E724-E9.
5. MARCHAND F, AHMED AM. Investigation of the Laminate Structure of Lumbar Disc Anulus Fibrosus. *Spine* 1990;15:402-10.
6. Holm S, Maroudas A, Urban JPG, et al. Nutrition of the Intervertebral Disc: Solute Transport and Metabolism. *Connective Tissue Research* 1981;8:101-19.
7. Nachemson A, Lewin T, Maroudas A, et al. In vitro diffusion of dye through the endplates and the annulus fibrosus of human lumbar inter-vertebral discs. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 1970;41:589-607.
8. Bogduk N. The lumbar disc and low back pain. *Neurosurg Clin N Am* 1991;2:791-806.
9. Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology* 2009;48:5-10.
10. Siemionow K, An H, Masuda K, et al. The Effects of Age, Gender, Ethnicity, and Spinal Level on the Rate of Intervertebral Disc Degeneration. A review of 1712 Intervertebral Discs. *Spine* 2011;36:1333-9.
11. Adams M, Dolan P, Hutton W. The stages of disc degeneration as revealed by discograms. *Bone & Joint Journal* 1986;68-B:36-41.
12. Andersson GBJ. Epidemiological features of chronic low-back pain. *The Lancet* 1999;354:581-5.
13. Katz JN. Lumbar Disc Disorders and Low-Back Pain: Socioeconomic Factors and Consequences. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 2006;88:21-4.
14. Adams MA, Stefanakis M, Dolan P. Healing of a painful intervertebral disc should not be confused with reversing disc degeneration: Implications for physical therapies for discogenic back pain. *Clinical Biomechanics* 2010;25:961-71.
15. Mirza SK, Deyo RA. Systematic Review of Randomized Trials Comparing Lumbar Fusion Surgery to Nonoperative Care for Treatment of Chronic Back Pain. *Spine* 2007;32:816-23.

- 
16. de Kleuver M, Oner F, Jacobs W. Total disc replacement for chronic low back pain: background and a systematic review of the literature. *European Spine Journal* 2003;12:108-16.
 17. Melrose J, Smith SM, Little CB, et al. Recent advances in annular pathobiology provide insights into rim-lesion mediated intervertebral disc degeneration and potential new approaches to annular repair strategies. *European Spine Journal* 2008;17:1131-48.
 18. Chen W-H, Lo W-C, Lee J-J, et al. Tissue-engineered intervertebral disc and chondrogenesis using human nucleus pulposus regulated through TGF- β 1 in platelet-rich plasma. *Journal of Cellular Physiology* 2006;209:744-54.
 19. Ganey T, Hutton WC, Moseley T, et al. Intervertebral Disc Repair Using Adipose Tissue-Derived Stem and Regenerative Cells: Experiments in a Canine Model. *Spine* 2009;34:2297-304.
 20. Wei A, Tao H, Chung SA, et al. The fate of transplanted xenogeneic bone marrow-derived stem cells in rat intervertebral discs. *Journal of Orthopaedic Research* 2009;27:374-9.
 21. Umeda M, Kushida T, Sasai K, et al. Activation of rat nucleus pulposus cells by coculture with whole bone marrow cells collected by the perfusion method. *Journal of Orthopaedic Research* 2009;27:222-8.
 22. Warden SJ. A New Direction for Ultrasound Therapy in Sports Medicine. *Sports Medicine* 2003;33:95-107.
 23. Khanna A, Nelmes RTC, Gougoulias N, et al. The effects of LIPUS on soft-tissue healing: a review of literature. *British Medical Bulletin* 2009;89:169-82.
 24. Welgus HG, Jeffrey JJ, Eisen AZ. Human skin fibroblast collagenase. Assessment of activation energy and deuterium isotope effect with collagenous substrates. *Journal of Biological Chemistry* 1981;256:9516-21.
 25. Miyamoto K, An HS, Sah RL, et al. Exposure to Pulsed Low Intensity Ultrasound Stimulates Extracellular Matrix Metabolism of Bovine Intervertebral Disc Cells Cultured in Alginate Beads. *Spine* 2005;30:2398-405.
 26. Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, et al. Synergistic effect of low-intensity pulsed ultrasound on growth factor stimulation of nucleus pulposus cells. *Journal of Orthopaedic Research* 2007;25:1574-81.
 27. Kobayashi Y, Sakai D, Iwashina T, et al. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation, proteoglycan synthesis and expression of growth factor-related genes in human nucleus pulposus cell line. *Eur Cell Mater* 2009;17:15-22.
 28. Haschtmann D, Stoyanov JV, Ettinger L, et al. Establishment of a Novel Intervertebral Disc/Endplate Culture Model: Analysis of an Ex Vivo In Vitro Whole-Organ Rabbit Culture System. *Spine* 2006;31:2918-25.

- 
29. Illien-Jünger S, Gantenbein-Ritter B, Grad S, et al. The Combined Effects of Limited Nutrition and High-Frequency Loading on Intervertebral Discs With Endplates. *Spine* 2010;35:1744-52.
 30. Korecki CL, MacLean JJ, Iatridis JC. Dynamic Compression Effects on Intervertebral Disc Mechanics and Biology. *Spine* 2008;33:1403-9.
 31. Gantenbein B, Grünhagen T, Lee CR, et al. An In Vitro Organ Culturing System for Intervertebral Disc Explants With Vertebral Endplates: A Feasibility Study With Ovine Caudal Discs. *Spine* 2006;31:2665-73.
 32. Lee CR, Iatridis JC, Poveda L, et al. In Vitro Organ Culture of the Bovine Intervertebral Disc: Effects of Vertebral Endplate and Potential for Mechanobiology Studies. *Spine* 2006;31:515-22.
 33. Jünger S, Gantenbein-Ritter B, Lezuo P, et al. Effect of Limited Nutrition on In Situ Intervertebral Disc Cells Under Simulated-Physiological Loading. *Spine* 2009;34:1264-71.
 34. Commission IE. IEC 61161, Ultrasonic power measurement in liquids in the frequency range 0.5 MHz to 25 MHz. *IEC, Geneva, Switzerland* 1992.
 35. Cardona MAR, Alvarenga AV, Costa-Félix RPBd. Primary level ultrasonic output power measurement at Laboratory of Ultrasound of Inmetro. 2006.