



國立臺灣大學牙醫專業學院臨床牙醫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Clinical Dentistry

School of Dentistry

National Taiwan University

Master Thesis

複合式雙鈣磷酸鹽類應用於植體周圍骨缺損之骨再生

能力評估：動物試驗

Effects of Dicalcium Phosphate Composite Graft in Bone

Regeneration for Peri-Implant Bony Defect: Animal Study

傅康貴

Fu, Kang-Kuei

指導教授：林俊彬 教授

郭生興 教授

Advisor: Lin, Chun-Pin Professor

Kok, Sang-Heng Professor

中華民國 102 年 6 月

June 2013



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

複合式雙鈣磷酸鹽類應用於植體周圍骨缺損之骨再生能力評估：
動物試驗

**Effects of Dicalcium Phosphate Composite Graft in Bone Regeneration for
Peri-Implant Bony Defect: Animal Study**

本論文係傅康貴君（學號 R00422027）在國立臺灣大學臨床牙醫學研究所完成之碩士學位論文，於民國 102 年 6 月 26 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：

<u>林俊彬</u>	<u>林俊彬</u>
<u>郭生興</u>	<u>郭生興</u>
<u>郭英雄</u>	<u>郭英雄</u>

所長：郭嘉村

誌謝



歲月如梭，光陰似箭，轉眼間碩士班的生涯已經接近尾聲。還記得剛進臨牙所時的青澀，直到現在的不捨，短短兩年不只讓我在學識上與態度上學到了許多，還讓我真正感受到自己的不足。很榮幸也很高興我在大學畢業六年後還有機會到台大臨牙所這樣知識的寶山來學習，更開心的是能夠加入口腔顎面外科這個團隊，在溫馨的氣氛下，即便是低溫的開刀房也溫暖了起來。在碩士班的這兩年，首先要感謝指導教授林俊彬院長與郭生興主任不論是在研究上或者是臨床上悉心的指導，讓我能同時學習臨床上的技巧並順利完成動物實驗。此外我也要特別感謝恩師章浩宏助理教授，在動物實驗的過程中悉心指導，不厭其煩地引導學生完成複雜的補骨手術。在口腔顎面外科的大家庭裡，除了郭生興主任與章浩宏醫師，還要感謝李正喆醫師、陳信銘醫師與鄭世榮醫師平日的指導與包容，讓學生能在實驗之餘到門診、病房與開刀房跟各位老師學習。也要感謝口腔顎面外科的學長姊們在這一路上的指導與同學們平日的幫忙，在這兩年裡遇到任何難關都仰賴你們才能順利度過。最後要感謝硬組織實驗室的研究團隊蔡尚節學長、林宜樺護理師、周承漢同學與黃奕超同學一路上一起努力地進行動物實驗，我的論文之所以能完成都是大家努力的成果，謝謝你們。

中文摘要



近年來，使用磷酸鈣鹽類作為生物合成的骨材在臨床上已經相當普遍，但此類骨移植材多為顆粒型式，顆粒大小自數十毫米到一毫米都有。雖然顆粒型的骨材比較容易填充縫隙，但是對於移植材料要能夠堅固撐出所需維持的空間以及要能穩定不動這兩點而言，顆粒型的骨材比較不適當。當應用在比較大之齒槽骨缺損時，可能會因為材料之擠壓變形而未能撐出空間，最後無法達到穩定良好的齒槽骨修復。因此，目前有許多複合式磷酸鹽類被發展出來並克服其強度不足的部分。在這些材料中，最近有一種主要由雙鈣磷酸鹽合併氫氧基磷灰石組成的新式骨塊被研發出來，這種材料除了具有足夠的機械強度之外，同時也具備了適當的降解率。本實驗的目的主要在研究此種新式複合代用骨塊用於植體周圍大範圍齒槽骨缺損重建之效能。

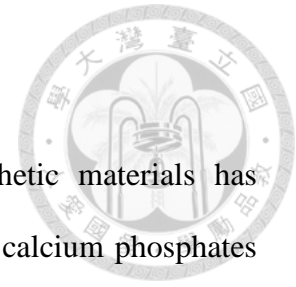
本實驗使用了3隻米格魯一歲成犬，體重介於7公斤到10公斤。主要分成3組，實驗組(n=7)，使用的骨材為複合雙鈣磷酸鹽與氫氧基磷灰石之代用骨塊；對照組 A(n=6)，使用的骨材為添加了膠原蛋白的雙相磷酸鹽(複合氫氧基磷灰石與 β 型三鈣磷酸鹽)；對照組 B(n=5)，沒有使用任何骨材。實驗的方式主要是將3隻米格魯獵犬的下顎骨左右4顆小白齒與第一大白齒拔除，在等待傷口癒合6週之後，會將本實驗3組不同材料合併植體依照不同的時間點隨機種植於3隻米格魯獵犬的下顎骨左右兩側，手術的方式主要是先在實驗動物的無牙齒槽脊上製備好一定大小的骨缺損，隨即利用預先準備好的骨材進行引導骨生成手術合併植牙手術。手術的時間點主要分成3個，分別是第0週、第4週與第8週，手術同時也會進行植體共振頻率的量測。另外在實驗的第8週與第10週分別會在3隻米格魯獵犬皮下注射骨標定染劑以供日後使用倒立螢光顯微鏡觀察植體周圍新生骨質沉積的速率與部位。最後，3隻米格魯獵犬統一於實驗的第12週犧牲，接著利用植體穩定商數分析、放射線影像分析、組織切片判讀、斷層掃描分析與骨頭螢光標定觀

察等方式分析人工植體周圍的骨整合程度。

在結果的部分，實驗組複合雙鈣磷酸鹽與氫氧基磷灰石之代用骨塊對於幫助新骨生成的部分，不論是新骨的量與質地或是新骨出現的快慢，其結果都優於對照組 A(複合氫氧基磷灰石、 β 型三鈣磷酸鹽與膠原蛋白的骨材)與對照組 B(不含任何骨材)。在統計上有明顯差異的部分分別是 12 週組的植體穩定商數、12 週組的 x 光片植體周圍骨覆蓋率、8 週組與 12 週組的組織磨片植體周圍骨覆蓋率以及 12 週組的斷層掃描植體周圍骨密度。另外在骨頭螢光標定的部分也顯示出實驗組複合雙鈣磷酸鹽與氫氧基磷灰石之代用骨塊在骨頭成熟的速度是明顯優於其他兩組對照組。


最後結論的部分，透過本研究團隊所建立的動物試驗模式，可以證明此種新式複合雙鈣磷酸鹽與氫氧基磷灰石之代用骨塊具有作為骨填補材的潛力。另外透過骨標定染色技術，除了呼應本實驗的其他結果，也讓我們發現新骨在骨缺損處生成的模式。

英文摘要



Using particulate form calcium phosphates as the biosynthetic materials has become popular in clinical practice. Although the particulate form calcium phosphates are easily to fill small bony defect, however, their insufficiency in strength lead to instability of the graft and poor space maintenance of defect which result compromised efficacy in alveolar bone regeneration, especially in large alveolar bone defect. Thus many combinations of different forms of calcium phosphates have been proposed to overcome insufficiency of strength in grafts. Recently, a new bone block constitutes with mainly dicalcium phosphates and partially hydroxyapatites with sufficient strength and adequate resorption rate has been developed. The purpose of this study is to evaluate efficacy of new bone formation of such new developed bone block in large peri-implant alveolar bony defect in animal model.

In this study, we use three beagle dogs, weighing between 7 kg to 10 kg, distribute to three groups as following: 1. experimental group (n = 7) which using the bone block containing dicalcium phosphates and hydroxyapatite (DCPD+ HA) as graft in defect; 2. control group A (n = 6) which using the collagen enhanced particulate biphasic calcium phosphate (hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate with collagen (HA+ β -TCP+collagen)) for defect repair; 3. control group B (n = 5) which without any bone graft (blood clot only) in defect. In this experiment, the extraction of four mandibular premolars and one first molar at bilateral mandible was done in the beginning. Following six weeks healing, the implantation over the mandible with bony defect preparation and guide bone regeneration would be preceded with test bone grafts or without any grafts randomly. The operations are performed at different time points (4-week, 8-week and 12-week) before the animal's sacrifices. At the time of operation,



the implantation was performed simultaneously with the measurements of implant stability using resonance frequency detector. We also injected the bone labeling fluorescence subcutaneously at the time point 4-w and 2-w before the animal's sacrificed for evaluation of the area and amounts of new bone deposition with inverted fluorescence microscope. After sacrificing, the use of implant stability quotient analysis, radiographic analysis, histological analysis, CT scan analysis and bone labeling technique were performed to evaluate the new bone formation and osseointegration at the bony defect around the eighteen implants.

Results of this study revealed that the efficacy of new bone formation and osseointegration of the experimental group (DCPD+HA) are better than control group A (HA+ β -TCP+collagen) and control group B (blood clot only), whether in the quantity and the quality of new bone or the speed of new bone formation. Statistical significant differences among different groups can be shown in peri-implant bone coverage ratios at 8-w following surgery. Moreover, significant statistical differences can also be shown in implant stability quotient values, radiographic peri-implant bone coverage ratios, histological peri-implant bone coverage ratios, CT bone mineral density at 12-w following surgery. In addition, the bone labeling technique proved similar pattern of healing among the three groups, however, the speed of new bone formation of the experimental group (DCPD+HA) is significantly higher than the other two control groups.

In present animal study, healing pattern and clinical efficacy in the new dicalcium phosphates and hydroxyapatite bone block has been throughout investigated and evaluated, furthermore, such a new dicalcium phosphates and hydroxyapatite bone block has showed promising efficacy in bone regeneration as compare to commercial calcium phosphates.

目錄

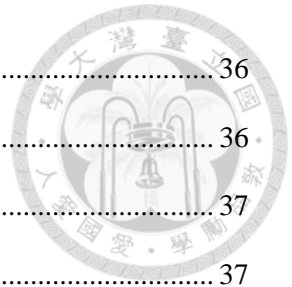


口試委員會審定書.....	I
誌謝.....	II
中文摘要.....	III
英文摘要.....	V
目錄.....	VII
圖目錄.....	X
表目錄.....	XII
第一章 緒論.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 研究動機.....	3
1.3 論文架構.....	4
第二章 文獻回顧.....	5
2.1 骨移植材料的種類.....	5
2.2 磷酸鈣鹽類.....	6
2.2.1 歷史沿革.....	6
2.2.2 分類.....	7
2.2.3 引導骨生成機制.....	8
2.2.4 製備方式.....	9
2.3 骨水泥.....	10
2.3.1 特性.....	10
2.3.2 分類.....	11
2.4 磷酸鹽添加膠原蛋白.....	12
2.5 關於非侵入性測量的方法.....	12
2.6 關於骨頭與植體接觸面積的計算方法.....	13
2.7 斷層掃描(micro-CT).....	14

第三章 材料與方法	16
3.1 實驗動物的選擇.....	16
3.2 實驗材料與實驗設計.....	16
3.2.1 實驗植體種類.....	16
3.2.2 實驗骨材種類.....	16
3.2.3 實驗設計.....	19
3.3 手術過程及術後照顧.....	20
3.3.1 實驗動物的麻醉.....	20
3.3.2 第一階段的手術步驟.....	21
3.3.3 第二階段的手術步驟.....	21
3.4 非侵入性臨床實驗觀察.....	25
3.4.1 臨床觀察及照顧.....	25
3.4.2 共振頻率測定方法.....	25
3.5 動物的犧牲及標本的取得.....	26
3.5.1 福馬林藥水的製備.....	26
3.5.2 動物的犧牲.....	26
3.5.3 標本的取得.....	27
3.6 標本製作與染色.....	28
3.6.1 標本的初步切割.....	28
3.6.2 不含植體的脫鈣標本製備.....	29
3.6.3 含植體磨片標本的製備.....	30
3.7 骨頭與植體接觸面積的計算方法.....	32
3.8 放射線影像分析與斷層掃描.....	34
3.8.1 放射線影像分析.....	34
3.8.2 斷層掃描.....	36
3.9 骨頭螢光標定.....	36



3.9.1 標定方法.....	36
3.9.2 本實驗所使用的螢光染劑.....	36
3.9.3 標定步驟.....	37
3.9.4 螢光顯微鏡觀察.....	37
3.10 本實驗所使用的統計方法.....	37
第四章 實驗結果.....	38
4.1 植體存活率與樣本排除.....	38
4.2 植體穩定商數(ISQ value).....	39
4.3 放射線影像分析.....	42
4.4 植體周圍齒槽骨再生率.....	47
4.5 斷層掃描分析.....	54
4.6 骨頭螢光標定.....	59
第五章 討論.....	63
5.1 存活率與排除樣本之探討.....	63
5.2 植體穩定商數(ISQ)之探討.....	63
5.3 放射線影像分析之探討.....	65
5.4 植體周圍齒槽骨再生之探討.....	66
5.5 斷層掃描分析之探討.....	67
5.6 骨頭螢光標定的探討.....	67
5.7 實驗設計限制之探討.....	69
第六章 結論.....	70
參考文獻.....	71



圖目錄



圖 3-1	ANKYLOS [®] plus A8	16
圖 3-2	(A)DCPD+HA (B)HA+ β -TCP+Collagen	17
圖 3-3	(A) 500X (B)1000X (C)3000X.....	17
圖 3-4	FormaAid [®]	18
圖 3-5	(A)Zoletil [®] 50 (B)Xylestesin-A [®] (C)Rompun [®] (D)Atropine	20
圖 3-6	(A)(B)拔牙術前 (C)(D)拔牙術後	21
圖 3-7	手術區域.....	22
圖 3-8	(A)以鉛筆畫出骨缺損外型 (B)使用骨鋸將骨頭移除	22
圖 3-9	(A)植牙機 (B)冷卻用食鹽水.....	23
圖 3-10	植牙手術.....	23
圖 3-11	(A)HA+ β -TCP+Collagen (B)DCPD+HA	24
圖 3-12	(A)以再生膜覆蓋 (B)使用 3-0 Nylon 縫合.....	24
圖 3-13	犧牲時取下的標本.....	28
圖 3-14	標本製備.....	29
圖 3-15	(A)真空包埋機(B)包埋好的標本(C)使用鋸片機切成 300 μ m ...	31
圖 3-16	使用不同顆粒大小的砂紙利用研磨機將標本磨製 30 μ m.....	32
圖 3-17	組織學上計算植體周圍骨吸收的示意圖.....	33
圖 3-18	放射線影像量化方法一：利用植體的螺紋判斷骨頭覆蓋高度	35
圖 3-19	放射線影像量化方法二：利用軟體算出植體的骨頭覆蓋率....	35
圖 4-1	術後樣本傷口暴露骨材的情況.....	38
圖 4-2	4 週組之組織磨片與切片，黃框為排除於實驗組的樣本。	48
圖 4-3	8 週組之組織磨片與切片	48
圖 4-4	12 週組之組織磨片與切片，黃框為排除於實驗組的樣本。 ...	49

圖 4-5	4 週組 (A)(D) : Maxibone (B)(E) : GingivAid (C)(F) : Empty .	60
圖 4-6	8 週組 (A)(D) : Maxibone (B)(E) : GingivAid (C)(F) : Empty .	61
圖 4-7	12 週組 (A)(D) : Maxibone (B)(E) : GingivAid (C)(F) : Empty	62
圖 5-1	植體周圍骨癒合模式示意圖	68



表目錄

表 2-1	磷酸鈣鹽類.....	7
表 3-1	降解 8 週內的酸鹼值.....	18
表 3-2	手術排程表.....	19
表 4-1	手術排程表，M3 與 M8 被歸類在對照組 Blood clot only 中 ...	39
表 4-2	ISQ Value	39
表 4-3	4 週組 ISQ 值之統計結果	40
表 4-4	8 週組 ISQ 值之統計結果	41
表 4-5	12 週組 ISQ 值之統計結果	41
表 4-6	ISQ 值在不同時間點之統計結果	42
表 4-7	植體螺紋覆蓋率 (0~4 分).....	43
表 4-8	植體骨覆蓋百分比 (單位: %)... ..	43
表 4-9	4 週組：植體螺紋覆蓋率之統計結果(*表示無法計算).....	44
表 4-10	4 週組：植體骨覆蓋百分比之統計結果.....	44
表 4-11	8 週組：植體螺紋覆蓋率之統計結果(*表示無法計算).....	45
表 4-12	8 週組：植體骨覆蓋百分比之統計結果.....	45
表 4-13	12 週組：植體螺紋覆蓋率之統計結果(*表示無法計算).....	45
表 4-14	12 週組：植體骨覆蓋百分比之統計結果.....	46
表 4-15	植體螺紋覆蓋率針對不同時間之統計結果(*表示無法計算)..	47
表 4-16	植體骨覆蓋百分比針對不同時間之統計結果.....	47
表 4-17	植體周圍骨覆蓋率(marginal bone height)	50
表 4-18	植體周圍骨頭最高點的骨覆蓋率(alveolar ridge bone height) ...	50
表 4-19	4 週組：植體周圍骨覆蓋率之統計結果.....	51
表 4-20	4 週組：植體周圍最高點骨覆蓋率之統計(*表示無法計算)...	51




表 4-21	8 週組：植體周圍骨覆蓋率之統計結果.....	52
表 4-22	8 週組：植體周圍最高點骨覆蓋率之統計(*表示無法計算)...	52
表 4-23	12 週組：植體周圍骨覆蓋率之統計結果.....	52
表 4-24	12 週組：植體周圍最高點骨覆蓋率之統計(*表示無法計算).	53
表 4-25	植體周圍骨覆蓋率之統計結果在不同時間點的比較.....	54
表 4-26	CT-bone volume (單位: mm ³).....	54
表 4-27	CT-bone mineral density	55
表 4-28	4 週組：植體周圍骨量之統計結果(*表示無法計算).....	56
表 4-29	4 週組：植體周圍骨密度之統計結果.....	56
表 4-30	8 週組：植體周圍骨量之統計結果(*表示無法計算).....	57
表 4-31	8 週組：植體周圍骨密度之統計結果.....	57
表 4-32	12 週組：植體周圍骨量之統計結果(*表示無法計算).....	57
表 4-33	12 週組：植體周圍骨密度之統計結果.....	58
表 4-34	植體周圍骨量針對不同時間點之統計結果(*表示無法計算)..	59
表 4-35	植體周圍骨密度針對不同時間點之統計結果.....	59




第一章 緒論

1.1 前言

目前在已開發的國家裡，有超過百分之六十的人需要做假牙贖復，其中又以植牙是最理想的選項。在這些病人中，有一兩成的人在植牙之前需要先做引導骨再生手術來加強植體的穩定度，所以我們可以說對於這些病人而言，引導骨再生手術在植牙的成功率上扮演很重要的角色(Jesus, Faleh et al. 2011)。


我們在臨床上常見到患者之齒槽骨因為牙周病或拔牙後之骨吸收造成骨缺損，當這些患者在進行像是植牙等相關之重建及補綴治療時，若沒有先進行適當的齒槽骨修復手術，將可能發生植體周圍炎等造成骨質破壞的併發症，進而影響人工植體的穩定性及預後。易言之，齒槽骨缺損之修復對於正常齒列之重建，是一極為重要的臨床目標。傳統上對於齒槽骨之缺損，主要使用骨引導再生手術來治療。這種手術所用來填補骨缺損的骨材，由自體骨移植、同種異體骨的骨移植、異種的骨移植到生物合成的代用骨材，已有數十年的發展；其中自體骨移植，被認為是相關治療方式中最無免疫排斥等問題，且有較多的生物相似成分及因子，生物相容性最佳，效果當然最好。然而自體骨移植亦有其不便之處，像是這類手術需要增加捐贈處的傷口，手術之複雜度因而提高，對於病患整體的治療是否真正有利，隨著相關代用骨材的開發，而有不同的爭議(Arrington, Smith et al. 1996, Giannoudis, Dinopoulos et al. 2005, 歐 2005, Jesus, Faleh et al. 2011)。

近年來，在代用骨材的開發方面，無論是同種異體骨的骨移植或異種的骨移植，雖然因為其均為生物來源的代用骨材而有較多的生物相似成分及因子，但仍仍有感染或引起免疫排斥之風險，其中部分材料之成本亦過高；故近年許多學者及研究人員，多以開發新式的生物合成代用骨為目標，這些生物合成代用骨之開發已成為近年來骨移植材料發展的趨勢(Khan, Sandhu et al. 2000)。



雖然許多學者及研究人員，以開發新式的生物合成代用骨為目標並積極投入相關之研發，材料的來源由天然的材料如幾丁聚醣(蔡 2007)、膠原蛋白、明膠到生醫陶瓷的材料(包 2008)：如氫氧基磷灰石、硫酸鈣與三鈣磷酸鹽等，這些材料有部分無法完全進入臨床操作使用，如幾丁聚醣，因為其內毒素及過敏的問題尚未解決，所以目前無法做為人體的骨移植材；而其他如膠原蛋白，氫氧基磷灰石及三鈣磷酸鹽等，雖已有臨床使用的產品，但仍有許多尚未解決的問題。依照王鴻烈教授的報告指出，齒槽骨修復的PASS四要素(Wang and Boyapati 2006)，分別為移植傷口處軟組織的初級縫合(primary wound closure)、良好的血液循環及供應(Angiogenesis)、移植材料能堅固到撐出所需維持的空間(maintain stability)以及移植材料要能穩定維持不動(stable without mobile)直到骨形成；目前用於齒槽骨修復的骨移植材多為顆粒型式，顆粒大小自數十毫米到一毫米都有，顆粒之組成較為鬆散，雖然顆粒型的骨材比較容易填充縫隙，但對於移植材料要能夠堅固撐出所需維持的空間及要能穩定不動這兩點而言，顆粒型的骨材比較不適當。因此當遇到較大之齒槽骨缺損，可能會因為材料之擠壓變形而未能撐出空間並且流動不穩，最後無法達到穩定良好的齒槽骨修復。有些學者則使用了鈦金屬加強之再生膜覆蓋在這些顆粒型式的骨材上，希望能達到較好的臨床結果，但加入了鈦金屬加強之再生膜後，移植傷口處軟組織的初級縫合可能會因為再生膜之厚度增加而較難達成，同時周圍的血液循環及供應也會受到再生膜阻隔的影響，故臨床上此類鈦金屬加強之再生膜合併顆粒性骨移植材之處理，需要難度較高的操作技巧，故其臨床成效差異頗大而成果報告不一致。

為了解決上述問題，近年來，有報告以骨科用之硫酸鈣或磷酸鈣等骨水泥材料，施打齒槽缺損處，希望藉著其可以快速硬化的特質，來改善顆粒性骨材強度不足且容易移動之缺點，雖然有相當之研究，但結論並不一致。且這類的材料在牙科而言尚屬仿單外適應症，故臨床上病人使用骨水泥之情況尚不普及。此外由於口腔內之齒槽骨僅蓋覆一層牙齦組織或口腔黏膜，不若身上四肢及脊椎骨有肌



肉筋膜等較厚之軟組織包覆，因此須考慮是否能讓硫酸鈣或磷酸鈣等骨水泥材料具有更佳之生物相容性，以減少局部組織水腫的反應，提供更快速的癒合，以減少黏膜的刺激及破損，降低骨移植材暴露的風險；若能進一步，考慮這類型的骨移植材一旦暴露，對於口腔環境亦能有相當之抵抗當然更佳，如此便能降低骨移植材一旦暴露於口腔即失敗的風險；此外，齒槽骨係提供牙齒或植體穩定支持之結構，特別是在齒槽骨不足處欲進行人工植體植入時，若能使材料強度加強，間接加強植體的初期穩定度，當可使植體之癒合更加快速。

1.2 研究動機

先前已說明了關於磷酸鈣骨水泥之水合硬化反應的過程，其理論上是可以經由溶解再結晶的方式形成片狀或針狀互相交織的結構，與骨質形成機械性的鍵結，若能減少對周圍組織的傷害，應可用於齒槽骨的重建治療。此外，由於磷酸鈣骨水泥材料硬化乃是經由水合反應，操作技術容易，並不需要特殊的儀器設備來使其固結硬化；而且磷酸鈣骨水泥與水調拌後之混合物具有適當的黏稠度，易於臨床操作使用。整體而言，磷酸鈣骨材具有良好的生物相容性，在模擬體液的環境下可以生成具有表面活性的氫氧基磷灰石，同時也具備了良好的封閉性與操作便利性，是一種深具潛力可以應用於齒槽骨重建治療的生醫材料。

本研究之目的在研究此種含有雙鈣磷酸鹽與氫氧基磷灰石之複合代用骨塊用於齒槽骨重建之效能，主要是以植體旁合併水平及垂直骨缺損之動物實驗模式，研究此一材料於臨床效用之優缺點，其評估方式包含組織切片判讀、骨植體接觸面積計算、植體共振頻率測定與放射線影像分析等用來分析人工植體周圍的骨整合程度，此外也以斷層掃描檢測之骨密度分析與放射線影像上之比較，進而了解材料對骨質密度的作用。本實驗還會使用骨標定染色技術來觀測新骨生成的癒合模式，進而分析此種骨材對於新骨生成的影響。



1.3 論文架構

本論文由六個章節組成，先由第一章序論及研究動機導入本實驗主題；第二章進行相關磷酸鈣骨材與實驗方法的文獻回顧，建立起相關理論知識基礎；第三章介紹本實驗的設計包含實驗動物的分組及各觀察測試時間點與本實驗採用的侵入及非侵入式的測試觀察方法；第四章進行實驗結果各項數據的統計，比較實驗組及對照組在各項統計上有無顯著差異性；第五章討論有沒有使用骨材在實驗統計數據上表現差異，進而驗證實驗組植體在引導骨新生的表現；最後由第六章結論說明本研究所獲致的研究成果。



第二章 文獻回顧

2.1 骨移植材料的種類

目前用於引導骨生成的材料主要可以分為四大類，包括自體骨移植、同種異體骨移植、異種骨移植以及生物合成骨材。

(1) 自體骨移植(Autogenous bone graft)

即為病人用自己的骨頭來做填補物，捐贈骨頭的位置主要可以根據所需骨頭的大小與性質不同而異，比較常見的位置包括有頰、下顎骨升支、上顎齒槽脊隆凸、上顎竇側壁以及腸骨等等；這類的骨材因為沒有免疫排斥的問題，同時具有較多的生物相似成分，生物相容性也是最好的，因此被認為是最佳的骨移植材。但這類的材料仍然有一些使用上的缺點，包括因為要先從捐贈區取骨頭，所以會增加手術時間。此外因為捐贈區解剖構造與位置的限制，使得骨移植的量與形狀有所限制。假設要取腸骨的話，還可能會因為全身麻醉或住院而產生額外的費用與風險，此外特殊的取骨器也是額外的成本之一。撇除這些缺點不談，這類型骨材的效果是最好的(Arrington, Smith et al. 1996, Giannoudis, Dinopoulos et al. 2005)。

(2) 同種異體骨移植(Allograft)

顧名思義則是使用同種異體的骨頭來做填補物，這種材料已經被使用超過 25 年，目前市面上主要有兩大類：Freeze-Dried Bone Allograft 與 Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft，也就是 FDBA 與 DFDBA，這類的材料因為來源仍然是同種的關係，雖然比不上自體骨移植，但是其仍然表現了不錯的生物相容性與效果。針對這種材料目前仍然有一些使用上的顧慮，包括還是有人認為這類型的材料會傳染疾病。Khan 在兩千年的時候便提出了因為使用同種異體骨移植而感染 HIV 的風險大約是在

一比一百六十萬分之一，然而比起輸血感染 HIV 機率的一比四十五萬分之一還是小了許多(Khan, Tomin et al. 2000)。



(3) 異種骨移植(Xenograft)

使用異種骨提煉出無機的礦化物質作為骨材，大部份是使用牛骨。在異種骨頭經過加工處理移除所有有機成分之後，留下來的部分幾乎是純的氫氧基磷灰石(HA)，因此不會引發人體的免疫反應，在結構上也與人骨十分相像，所以也是一種不錯的骨材，但仍有一些缺點，包括這類型的材料並沒有骨誘導生成(osteoinductive)的能力、多為顆粒狀而很難維持在一個位置不動與普遍需要較長吸收期，平均需要3到6年的時間(Skoglund, Hising et al. 1997)。

(4) 生化合成的骨材(synthetic biomaterials)

目前主流使用的化合物包括有磷酸鈣鹽類、硫酸鈣鹽類、氫氧基磷灰石與生化玻璃。這類型的材料最大的優點就是沒有感染與免疫的風險，成本相對其它材料而言也比較合理，因此近年來有許多學者與研究人員多以開發新的合成骨材為目標。而生化合成骨材之開發已成為近年來骨材發展的趨勢。只是目前這類型的材料特別是使用在牙科的部分有一個很大的缺點，就是這類型的材料常為顆粒狀或膠狀，性質較為脆弱而被建議使用於非受力的區域，然而如此便大大地影響了骨引導生成的效果。

2.2 磷酸鈣鹽類

2.2.1 歷史沿革

在牙科方面，磷酸鈣生醫陶瓷用於骨生成的部分之發展較慢；追溯其根源，早自1975年，Brown及Chow在國際牙科研究學會(IADR)中發表以四鈣磷酸鹽為牙齒填充材料(Alkhraisat, Marino et al. 2008)，其更進一步考慮將磷酸鈣生醫陶瓷嘗

試用於牙髓腔牙髓疾病之治療。1976 年 Nevins 等人首次報告合併膠原蛋白及磷酸鈣鹽之材料用於牙髓根管治療(Nevins, Finkelstein et al. 1976, Nevins, Wrobel et al. 1977, Nevins, LaPorta et al. 1980)，1983 年 Brown and Chow 以稀磷酸加入四鈣磷酸鹽與二鈣磷酸鹽的基質中，發現此一製程可以在室溫下合成氫氧基磷灰石，而且其硬化時 pH 值接近中性，活體動物試驗時發現植入後，不刺激組織、無毒性，並具有誘導骨生長的功能(osteoconductivity)，十分具有潛力。此研究團隊於 1987 年在美國陶瓷協會(American Ceramic Society)發表可以自行硬化的鈣磷系骨水泥，並將其定義為磷酸鈣骨水泥(calcium phosphate cement)簡稱 CPCs，由於磷酸鈣骨水泥具有高度的生物相容性及自行硬化的能力，使得磷酸鈣骨水泥成為修復骨缺陷的獨特材料。1990 年 Chow 提出利用磷酸鈣鹽為骨缺損取代物(bone replacement materials)，其後磷酸鈣生醫陶瓷在骨科及整形外科方面使用的相當頻繁，並有相當蓬勃的發展。

2.2.2 分類

磷酸鈣鹽類因為鈣磷比率及含水量之不同，而有不同的組成，其解離吸收時間端視不同成分之組成而有很大之差異，其分類如下表所示。

表 2-1 磷酸鈣鹽類

中文名稱	英文名稱	簡稱	化學分子式	Ca/P 鈣磷比	別稱
無水磷酸氫單鈣	Monocalcium phosphate anhydrous	MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5	
磷酸氫單鈣	Monocalcium phosphate monohydrate	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5	
磷酸二氫四鈣	Tetracalcium dihydrogen phosphate	TDHP	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0.67	
磷酸七鈣	Heptacalcium phosphate	HCP	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0.7	Tromelite
無水磷酸氫鈣	Dicalcium phosphate anhydrous	DCPA	CaHPO_4	1.0	Monetite

二水磷酸氫鈣	Dicalcium phosphate dihydrate	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0	Brushite
焦磷酸鈣	Calcium pyrophosphate	CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1.0	
二水焦磷酸鈣	Calcium pyrophosphate dihydrate	CPPD	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0	
磷酸八鈣	Octocalcium phosphate	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	
α 磷酸三鈣	α -tricalcium phosphate	α -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	
β 磷酸三鈣	β -tricalcium phosphate	β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	
無定型磷酸鈣	Amorphous calcium phosphate	ACP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_n \cdot \text{H}_2\text{O}$ $n=3-4.5$; 15%-20% H_2O	1.5-1.67	
沉澱型氫氧基磷灰石	Precipitate hydroxyapatite	PHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	1.5-1.67	
氫氧基磷灰石	Hydroxyapatite <u>Sintered hydroxyapatite</u>	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ <u>$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_5\text{OH}$</u>	1.67	
氧基磷灰石鈣	Calcium oxyapatite	OXA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	1.67	
碳酸型磷灰石	Carbonated apatite	CAP	$\text{Ca}_{8.8}(\text{HPO}_4)_?$ $(\text{PO}_4)_{4.5}(\text{CO}_3)_{0.7}(\text{OH})_{1.3}$	1.8	
磷酸四鈣	Tetracalcium phosphate	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0	

2.2.3 引導骨生成機制


根據國外學者的研究，基本上磷酸鈣鹽類可以有效地增加骨生成，但其細胞學及分子層次之機制仍不清楚(Barradas, Yuan et al. 2011)，許多學者提出不同的假設及看法(Heinemann, Heinemann et al. 2013)，一般而言，磷酸鈣鹽的巨觀結構、微



型結構、化學組成及表面能量等，被認為與刺激骨生成有關；因此，當利用磷酸鈣鹽類製備骨材時，可藉其孔洞的大小、結構的形式、骨塊的大小(Perez, Ginebra et al. 2011)、幾何形狀、孔隙大小(Roldan, Detsch et al. 2010)、離子釋放能力、化學組成(Al-Munajjed, Gleeson et al. 2008, Alkhraisat, Marino et al. 2008, Alkhraisat, Marino et al. 2008)、添加物(Alkhraisat, Marino et al. 2008, Alkhraisat, Marino et al. 2008, Alkhraisat, Rueda et al. 2009, Alkhraisat, Rueda et al. 2010, Perez, Kim et al. 2012)及表面能量(Al-Munajjed and O'Brien 2009)之調控，來達到改善磷酸鈣鹽類骨生成的能力。我們可以簡單地把磷酸鈣鹽類影響骨再生原因，分為組成方面的影響以及結構方面的影響，此兩者可能互為影響；以組成方面的影響而言，在添加物的部分，有學者認為加入 Mg、Zn 等離子，會改變 Ca 離子之釋放，有助於間質細胞或幹細胞分化為造骨細胞，進而促成骨質再生(Hong, Chun et al. 2011)；也有許多學者認為而加入明膠或膠原蛋白(Keeney, Collin et al. 2009, Moreau, Weir et al. 2009, Hild, Schneider et al. 2011)，也有可能改變磷酸鈣鹽之解離及再沉澱過程(Fan, Duan et al. 2005, Grimes, Bocklage et al. 2006)，進而影響磷酸鈣鹽類骨生成的能力；而以結構方面的影響而言，學者認為孔隙大小，骨材內孔隙或表面的粗糙程度，可以影響血管、養分及細胞接觸浸潤(infiltration)的深度，而造成不同的磷酸鈣鹽類骨生成的能力，而此等孔隙大小，骨材內孔隙或表面的粗糙程度最重要的關鍵除了材料組成以外，便是相關骨水泥及骨材之製備的過程(processing)了。

2.2.4 製備方式

由於磷酸鈣鹽類的組成不同，對於相關骨水泥及骨材之所開發之形式，亦有不同的看法；許多人習慣以顆粒型式(granules)作為骨材之型式，認為其充填效果較好，但也有相當的研究者認為此一形式不佳(Chapman, Bucholz et al. 1997, Lawson and Czernuszka 1998, Kesmas, Swadison et al. 2010)，顆粒型式如可自行硬化的骨水泥顆粒，在操作時因硬化過程中有血液及體液的污染(Karadas, Yucel et al.




2012), 可能造成硬化結果產生的骨材強度與在實驗室中所測得之結果差異很大; 因此近年來, 似乎有較多的學者或臨床醫師建議以預成型的骨塊(pre-solid block) (Torres, Tamimi et al. 2011), 此種預成型的骨塊, 可經由製備過程中控制在較低的溫度並維持骨材具有適當的含水量, 製作出更類似於骨骼組織的礦化組織結構。此外, 控制生成骨材或骨塊的製備方式, 亦有可能做出更適合用來作為藥物釋放的載體(Alkhraisat, Rueda et al. 2010, Wernike, Montjovent et al. 2010)或針對幹細胞實驗可以做為基質的支架(Karadas, Yucel et al. 2012, Heinemann, Heinemann et al. 2013), 基本上合成磷酸鈣基質的方法, 有過濾法(leaching)(O'Hara, Orr et al. 2012)、氣泡形成法(foaming)、乳化法(emulsion)(Maas, Guo et al. 2011)、冷凍乾燥法(freeze drying)、模具形成法(templates)及快速成形法(rapid prototyping)(蔡 2007), 目前大多數人還是僅用單一方式製備, 使用最多的還是過濾法(leaching), 其次是模具形成法(templates), 近年來快速成形法(rapid prototyping)逐漸受到重視, 未來可能在更大缺損的修復時, 可以用此等方式來客製化製備較大的骨塊, 以達到重建的目標。

2.3 骨水泥

2.3.1 特性

目前有關骨科所使用的骨水泥材料多以磷酸鈣或硫酸鈣為主(歐 2005, 鄧, 黃 et al. 2006)。基本上, 硫酸鈣鹽類之吸收速度較快, 約在 4 至 6 週便吸收解離, 相較於人類骨完整癒合通常要數月的時間, 對於空間維持之效果可能較為不足(歐 2005)。反觀磷酸鈣骨水泥則有以下優點:

- (1) 磷酸鈣鹽硬化後產生的晶體結構與自然骨十分接近, 磷酸鈣骨水泥硬化後會含有很大比例的孔隙, 所以具有良好引導骨組織向內生長能力同時也可以增加機械鍵結。

- 
- (2) 磷酸鈣鹽類具有高度的塑模性，同時其臨床操作性極佳，可修補複雜形狀的骨折、骨缺陷。
 - (3) 磷酸鈣鹽類具有高度的生物活性及骨誘導再生性，同時又無毒性或不良的副作用，植入後亦不刺激周圍組織。

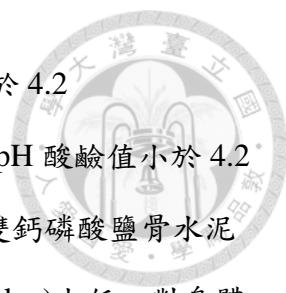
但是在齒槽重建之應用上還需符合幾點要求：

- (1) 材料能引導骨質的再生成。
- (2) 良好的生物相容性，不刺激周遭軟組織。
- (3) 減少發炎反應。
- (4) 具有良好機械性質及強度。
- (5) 有良好的操作性質。
- (6) 若能具有抗菌性則更佳。

目前在骨科及整形外科使用多年的磷酸鈣骨水泥(CPCs)其組成與骨頭成分相近，確實對骨頭及其周邊組織的刺激不大，但其操作性質差，使得磷酸鈣骨水泥應用於齒槽骨缺損受到限制，因此本研究團隊針對磷酸鈣骨水泥材料的缺點，發展出一種新的複合材料，可以改善傳統骨水泥的性質，有效加強強度。由於口腔區域之齒槽骨與身上其他四肢及脊椎骨之解剖特性並不一致；口腔內之齒槽骨僅覆蓋一層牙齦組織或口腔黏膜，故此等磷酸鈣等骨水泥材料必須具備更佳之生物相容性，於材料降解時，不可以過酸或過鹼，以減少局部組織發炎反應，達到快速初級癒合，降低骨移植材暴露的風險；此外，齒槽骨係提供牙齒或植體穩定支持之結構，特別是在齒槽骨不足處欲進行人工植體植入時，若能使材料強度加強，便能間接加強植體初期的穩定度，當可使植體之癒合更加快速。

2.3.2 分類

目前磷酸鈣骨水泥在市場上的產品，大至可依據反應產生的產物，分為二類(鄧, 黃 et al. 2006)：

- 
1. 氫氧基磷灰石骨水泥(HA Bone Cement)：其 pH 酸鹼值大於 4.2
 2. 雙鈣磷酸鹽骨水泥(Dicalcium Phosphate Bone Cement)：其 pH 酸鹼值小於 4.2

氫氧基磷灰石骨水泥被身體的吸收降解的速率非常慢；而雙鈣磷酸鹽骨水泥的機械強度很難控制，並且凝結時，骨水泥的表面酸鹼值(pH value)太低，對身體組織容易產生刺激發炎作用。

2.4 磷酸鹽添加膠原蛋白

在目前常用的膠原蛋白中，以第一型膠原蛋白為最為普及。第一型膠原蛋白佔骨骼中蛋白質的百分之九十以上。內生性的膠原蛋白，具有促進軟組織及骨骼癒合的功能，外來的膠原蛋白則有止血的效用(Wu, Huang et al. 2004, Grimes, Bocklage et al. 2006)。它可以吸引並活化嗜中性球及纖維母細胞，並在傷口癒合、重塑時期和各種細胞交互反應，它的生物特性及低的免疫活性，使得膠原蛋白成為引人注目的生物材料，但其有機械強度較差的缺點。在先導研究中，發現膠原蛋白與磷酸鹽摻混的代用骨，可發揮膠原蛋白特性，改善磷酸鹽的韌性及操作性質，並起提昇其生物特性，而磷酸鹽則可維持較佳的骨引導生成能力，並加強機械強度不夠的問題，兩者合成摻混應用，可發揮相得益彰之功效(Salasznyk, Williams et al. 2004, Hsu, Tsai et al. 2005)。

2.5 關於非侵入性測量的方法


在本實驗中主要採用共振頻率分析(resonance frequency analysis)來做為非侵入性測量方法，其原理主要是利用共振的諧振原理(resonant principle)。所謂諧振原理是在一定的物理條件下發出一特定頻率，使受測物體產生最大的響應狀態，此時所對應的頻率則稱為諧振頻率，這是一個信賴度與重現性都很高的測量方式(Gupta and Padmanabhan 2011)。在目前臨床與學術研究上這種測量方



式已經被廣為採用(Herrero-Climent, Albertini et al. 2012)，早在1992年已經有相關實驗開始使用此種方法，在1999年由英國的兩位學者Prof. Neil Meredithleeds與Prof. Peter Cawley導入臨床使用，本實驗所使用的頻率分析儀OSSTELL Mentor[®] (Integration Diagnostics, Savedalen, Sweden)(Herrero-Climent, Albertini et al. 2012)主要是將感測器(transducer, SmartPeg)連接在植體上，利用電磁產生各種頻率去振動感測器，以量測紀錄產生最大諧振的共振頻率，並經過共振頻率分析(resonance frequency analysis)計算後，將共振頻率量化轉換為數字範圍從1至100的ISQ商數值(implant stability quotient)。臨床上經過一段癒合期後ISQ值平均若在60以上，則代表植體周圍有成功的骨整合(Gonzalez-Garcia, Monje et al. 2011)，當ISQ值小於40則代表此植體有很可能會失敗(Scarano, Carinci et al. 2007)。影響ISQ值的因素有骨頭的量與骨質的密度、骨頭與植體的接觸面積以及植體露出在齒槽脊上的高度(Fischer, Backstrom et al. 2009, Sim and Lang 2010, Kang, Kim et al. 2011)。

2.6 關於骨頭與植體接觸面積的計算方法

本實驗採用測量植體周圍齒槽骨萎縮(marginal bone loss)(Pikner, Grondahl et al. 2009, Malchiodi, Cucchi et al. 2013)的方式來反推出植體與周圍骨頭的接觸面積。對於Bone Implant Contact的定義為一種透過組織學及組織型態學(histological and histomorphometric)直接證明骨細胞有長到植體表面構造上(Froum, Simon et al. 2005)。由於骨整合(osseointegration)的定義，係指骨細胞直接與人工植體的表面接觸癒合，中間並沒有其他結締組織，所以常被運用在人工植體與骨頭間有無骨整合發生的證據驗證上，MBL(marginal bone loss)計算方法，主要是測量植體肩台到植體上第一個BIC(bone implant contact)位置與植體長度的距離百分比，進一步便可以推算比較植體被骨頭覆蓋



的量。主要會運用組織染色技術在顯微鏡下觀察可發現標本有無發炎或是感染，同時在鏡下可以觀察植體表面與周圍骨頭的交界處有無新骨生成(Iezzi, Pecora et al. 2006)，並檢視周圍骨小樑及哈氏系統以評估骨代謝生成的情形(bone remodeling)。

2.7 斷層掃描(micro-CT)

Micro-CT除了可以佐證組織學上的觀測，還能在縱向觀測同一個位置的骨頭變化，所以近年來有許多研究會使用 micro-CT 來作為分析的工具(De Smet, Jaecques et al. 2007)。特別需要注意的是使用 micro-CT 來分析鈦合金植體周圍的骨頭會呈現出金屬碎片的影像(metal artifacts)，這個現象是由射線硬化效應(beam hardening effect)、散射(scatter)、非線性部分體積效應(nonlinear partial volume effect)與噪音效應(noise)綜合而成，如此會影響植體與骨頭交界處的判讀，雖然有些研究建議使用鋁製濾片於樣本跟感應器中間來減少金屬碎片影像的產生，但還是無法完全減少金屬的影響(Stoppie, van der Waerden et al. 2005, De Smet, Jaecques et al. 2011)，所以在這個部分組織學上的觀測仍然是很重要的。有學者提出組織型態學上所觀測的骨小樑數量與厚度會稍微比 micro-CT 上量測的數值還高(Rebaudi, Koller et al. 2004)，這當然也是金屬碎片影像的關係，其範圍主要是在金屬植體周圍 60 μ m 範圍內，因此在這個範圍外或植體根尖螺紋外的區域都可以清楚的觀測骨頭的量與質地(Stoppie, van der Waerden et al. 2005)。本實驗觀測比較的範圍主要是在植體周圍 2mm 範圍內的骨頭量與質地，因為遠遠超過金屬影響影像的範圍，所以我們認為其影響會明顯變小。本實驗主要使用 micro-CT (Bruker-microCT[®]SkyScan1176 in-vivo micro-CT)將所有標本掃描一遍，使用的像素尺寸為 35.52398 μ m，電壓為 80kV，電流為 313 μ A，最後則利用 Skyscan[™] CT-analyser software 分析得到的數據，主要可以算出每支植體周圍 2 公釐範圍內骨頭

的量與硬度，雖然會有金屬碎片影像的影響，但是在本實驗中斷層掃描分析主要是用來做為比較不同樣本的骨頭新生，重視的是互相之間的相對關係而非絕對值，因此仍然有使用上的意義。





第三章 材料與方法

3.1 實驗動物的選擇

本實驗使用了 3 隻 Beagle dog 的一歲成犬，體重介於 7 公斤到 10 公斤。Beagle dog 成犬的下顎骨型態、牙周組織反應與人類相似，並且下顎骨骨頭長度寬度大小適合植入牙科植體合併引導骨再生手術，因此本研究的實驗動物選擇使用 Beagle dog 成犬。

3.2 實驗材料與實驗設計

3.2.1 實驗植體種類

本實驗所使用的人工植體為德國大廠 ANKYLOS[®] plus A8，此種植體由 2 級鈦所構成，尺寸為直徑 3.5 公釐、長 8 公釐，總共在 18 個位置上種植了 18 支植體。



圖 3-1 ANKYLOS[®] plus A8

3.2.2 實驗骨材種類

本實驗所使用的骨材主要有兩種，第一種為複合雙鈣磷酸鹽與氫氧基磷灰石之代用骨塊(圖 3-2A)，第二種為複合氫氧基磷灰石、 β 型三鈣磷酸鹽與膠原蛋白的骨材(圖 3-2B)。這兩種骨材都預先製備成長 10 公釐、寬 8 公釐、厚 4 公釐的大小，並且在骨材中央打上直徑 4 公釐的孔洞用來容納預定種植之直徑 3.5 公釐的

植體。

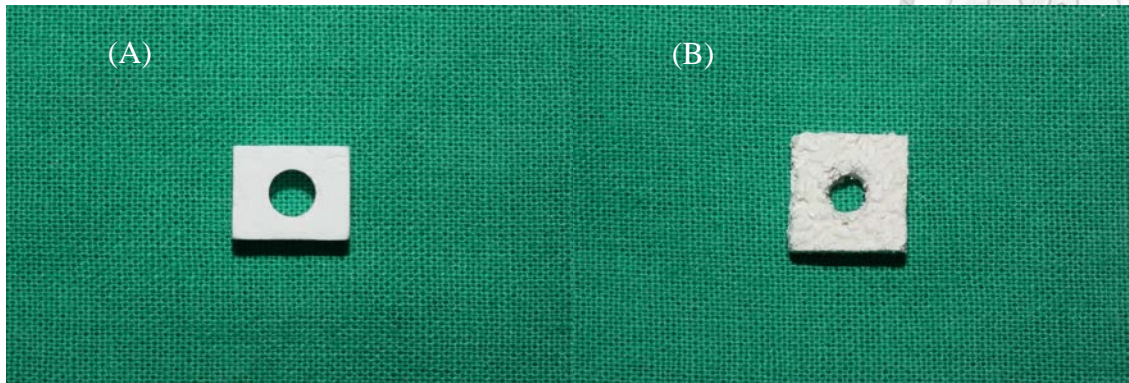


圖 3-2 (A)DCPD+HA (B)HA+ β -TCP+Collagen

第一種複合雙鈣磷酸鹽與氫氧基磷灰石之代用骨塊是本研究最主要的實驗組。這種材料主要由 70% 的雙鈣磷酸鹽所組成，剩餘的 30% 為氫氧基磷灰石。其孔隙的百分比為 41.93%，並於民國 102 年 5 月在台灣上市，商品名為 Maxibone[®]，這邊附上 500 倍、1000 倍以及 3000 倍的掃描式電子顯微鏡之觀察結果。

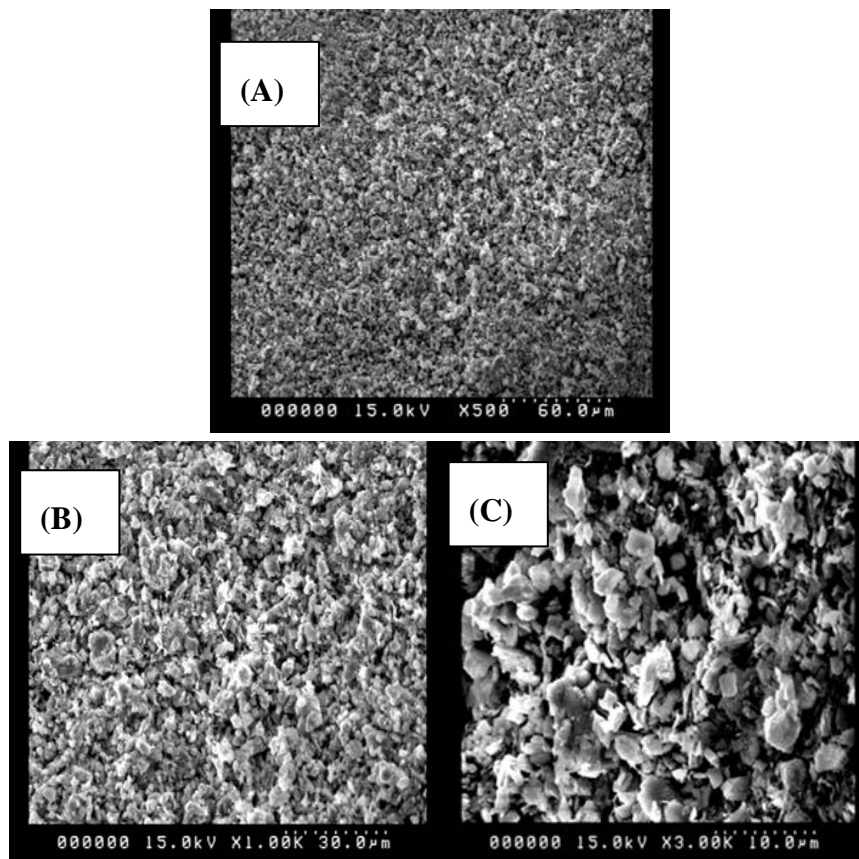
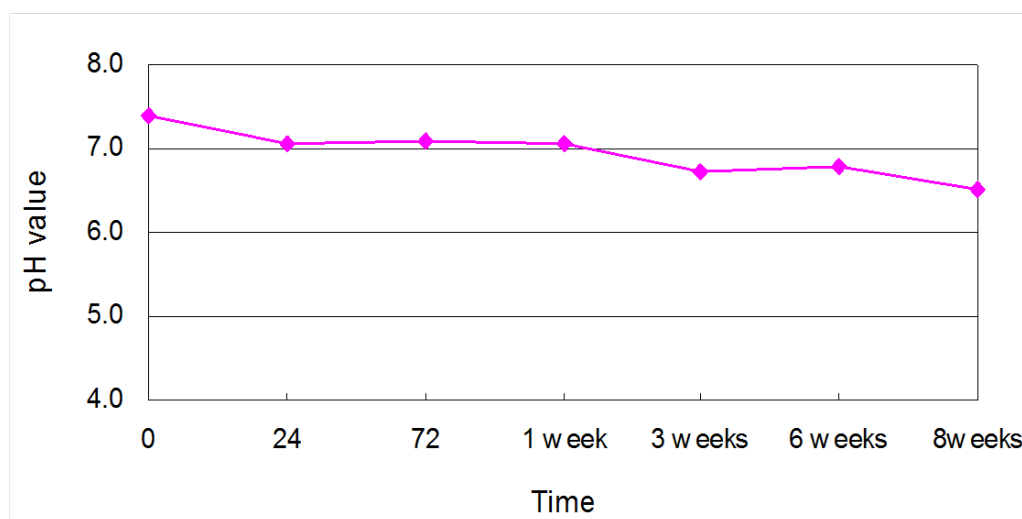


圖 3-3 (A) 500X (B) 1000X (C) 3000X



實驗組材料降解過程直到 8 週的酸鹼值分布在 PH6.5~PH7.5，跟傳統的雙鈣磷酸鹽骨水泥降解時 PH 值會降到 4.2 以下有很大的不同，下表則是本實驗材料降解 8 週內的酸鹼值。

表 3-1 降解 8 週內的酸鹼值



第二種複合氫氧基磷灰石、 β 型三鈣磷酸鹽與第一型膠原蛋白的骨材則是在國內已經上市的产品，其商品名為 GingivAid[®]，使用的效果穩定所以拿來作為對照組。

另外，在進行骨引導再生手術的最後會放上可吸收的再生膜，本實驗使用的材料為在國內已經上市的再生膜，商品名為 FormaAid[®]，這種材料主要是從 bovine 的 achilles tendon 純化出來的 fibrous collagen matrix 所製成，由於具有 cross-linked 的 collagen fibers，所以可以有效延長其吸收的時間。材料如下圖所示。



圖 3-4 FormaAid[®]



3.2.3 實驗設計

本實驗總共分為三組，第一組為實驗組，第二組為對照組，第三組為空白組，每一組除了空白組之外包含 6 支植體與 1 種骨材，總共有 18 支植體。首先會將 3 隻米格魯獵犬的下顎骨左右 4 顆小白齒與第一大白齒拔除，在等待傷口癒合 6 週之後，會將本實驗三組不同材料合併植體依照不同的時間點隨機種植於 3 隻米格魯獵犬的下顎骨左右兩側。手術的時間點主要分成 3 個，分別是第 0 週、第 4 週與第 8 週，手術同時也會進行植體共振頻率的量測。另外在實驗的第 8 週與第 10 週分別會在 3 隻米格魯皮下注射骨標定染劑 Calcein green 與 Alizarin complexone。最後，3 隻米格魯獵犬統一於實驗的第 12 週犧牲，同時也會進行植體共振頻率的量測。本實驗所使用的材料分組、位置與手術時間如下表所示。

表 3-2 手術排程表

動物編號	植入位置與對應樣品					
	實驗組: Dicalcium phosphate dihydrate+HA M1 M2 M3 M4 M5 M6 M7 M8 M9					
	對照組: HA+β-TCP+Collagen			B1 B2 B3 B4 B5 B6		
	對照組: Blood clot only			E1 E2 E3		
	右	←	右	左	→	左
	下顎實驗時間					
	4wks (2012/11/30)		8wks (2012/11/02)		12wks (2012/10/05)	
R3	R1	R2	L2	L1	L3	
1679	M7	B5	M4	M5	E1	B1
1699	B6	M8	B3	E2	M1	M2
1948	M9	E3	M6	B4	M3	B2



3.3 手術過程及術後照顧

3.3.1 實驗動物的麻醉

實驗動物的麻醉主要是使用全身麻醉合併手術區域的局部麻醉。全身麻醉的部分主要是以皮下注射一劑含有 Zoletil[®] 50 (0.2ml/kg) (Virbac, Carros, France) 2ml 及 Rompun[®] (Bayer, Leverkusen, Germany) 0.2ml，再加上 Atropine (0.05ml/kg) 0.5ml 以減少麻醉後的嘔吐反應並增加心跳次數，注射之後等待約 5-10 分鐘讓動物進入全身麻醉的階段，再於手術區域施以 1.8 毫升含有 1:100,000 腎上腺素的 Xylestesin-A[®] (3M ESPE, Seefeld, Germany) 來進行局部麻醉，阻斷該區域的神經傳導及加強手術部位止血作用，材料如下圖所示。



圖 3-5 (A)Zoletil[®] 50 (B)Xylestesin-A[®] (C)Rompun[®] (D)Atropine



3.3.2 第一階段的手術步驟

這個階段主要會拔除實驗動物的下顎雙側 4 顆前白齒(P1、P2、P3、P4)及第一大白齒(M1)。首先會完成實驗動物的麻醉程序，接下來會使用拔牙挺與拔牙鉗將實驗動物下顎雙側共 10 顆牙齒拔除，並且使用 3-0 的可吸收縫線將傷口緊密縫合，最後在術後 7 天視傷口情形拆線。接下來等待 6 週之後再進行第二階段的手術，步驟如下圖所示。



圖 3-6 (A)(B)拔牙術前 (C)(D)拔牙術後

3.3.3 第二階段的手術步驟

這個階段進行的是本實驗最主要的手術，手術的位置以及預定放置的骨材依照手術排程表上的順序進行。在完成全身麻醉的程序之後，以自動張口器將上下顎撐開，以水溶性碘酒(β -iodine)進行口腔消毒，覆以洞巾在無菌狀態下進行局部麻醉，如下圖所示。



圖 3-7 手術區域

接下來以 15 號刀片在無牙脊最上緣，由犬齒往遠心到第二大白齒之間作一道切線，刀片於牙齦上切入至下顎骨骨膜下，再以骨膜剝離器往頰舌兩側翻開，暴露出預計進行手術的無牙脊區域。再以鉛筆在無牙脊上畫出預計製造的骨缺損，大小為長 10mm、深 4mm 同時範圍從頰側延伸到舌側的長方體，之後便以轉速 1200r.p.m.，直徑 5mm 的骨鋸將範圍內的骨頭移除，如下圖所示。

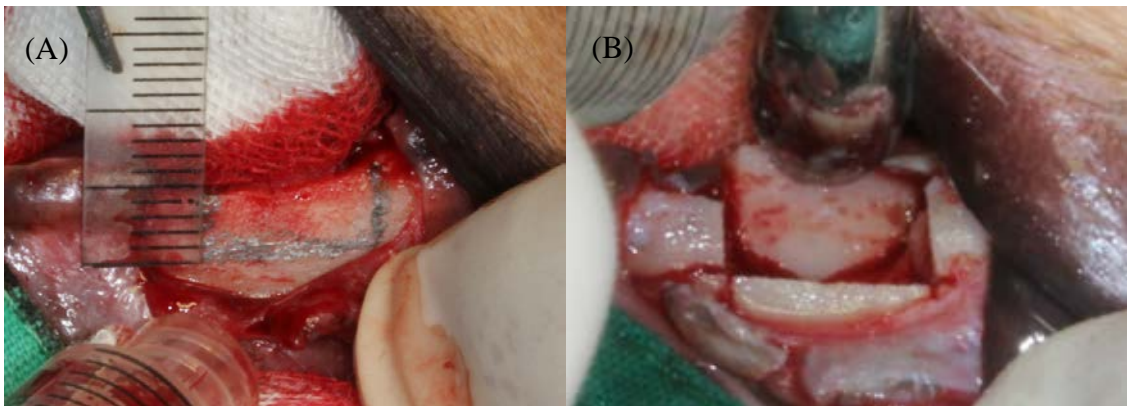


圖 3-8 (A)以鉛筆畫出骨缺損外型 (B)使用骨鋸將骨頭移除

接下來進行植牙手術，首先以植牙手機(20:1 surgical contra-angle hand piece, WI-75 LED G)依序接上直徑 2.0mm、2.5mm、3.0mm 以及 3.2mm 之鑽針以轉速 1200 r.p.m.在先前製備完成的骨缺損正中央鑽至深度 4mm，期間以 0.9%生理食鹽水(南光, 250ml, Saline)作為植牙機(W&H ImplantMED, SI-915)的水冷卻水源，伴隨植牙機頭噴水於手術部位做為冷卻，如此以避免鑽針與骨頭摩擦產生高溫造成骨壞死，

如下圖所示。

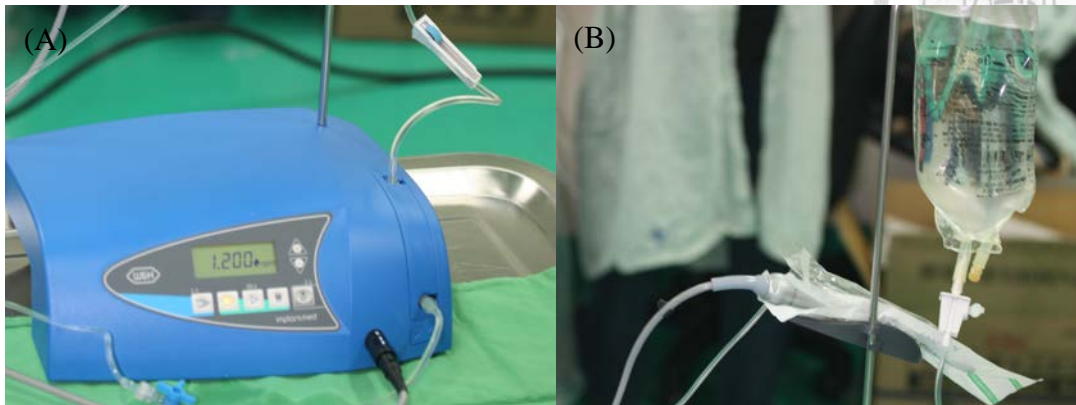


圖 3-9 (A)植牙機 (B)冷卻用食鹽水

在預備植牙部位將骨頭修形為深度 4mm，直徑為 3.2mm 的植牙窩洞，將植體以接連器與植牙手機相連接，設定 15r.p.m.的速度與 35Ncm 的扭力，以電動機械的方式將植體旋轉鎖入已製備好的植牙窩洞，在鎖入的過程中不斷以生理食鹽水加以沖洗冷卻，直到植體一半深度所對應的螺紋與骨頭齊平，沒入深度為 4mm，如下圖所示。

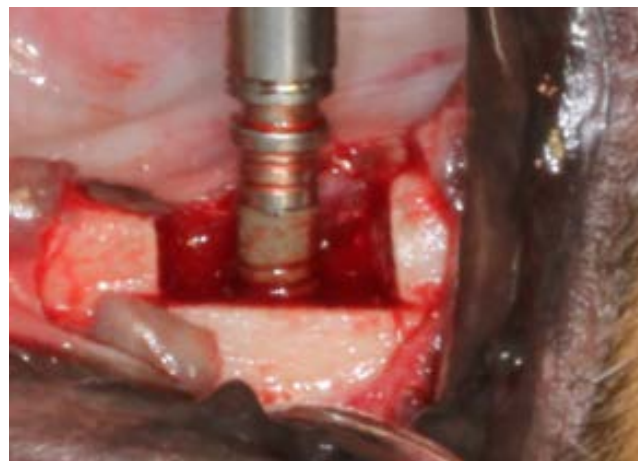


圖 3-10 植牙手術

接下來以手動扭力扳手來確認植體及骨頭之間機械性摩擦力是否達到 35Ncm 以上，作為植體初期穩定度觀察值，最後再以 10Ncm 的扭力鎖上覆蓋螺絲。

最後則是引導骨生成手術的部分。首先，將預先製備好的骨材中間的孔洞對準植體的中心，慢慢地放入直到骨材與骨缺損窩洞之間沒有縫隙，過程中若有阻

力則使用植牙手機修磨骨材多餘的部分使其吻合植體與骨缺損的尺寸，如下圖所示。

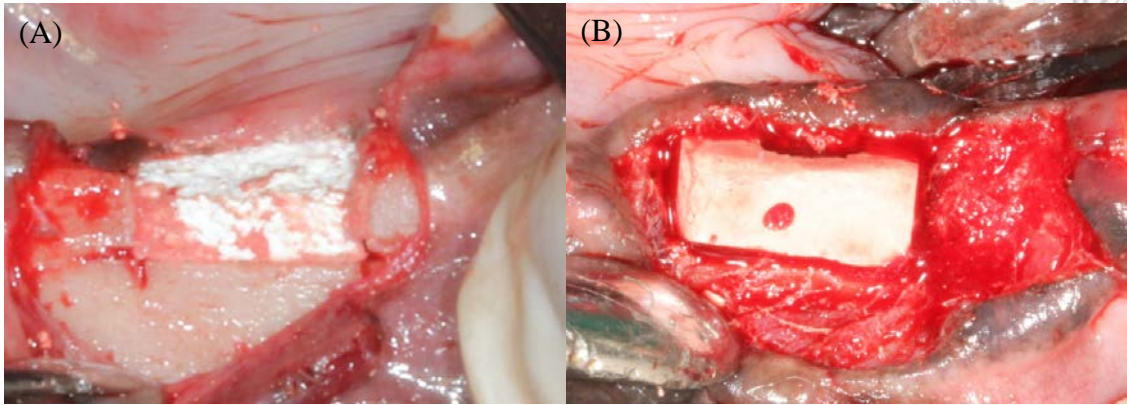


圖 3-11 (A)HA+β-TCP+Collagen (B)DCPD+HA

當骨材將植體露出的部分完全掩蓋同時穩定地填滿骨缺損位置，接著便蓋上裁剪好的可吸收再生膜(FormaAid® Collagen Membrane)，最後使用 3-0 的尼龍縫線將傷口緊密縫合。術後觀察實驗動物的生命及生理跡象是否穩定，檢查傷口是否緊密縫合沒有出血，術後 6 小時內禁食直至麻醉作用消退，如下圖所示。

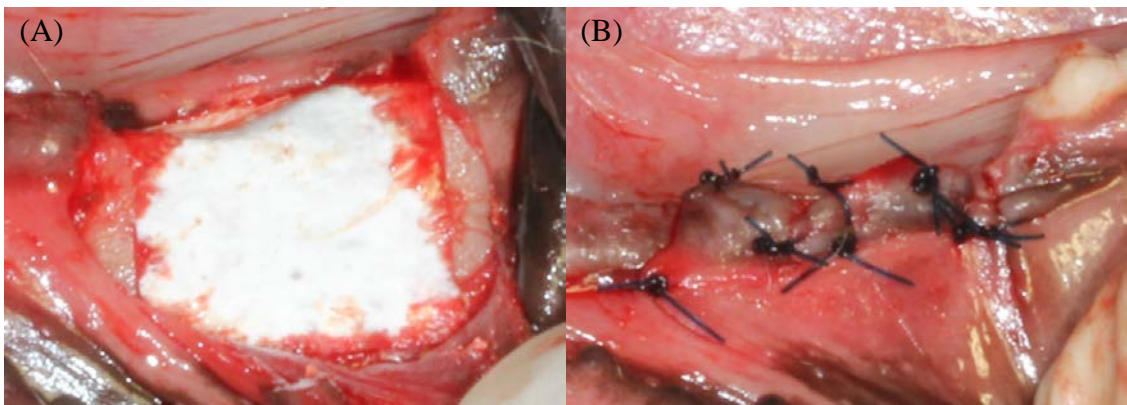


圖 3-12 (A)以再生膜覆蓋 (B)使用 3-0 Nylon 縫合

術後會進行為期 3 天的預防性給藥，每次給予 Acetaminophen (Tinten®) 1 顆 250 毫克以及 Amoxicillin 1 顆 250 毫克，1 天 2 次以控制疼痛並預防感染；3 天用藥結束後，若無急性發炎反應即可停藥，術後 1 週若傷口癒合良好便將縫線移除。

手術後 2 週內餵食泡過水的軟化飼料(Pep dog food, QuakerQatsCo.,

Peterborough, Ontario)，1 天餵食 1 次，其間觀察動物進食的食量及活動情形，並測量其體重變化，每週清潔口腔並評估傷口癒合狀況，使相關數據資料完整如實記錄，也確保實驗動物獲得妥善照顧。



3.4 非侵入性臨床實驗觀察

3.4.1 臨床觀察及照顧

在實驗動物進行犧牲前，每週在全身麻醉下，對實驗動物進行口腔清潔工作，以棉棒及 chlorhexidine 清洗牙齒與無牙脊，同時臨床觀察植牙傷口癒合情況、傷口有無感染、牙齦有無發炎分泌物及骨材是否脫落，若傷口有裂開之情形則會適時以 3-0 尼龍線補縫合並加強口腔清潔，同時會紀錄動物體重變化及進食情形以確保實驗動物健康。

3.4.2 共振頻率測定方法

依照手術排程表，在實驗動物犧牲的同時會針對口腔內所植入的植體，利用頻率分析儀 OSSTELL Mentor[®] (Integration Diagnostics, Savedalen, Sweden) 測量植體的共振頻率，臨床上以垂直植體長軸方向，分別於每個植體近心頰側、頰側、遠心頰側、近心舌側、舌側、遠心舌側 6 個方位測試並記錄數據，加以平均後做為該植體當次所測得共振頻率。自從 1997 年以來，共振頻率分析(resonance frequency analysis, RFA) 為將植體穩定度量化的方法之一(Ersanli, Karabuda et al. 2005, Scarano, Carinci et al. 2007)。其原理是利用一個會發出頻率的儀器，對著植體上會產生反應的接頭發射頻率，使其產生一種共振的頻率。此儀器會紀錄產生最大振幅所需要的頻率，定義為此植體的共振頻率，當植體越穩定時，所產生的共振頻率越高。本實驗所使用的儀器 OSSTELL Mentor[®](Integration Diagnostics, Savedalen, Sweden)，主要是先將一個帶有磁鐵的金屬(SmartPeg)連接到植體上，之後儀器會激發一個 5~15 kHz 的頻率來測定這個連接到植體上的金屬(SmartPeg)以

產生共振頻率(Cawley, Pavlakovic et al. 1998, Pattijn, Van Lierde et al. 2006)。此儀器會自動將共振頻率轉換為植體穩定商數，又稱為 ISQ 值 (Implant Stability Quotient, ISQ)，植體穩定商數介於 0-100 之間，此商數與共振頻率呈現為一線性的正比關係，因此臨床上會利用 ISQ 值來做為植體穩定程度的量化數字。



3.5 動物的犧牲及標本的取得

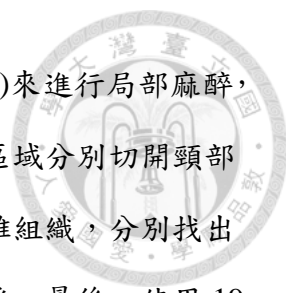
3.5.1 福馬林藥水的製備

福馬林藥水的製備步驟如下，首先，將血清玻璃瓶注滿蒸餾水 dH₂O (Distilled water)，以藥匙、秤藥紙調配所需的劑量：以 4% PA in PBS (1 pig/1 L) 的比例(PA 為 Paraformaldehyde, PBS 為 Phosphate Buffered Saline)，調製比例為 dH₂ : PA : PBS=1L : 40g : 9.55g。

將藥粉加入血清玻璃瓶中，注意勿將蓋子栓緊並放進高壓鍋消毒約 5 分鐘。在高壓消毒結束後再將血清瓶蓋子栓緊並移至常溫下靜置過夜，讓溫度慢慢下降。最後分裝至 500 毫升的點滴軟袋內並在封口後移至 4°C 冰箱冷藏備用。

3.5.2 動物的犧牲

動物的犧牲過程主要是依據國立臺灣大學實驗動物中心施行安樂死的指南進行。依照本實驗的排程表，實驗動物預計在第二階段手術後的第 12 週進行犧牲，步驟如下。首先進行深度全身麻醉，主要是以皮下注射 1 劑含有 Zoletil®50 (0.2ml/kg) (Virbac, Carros, France) 2ml 及 Rompun® (Bayer, Leverkusen, Germany) 0.2ml，再加上 Atropine (0.05ml/kg) 0.5ml 以減少麻醉後的嘔吐反應並增加心跳次數，注射之後等待約 5~10 分鐘讓動物進入全身麻醉的階段。一開始會先使用共振頻率分析儀 OSSTELL Mentor® (Integration Diagnostics, Savedalen, Sweden)測量所有植體的共振頻率值，接著讓動物以腹部朝上姿態，使用繩索將其四肢的關節拉撐並固定在平台夾具上，於距離頸部中線兩側約 2 公分的手術區域施以 1.8 毫升含有



1:100,000 腎上腺素的 Xylestesin-A® (3M ESPE, Seefeld, Germany)來進行局部麻醉，阻斷該區域的神經傳導及加強手術部位止血作用。之後於手術區域分別切開頸部皮膚，切線為平行頸部中線的 6 公分直線，切開皮膚後分層撥離組織，分別找出其兩側的外頸靜脈與頸總動脈，並將其與周圍結締組織剝離乾淨。最後，使用 19 號針頭插入頸總動脈中並以 3 號黑絲線固定，另外使用靜脈輸液導管(IV SET)將血液從靜脈引流出來並將灌流液體從頸總動脈進行灌流。灌流的步驟為先以加壓袋將 2000 毫升的生理食鹽水從頸總動脈灌注，同時將血液從外頸靜脈引流出來，如此可以稀釋並置換頭頸部的血液，待引流出來的血液呈淡紅色，在利用加壓袋將預先製備好的 2000 毫升福馬林藥水從頸總動脈灌流入動物體內，此時可觀察實驗動物的舌頭開始變得僵硬，同時舌緣的顏色由紅色變成蒼白，此時可見四肢強直伸張，同時靜脈引流液轉為淡黃透明的福馬林藥水。先以生理食鹽水再以福馬林藥水灌注是為了避免紅血球及內生性抗原影響我們準備要觀察的下顎組織。

3.5.3 標本的取得

在實驗動物灌流完成之後，使用 15 號刀片將兩側嘴角劃開，切線延伸至第二大臼齒後約 3 公分處，使用骨膜撥離器將軟組織撥開並露出下顎骨角，接著使用骨鋸切斷左右下顎骨角，再將刀片沿著下顎骨體前庭底部由下顎骨角向近心方向切開，撥離下顎骨體底部的組織便可將下顎骨體游離出來。最後，將帶有完整牙齦的下顎骨體標本取下並使用電動線鋸將上面不同組別的植體連同周圍的骨頭分開，每一組骨塊標本均帶有一隻植體及周圍完整的牙齦組織，其近遠心長度統一控制在 1.5 公分，並浸泡在 10% 的福馬林溶液中固定數週，如下圖所示。



圖 3-13 犧牲時取下的標本

3.6 標本製作與染色

3.6.1 標本的初步切割

將浸泡在福馬林溶液中數週的標本取出，將植體上的覆蓋螺絲更換成癒合帽，以方便定位植體的長軸平行於慢速精密切割機的載具(Isomet[®], Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA)，再以自塑性的樹脂將標本固定在載具上。接下來，將載具裝回切割機上，使用直徑 127mm 厚 0.4mm 的鑽石刀片(Series 15HC)從植體的頂端沿著長軸往底部進行切割，最後植體順著長軸被分成兩半，每一個標本厚度約為 5~7 公釐並帶有植體周圍的骨頭與軟組織，其中一半會進行不含植體的脫鈣標本製備，另外一半則會連同植體一起進行包埋、切片與磨片。標本製備的兩條路線如下圖所示。

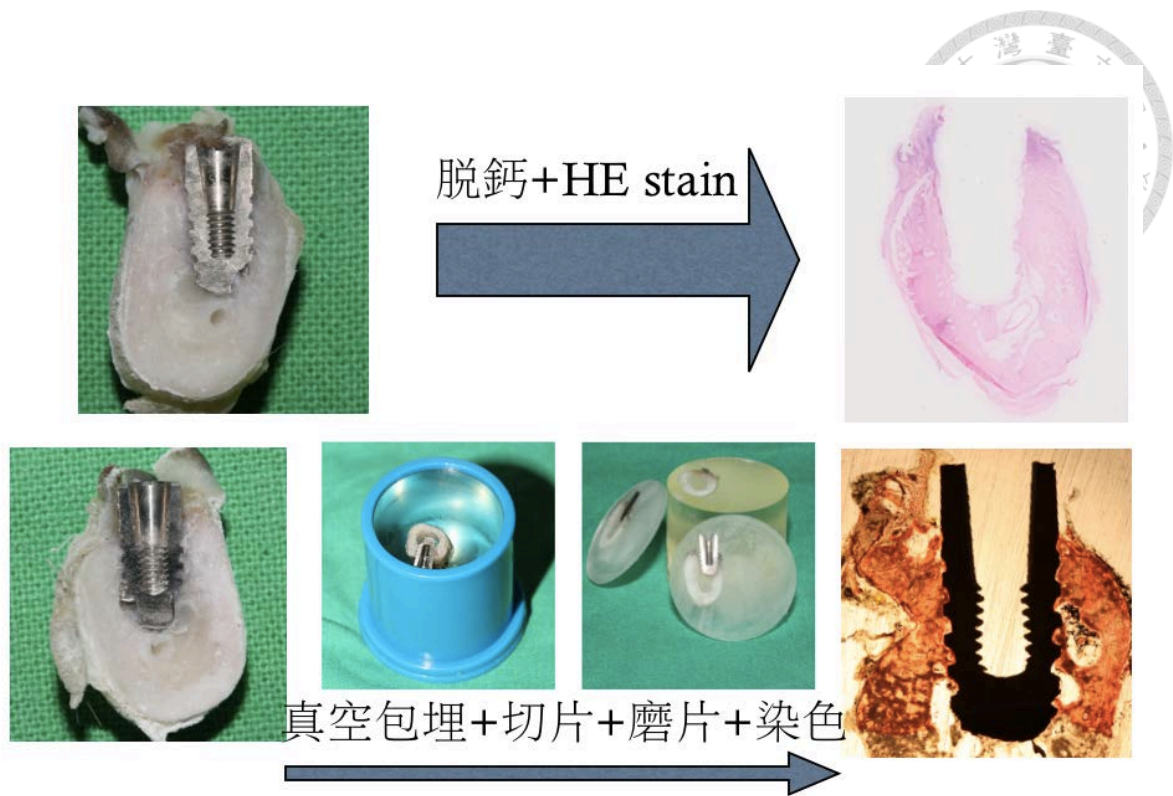


圖 3-14 標本製備

3.6.2 不含植體的脫鈣標本製備

一半的標本共 18 件在製作切片前會先進行脫鈣使標本軟化，本實驗主要使用複方無機酸來進行脫鈣，如此可以避免破壞組織細胞結構。此複方包含鹽酸 8 毫升、醋酸 5 毫升和水楊酸 10 公克一起加在蒸餾水 87 毫升，脫鈣過程中需加熱但不超過 45°C，待脫鈣完成後，植體與硬組織間較易分離，此時小心以探針撥離植體並注意避免傷到植體周圍組織。

接下來，先將標本以清水放流沖洗 30 分鐘以除去組織固定液及酸液，再將其浸泡於酒精進行脫水，依序利用低至高濃度，分別以 75%、80%、90%、95% 與 100% 的酒精脫水各 1 個小時以完成脫水，脫水後的標本因為不含水所以不會有跟石蠟不相容的問題。接下來進行石蠟包埋，將標本放置於石蠟包埋機裡面，以二甲苯浸潤 1 小時後取出，由於乙醇可以溶於二甲苯，所以組織內充滿二甲苯時會呈現相當程度的透明狀態，此時將二甲苯當作透明劑，再以二甲苯浸潤 2 小時，使組織中充滿二甲苯，因為石蠟溶於二甲苯不溶於乙醇，透蠟的過程中以石蠟浸潤 1

小時後取出，目的是為了除去組織中的透明劑二甲苯，再以石蠟浸潤 2 小時使組織中的石蠟達到飽和狀態，最後進行包埋。包埋製程是將透蠟組織與 50°C~60°C 溶化的石蠟一起放入容器中，接著立即以冷水冷卻以形成蠟塊。

將包埋完成的標本以石蠟組織切片機切成 5 μ m 厚的組織切片，再以切片烘片機乾燥 24 小時。切片因接下來需要進行染色觀察，而染劑溶於水卻不溶於蠟，所以切片要經脫蠟覆水過程才得以進行染色，由於此時切片的體積較小，所以需要脫蠟覆水的時間也較短，過程主要是用二甲苯來脫蠟 5~10 分鐘，再依序以 100%、95%、90%、80%、75% 的酒精浸泡 3~5 分鐘以便除去二甲苯，最後在放入蒸餾水中 3 分鐘，便完成脫蠟覆水的步驟。

最後會進行切片染色，其步驟為先浸泡 Hematoxylin 10 分鐘，再以自來水沖洗 3 分鐘，直到顏色變藍後將切片放入 1% 鹽酸乙醇液(鹽酸 1 份+70% 乙醇 100 份)中去除過濃的染色，見切片呈紅即可，大約需要 10 秒。此步驟稱為分色，目的主要能使細胞核著色更加清晰，接著使用自來水沖洗直至顏色又呈現為藍色，再以蒸餾水清洗 30 秒後再次進行脫水，將切片依序泡入 50%、70%、80% 的乙醇中各 3~5 分鐘後，再覆以 Eosin 對比染色 2 分鐘。最後，再以 95% 及 100% 乙醇去除多餘的 Eosin 和水分，接著以二甲苯及乙醇(1:1)溶液浸泡 3~5 分鐘，最後使用二甲苯浸泡 2~3 分鐘 2 次使切片透明利於鏡下觀察，最後以中性樹脂及蓋玻片封蓋便完成脫鈣標本製備。

3.6.3 含植體磨片標本的製備

將另外一半的標本共 18 件先進行樹脂包埋，主要是使用環氧樹脂 epoxy resin (Epothin, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) 在真空包埋機(Cast N'Vac 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) 中進行包埋，由於真空包埋機能將其內部的空間抽真空而達到負一大氣壓，如此可以減少包埋時所產生的氣泡。在等待 24 小時樹脂硬化後，使用鋸片機(Saw microtome; Leica SP1600, USA) 將包埋好的標本切成薄片，此時切

出來的厚度約為 250-300 μm 。接下來，使用中性樹脂將標本固定在載玻片上，再將載玻片固定在研磨機(Automatic300, PRESI, USA)的夾具上，一開始以每分鐘 120 轉的速度，施力 0.5 公斤，依序以 120 號與 180 號的砂紙加水研磨，最後降低轉速到每分鐘 60 轉，施力 0.5 公斤，以 600 與 1200 號的砂紙加水研磨拋光，將磨片磨至 30 μm 厚(Cano-Sanchez, Campo-Trapero et al. 2005)再進行染色，步驟如下圖所示。

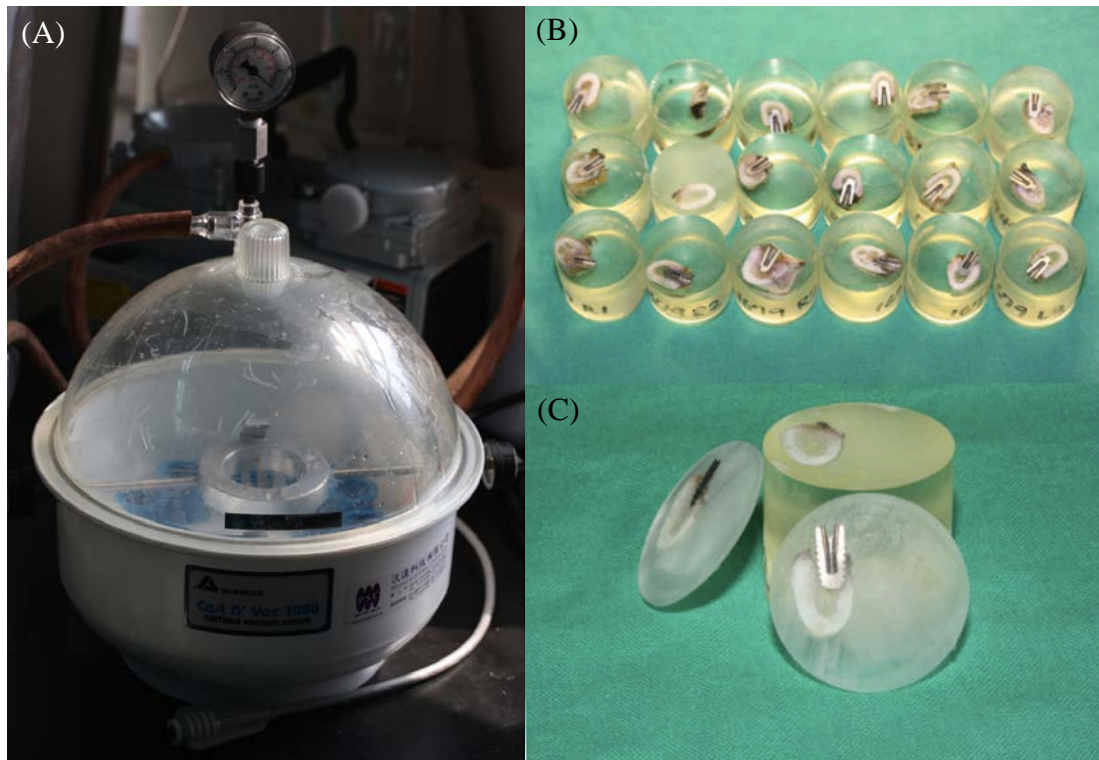


圖 3-15 (A)真空包埋機(B)包埋好的標本(C)使用鋸片機切成 300 μm

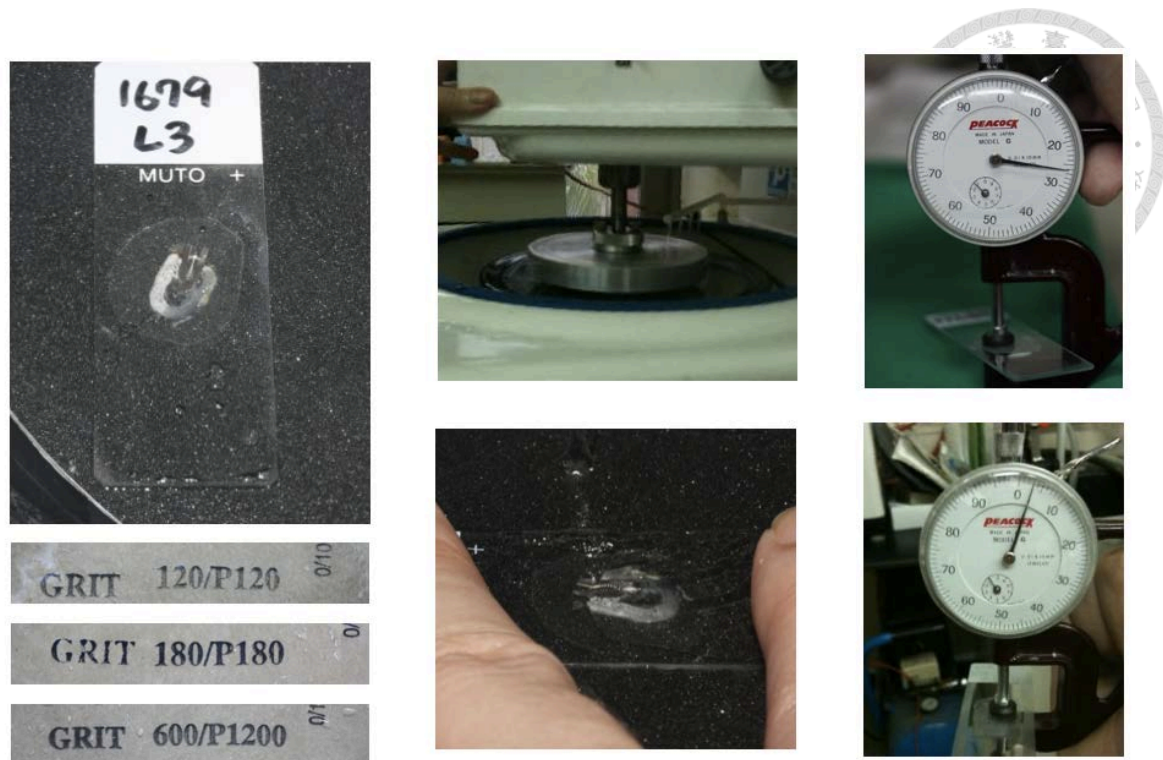


圖 3-16 使用不同顆粒大小的砂紙利用研磨機將標本磨製 30 μ m

磨片標本所使用的染劑有 Stevenel's blue 與 Alizarin red S，前者主要可以將細胞與細胞外結構裡的軟組織染成不同程度的藍色，而後者則可以將礦化的組織染成橘色到紫色。染色的步驟為先將標本浸泡在含有 Stevenel's blue 並且已經預熱到 60°C 的染劑中，再使用 60°C 的蒸餾水沖洗乾淨後自然風乾。接著再利用滴管將少量的 Alizarin red S 在室溫的狀態下滴在標本的表面，靜置 5 分鐘之後使用流動的蒸餾水沖洗乾淨，等到自然風乾之後便完成染色(Maniatopoulos, Rodriguez et al. 1986, Gotfredsen, Budtz-Jorgensen et al. 1989)。

3.7 骨頭與植體接觸面積的計算方法

本實驗主要是在比較不同骨材對於植牙骨缺損處的骨生成效果，因此需要測量的骨頭與植體接觸面積之範圍主要是在植體上原本骨缺損的位置，也就是植體的上半段。本實驗所使用的是長 8 公釐的植體，因此需要測量的範圍主要落在植體上半段 4 公釐的部分，而測量的方式是利用 Image-J 軟體(National Institutes of Health, USA)先測量每個植體磨片的植體周圍骨吸收(marginal bone loss)，進一步可

以反推出不同骨材對於骨頭生成的效果。

測量的步驟為使用數位病理掃描機(SCANSCOPE CS)掃描染色好的植體磨片，配合數位病理管理量測分析系統(AperioTechnologies.Inc.Vista, CA, USA)，將切片影像數位化以 50 到 200 倍率觀察，接著使用 Image-J 軟體先從植體的頂部平台上拉出一條垂直植體長軸的直線，分別計算這條直線與植體根尖處、頰側骨頭與植體表面接觸的最高點、頰側骨頭的最高點、舌側骨頭與植體表面接觸的最高點與舌側骨頭的最高點共五個位置的垂直距離，如此在植體頰側的部分可以將頰側骨頭與植體表面接觸的最高點到植體平台的距離除以植體平台到植體根尖的距離來代表頰側的植體周圍骨吸收(marginal bone loss)，另外也可以將頰側骨頭最高點到植體平台的距離除以植體平台到植體根尖的距離來代表頰側的骨頭最高點的骨吸收(alveolar ridge bone loss)，而舌側的位置同樣也可以得到這兩個數值，最後計算頰側與舌側的平均值來代表此植體的植體周圍骨吸收(marginal bone loss)與植體周圍最高點的骨吸收(alveolar ridge bone loss)，下面則附上示意圖。



圖 3-17 組織學上計算植體周圍骨吸收的示意圖

另外，我們也使用光學顯微鏡 (MP-116A, Digilens CO.,LTD, Taiwan) 以 40 到 100 倍觀察 HE 染色切片，並接上數位相機 (COOLP7900, Nikon, USA) 擷取影像

傳送到螢幕上(VX2250WM-LED, ViewSonic, Taiwan)與植體磨片進行比對，確認植體周圍骨吸收與植體周圍最高點的骨吸收這兩個數值的準確性，同時可以進一步觀察骨生成處骨小樑分布及鈣化的情形與骨缺損處發炎感染程度。



3.8 放射線影像分析與斷層掃描

3.8.1 放射線影像分析

在所有標本包含了 18 支植體總共 36 件開始進行脫鈣或包埋之前，會使用 X 光機拍攝記錄每一件標本包括植體與周圍組織，拍攝的角度為從植體的近心或遠心方向垂直於植體的頰舌方向針對植體橫切面拍攝，拍攝的時候植體橫切面緊貼於 X 光片，最後會得到 36 件標本的放射線影像，主要可以顯示出植體與其周圍骨頭的覆蓋程度，接著我們會使用兩個方法量化放射線影像上植體周圍骨頭的覆蓋率。

第一個方法主要是利用植體的螺紋來判斷骨頭覆蓋的高度，本實驗所使用的植體在放射線影像上可以看到七個螺紋，首先我們將骨頭覆蓋植體表面的程度分成五個等級，當骨頭覆蓋率超過植體的第一個螺紋上緣的時候定義為 4 分，當覆蓋超過第二個螺紋上緣的時候定義為 3 分，當覆蓋超過第三個螺紋上緣的時候定義為 2 分，當覆蓋超過第四個螺紋上緣的時候定義為 1 分，當覆蓋低於第四個螺紋上緣的時候定義為 0 分。因此，每支植體分為兩件標本，每件標本又可以分為頰側與舌側兩個分數，所以一支植體會有 4 個分數，取其平均值代表每支植體的骨頭覆蓋率，我將它定義為植體螺紋覆蓋率，方法可參照下圖。

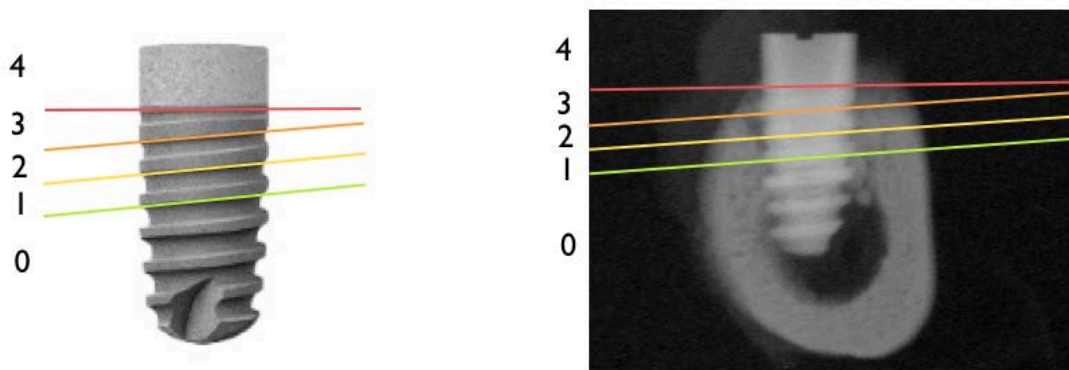


圖 3-18 放射線影像量化方法一：利用植體的螺紋判斷骨頭覆蓋高度

第二個方法是利用 Image-J 軟體在放射線影像上沿著植體頰側表面拉出一條涵蓋植體全長的直線並計算長度，接著在同樣的表面拉出一條涵蓋有骨頭覆蓋的植體表面的直線同樣計算長度，最後將後者除以前者便可以得出植體頰側表面的骨頭覆蓋率，同樣每支植體可以分為兩件標本，每件標本又可以分為頰側與舌側兩個覆蓋率，所以一支植體會會有 4 個覆蓋率，取其平均值代表每支植體的骨頭覆蓋率，方法如下圖所示。

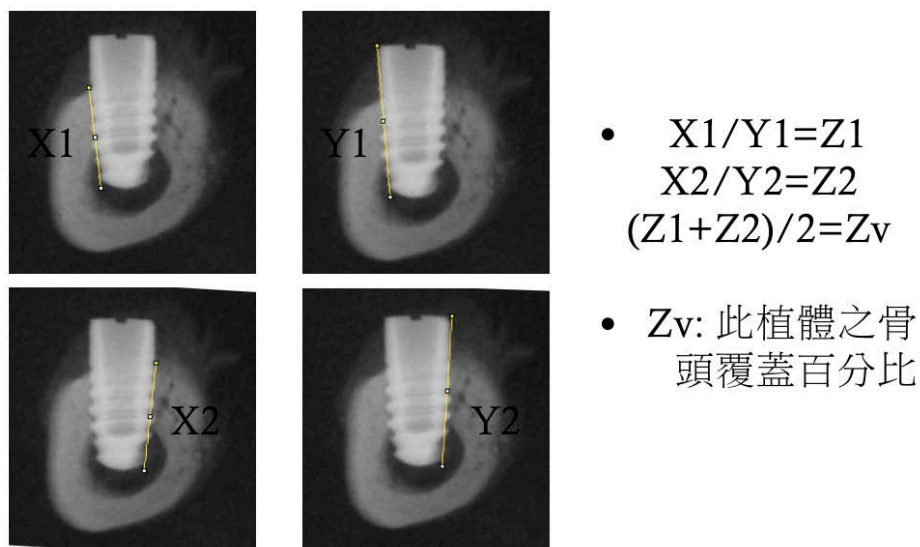


圖 3-19 放射線影像量化方法二：利用軟體算出植體的骨頭覆蓋率



3.8.2 斷層掃描

在所有標本從下顎骨分切完成並放置於福馬林溶液 10% 固定數週之後，在其尚未進行對切、包埋、脫鈣及染色之前，會先使用 micro-CT (Bruker-microCT[®] SkyScan1176 in-vivo micro-CT) 將所有標本掃描一遍，使用的像素尺寸為 35.52398 μ m，電壓為 80kV，電流為 313 μ A，最後則利用 Skyscan[™] CT-analyser software 分析得到的數據，主要可以算出每支植體周圍 2 公釐範圍內骨頭的量與硬度。

3.9 骨頭螢光標定

3.9.1 標定方法

首先需要讓實驗對象經過口服或非口服的方式服用會與鈣離子螯合的螢光染劑，這些螢光染劑會進入血液循環並且與骨頭或牙齒中正在行礦化作用的表面接合，接合的方式主要是螢光染劑與新生的磷灰石表面的鈣離子進行螯合(Urist and Ibsen 1963)。這些螢光染劑會不可逆地沉積在新生的礦化組織區域，日後再使用紫外光或藍光激發經過骨頭標定的組織標本使其發出螢光，藉此可以觀測不同時間點新生礦化組織的動態變化及位置分布(Treharne and Brighton 1979)。

3.9.2 本實驗所使用的螢光染劑

本實驗所使用的螢光染劑主要有以下兩種(Sverzut, Faria et al. 2008)：

(1) Calcein green

- 劑量：20 毫克/公斤
- 溶液：0.9% 碳酸氫鈉等張溶液 10 毫升
- 效果：被激發後會產生綠色的螢光。

(2) Alizarin complexone



- 劑量：30 毫克/公斤
- 溶液：1.4%碳酸氫鈉等張溶液 10 毫升
- 效果：被激發後會產生紅色的螢光。

3.9.3 標定步驟

在動物犧牲前的第 4 週以皮下注射的方式注入 10 毫升的 calcein green，接著在動物犧牲前的第 2 週以皮下注射的方式注入 10 毫升的 alizarin complexone，在皮下注射的位置稍做按摩使染劑逐步地進入血液循環。

3.9.4 螢光顯微鏡觀察

本實驗使用倒立螢光顯微鏡(Inverted fluorescence microscope, Axiovert200M Zeiss/PhotometricsCoolSnap HQ)來觀測所有未脫鈣的組織磨片，主要是在倍率 25x 與 100x 下使用 DAPI+FITC+Rhodamine 螢光濾片來觀察兩種不同染劑產生螢光的部位與範圍，並使用軟體 MetaMorph(Universal Imaging Co. US)來擷取所需要的影像，以觀測新生骨頭沉積的位置、時間點與範圍，進而分析植體周圍骨缺損處新骨生成的模式。

3.10 本實驗所使用的統計方法

本研究需將實驗獲得的數據針對植體的存活率、ISQ 值、植體周圍骨頭新生程度(marginal bone height)及植體周圍骨頭覆蓋率進行統計分析，以評估不同骨材對於植體周圍骨生成的效果。

本實驗所使用的統計軟體為 SigmaPlot 中的統計原件，統計方法採用雙因子變異分析(Two way analysis of variance (ANOVA))，主要是將總共 18 個樣本視為 18 個個體，所以 $n=18$ ，之後再針對時間與材料這兩個變數來做分析是否有統計上的差異，當 P 值 <0.05 在統計上為有明顯差異。



第四章 實驗結果

4.1 植體存活率與樣本排除

在本實驗裡，實驗動物犧牲之前只要植體仍然存在於動物下顎骨中，不論植體的穩定度如何都定義為存活，若植體在實驗動物犧牲之前即脫落則定義為非存活。本實驗總共 18 支植體在犧牲前均穩定地維持在實驗動物的下顎骨中，所以植體的存活率為 100%。

在本實驗中使用雙鈣磷酸鹽與氫氧基磷灰石之複合代用骨塊的樣本不分時間點總共有 9 組，使用複合氫氧基磷灰石、 β 型三鈣磷酸鹽與膠原蛋白的骨材之樣本總共有 6 組，而不使用任何骨材的樣本總共有 3 組，其中使用雙鈣磷酸鹽與氫氧基磷灰石之複合代用骨塊的樣本有 2 組在術後 2 週內即發現所使用的骨材與再生膜脫落，傷口合併有發炎的情形，因此這 2 組的數據則排除於實驗組的結果統計內。因為在術後 2 週就將這兩組的骨材移除合併傷口清潔，所以這兩組的植體癒合環境與對照組 Blood clot only 的情況相似，手術時間點也相差不遠，因此在結果的統計上將這兩組歸類於對照組 Blood clot only 中，下圖為術後材料暴露的情況。



圖 4-1 術後樣本傷口暴露骨材的情況

在下表中的 M3 與 M8 即為被歸類在對照組 Blood clot only 中的兩組。

表 4-1 手術排程表，M3 與 M8 被歸類在對照組 Blood clot only 中

動物編號	植入位置與對應樣品					
	實驗組: Dicalcium phosphate dihydrate+HA M1 M2 M4 M5 M6 M7 M9					
	對照組: HA+ β -TCP+Collagen			B1 B2 B3 B4 B5 B6		
	對照組: Blood clot only			E1 E2 E3 M3 M8		
	右	←	右	左	→	左
	下顎實驗時間					
	4wks (2012/11/30)		8wks (2012/11/02)		12wks (2012/10/05)	
R3	R1	R2	L2	L1	L3	
1679	M7	B5	M4	M5	E1	B1
1699	B6	M8	B3	E2	M1	M2
1948	M9	E3	M6	B4	M3	B2

4.2 植體穩定商數(ISQ value)

本實驗在動物犧牲前 4 週、8 週與 12 週進行手術的同時會針對口腔內所植入的植體利用共振頻率分析儀 OSSTELL Mentor® (Integration Diagnostics, Savedalen, Sweden)測量植體穩定商數，臨床上以垂直植體長軸方向，分別於每個植體近心頰側、頰側、遠心頰側、近心舌側、舌側、遠心舌側 6 個方位測試並記錄數據，加以平均後做為該植體的穩定商數，所有樣本的植體穩定商數如下表所示。

表 4-2 ISQ Value

4 週組				平均值
Blood clot only(Empty)	67	59		63
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	48	60		54
DCPD +HA(Maxibone)	56	48		52

8 週組				
Blood clot only(Empty)	56			56
HA+ β -TCP+Collagen (GingivAid)	52	55		53.5
DCPD +HA(Maxibone)	64	67	70	67
12 週組				
Blood clot only(Empty)	55	58		56.5
HA+ β -TCP+Collagen (GingivAid)	73	69		71
DCPD +HA(Maxibone)	74	66		70

總共 18 個位置所產生的 18 個結果，其中在 4 週組與 12 週組中各有一組實驗組的樣本因為術後 2 週內材料脫落而被排除並歸類在對照組 Blood clot only(Empty) 中，特別以紅字標明，這些數值的統計結果依照不同時間點分別列表如下。

表 4-3 4 週組 ISQ 值之統計結果

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	0.114	No
GingivAid vs. Empty	0.021	Yes
Maxibone vs. GingivAid	0.141	No



表 4-4 8 週組 ISQ 值之統計結果

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	0.057	No
GingivAid vs. Empty	0.564	No
Maxibone vs. GingivAid	0.013	Yes

表 4-5 12 週組 ISQ 值之統計結果

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	0.014	Yes
GingivAid vs. Empty	0.015	Yes
Maxibone vs. GingivAid	0.775	No

在 4 週組中，實驗組 Maxibone 的植體穩定商數平均值為 52，對照組 GingivAid 為 54，對照組 Empty 為 63。在實驗組 Maxibone 有一組樣本因為材料在術後 2 週內脫落而被歸類在對照組 Blood clot only 中，如表 4-3，其中 GingivAid 與 Empty 的差距在統計上有明顯的差異。

在 8 週組中，實驗組 Maxibone 的植體穩定商數平均值為 67，對照組 GingivAid 為 53.5，對照組 Empty 為 56，如表 4-4，其中 GingivAid 與 Maxibone 的差距在統計上有明顯的差異。

在 12 週組中，實驗組 Maxibone 的植體穩定商數平均值為 70，對照組 GingivAid 為 71，對照組 Empty 為 56.5。在實驗組 Maxibone 中有一組樣本因為材料在術後 2 週內脫落而被歸類在對照組 Blood clot only 中，其中 Maxibone 與 Empty 的差距、GingivAid 與 Empty 的差距兩者在統計上有明顯的差異，如表 4-5。

另外在不同時間點上的比較，附上圖表如下。

表 4-6 ISQ 值在不同時間點之統計結果

	Maxibone	GingivAid	Empty
12 wks vs. 8 wks	P=0.363	P=0.010	P=0.907
12 wks vs. 4 wks	P=0.010	P=0.008	P=0.810
8 wks vs. 4 wks	P=0.013	P=0.228	P=0.908

在實驗組 Maxibone 的部分，隨著時間的增加 ISQ 值也有明顯的增加，從 8 週就開始有差異，到 12 週更為明顯，其中 4 週到 8 週、4 週到 12 週兩者在統計上都有明顯的差異。

在對照組 GingivAid 的部分，同樣隨著時間的增加 ISQ 值也有明顯的增加，只是到 12 週才開始有差異，其中 4 週到 12 週、8 週到 12 週兩者在統計上都有明顯的差異。

在對照組 Empty 的部分則看不出時間的增加對 ISQ 值是否有幫助，在統計上也看不出任何差異。

4.3 放射線影像分析

在所有標本包含了 18 支植體總共 36 件開始進行脫鈣或包埋之前，會使用 X 光機拍攝記錄每一件標本包括植體與周圍組織，拍攝的角度為從植體的近心或遠心方向垂直於植體的頰舌方向針對植體橫切面拍攝，拍攝的時候植體橫切面緊貼

於 X 光片，最後會得到 36 件標本的放射線影像，接著使用兩種在放射線影像上量化骨頭覆蓋率的方式，計算出每件標本的骨頭覆蓋率，結果如下表所示。



表 4-7 植體螺紋覆蓋率 (0~4 分)

4 週組				平均值
Blood clot only(Empty)	3.25	0.25		1.75
HA+ β -TCP+Collagen (GingivAid)	1.25	3.5		2.375
DCPD +HA(Maxibone)	3.5	1.75		2.625
8 週組				
Blood clot only(Empty)	1.25			1.25
HA+ β -TCP+Collagen (GingivAid)	0.75	4		2.375
DCPD +HA(Maxibone)	2.5	3.25	3.25	3
12 週組				
Blood clot only(Empty)	1.5	1.5		1.5
HA+ β -TCP+Collagen (GingivAid)	2.75	3.25		3
DCPD +HA(Maxibone)	3.75	4		3.875

表 4-8 植體骨覆蓋百分比 (單位: %)

4 週組				平均值
Blood clot only(Empty)	74.26	38.73		56.50
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	54.22	80.22		67.22
DCPD +HA(Maxibone)	81.07	58.62		69.85
8 週組				
Blood clot only(Empty)	49.13			49.13
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	49.92	72.87		61.40

DCPD +HA(Maxibone)	69.38	71.25	71.57	70.73
12 週組				
Blood clot only(Empty)	58.78	51.92		55.35
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	67.41	70.04		68.73
DCPD +HA(Maxibone)	79.81	82.83		81.32

植體螺紋覆蓋率與植體骨覆蓋百分比分別針對 18 件樣本會產生 18 個結果，其中在 4 週組與 12 週組中各有一組實驗組的樣本因為術後 2 週內材料脫落而被排除並歸類在對照組 Blood clot only(Empty)中，特別以紅字標明，這些結果依照不同時間點分別列表如下。

表 4-9 4 週組：植體螺紋覆蓋率之統計結果(*表示無法計算)

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	*	No
GingivAid vs. Empty	*	No
Maxibone vs. GingivAid	*	No

表 4-10 4 週組：植體骨覆蓋百分比之統計結果

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	0.093	No
GingivAid vs. Empty	0.018	Yes
Maxibone vs. GingivAid	0.104	No



表 4-11 8 週組：植體螺紋覆蓋率之統計結果(*表示無法計算)

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	*	No
GingivAid vs. Empty	*	No
Maxibone vs. GingivAid	*	No

表 4-12 8 週組：植體骨覆蓋百分比之統計結果

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	0.109	No
GingivAid vs. Empty	0.205	No
Maxibone vs. GingivAid	0.355	No

表 4-13 12 週組：植體螺紋覆蓋率之統計結果(*表示無法計算)

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	*	No
GingivAid vs. Empty	*	No
Maxibone vs. GingivAid	*	No



表 4-14 12 週組：植體骨覆蓋百分比之統計結果

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	0.030	Yes
GingivAid vs. Empty	0.201	No
Maxibone vs. GingivAid	0.124	No

在 4 週組中，實驗組 Maxibone 的植體螺紋覆蓋率平均值為 2.625、植體骨覆蓋百分比平均值為 69.85%，對照組 GingivAid 的植體螺紋覆蓋率平均值為 2.375、植體骨覆蓋百分比平均值為 67.22%，對照組 Empty 的植體螺紋覆蓋率平均值為 1.75、植體骨覆蓋百分比平均值為 56.5%。在實驗組 Maxibone 中有一組樣本因為材料在術後 2 週內脫落而被歸類在對照組 Blood clot only(Empty)中，其中以 GingivAid 與 Empty 在植體骨覆蓋百分比的差距於統計上是有明顯差異的，如表 4-9 與 4-10 所示。

在 8 週組中，實驗組 Maxibone 的植體螺紋覆蓋率平均值為 3、植體骨覆蓋百分比平均值為 70.73%，對照組 GingivAid 的植體螺紋覆蓋率平均值為 2.375、植體骨覆蓋百分比平均值為 61.4%，對照組 Empty 的植體螺紋覆蓋率平均值為 1.25、植體骨覆蓋百分比平均值為 49.13%，如表 4-11 與 4-12 所示，其中三組數據在統計上沒有差異。

在 12 週組中，實驗組 Maxibone 的植體螺紋覆蓋率平均值為 3.875、植體骨覆蓋百分比平均值為 81.32%，對照組 GingivAid 的植體螺紋覆蓋率平均值為 3、植體骨覆蓋百分比平均值為 68.73%，對照組 Empty 的植體螺紋覆蓋率平均值為 1.5、植體骨覆蓋百分比平均值為 55.35%。在實驗組 Maxibone 中有一組樣本因為材料在術後 2 週內脫落而被歸類在對照組 Blood clot only(Empty)中，如表 4-13 與 4-14 所示，其中以 Maxibone 與 Empty 在植體骨覆蓋百分比的差距於統計上是有明顯差異



的。

在不同時間點的統計結果比較上，附上圖表如下。

表 4-15 植體螺紋覆蓋率針對不同時間之統計結果(*表示無法計算)

	Maxibone	GingivAid	Empty
12 wks vs. 8 wks	P= *	P= *	P= *
12 wks vs. 4 wks	P= *	P= *	P= *
8 wks vs. 4 wks	P= *	P= *	P= *

表 4-16 植體骨覆蓋百分比針對不同時間之統計結果

	Maxibone	GingivAid	Empty
12 wks vs. 8 wks	P=0.480	P=0.562	P=0.498
12 wks vs. 4 wks	P=0.212	P=0.462	P=0.277
8 wks vs. 4 wks	P=0.463	P=0.311	P=0.560

在實驗組 Maxibone 的部分，隨著時間的增加兩种植體覆蓋數值也有明顯的增加，從 8 週就開始有差異，到 12 週更為明顯，但在統計上並沒有明顯的差異。

在對照組 GingivAid 的部分，同樣隨著時間的增加兩种植體覆蓋數值也有明顯的增加，只是到 12 週才開始有差異，但在統計上並沒有明顯的差異。

在對照組 Empty 的部分，則看不出時間的增加對兩种植體覆蓋數值是否有幫助，在統計上也看不出任何差異。

4.4 植體周圍齒槽骨再生率

本實驗總共 18 支植體在動物犧牲以及標本取出後每一支會先切成兩半，其中一半會進行未脫鈣的磨片製備，另外一半則會進行脫鈣的切片製備，所有樣本如



下圖所示。

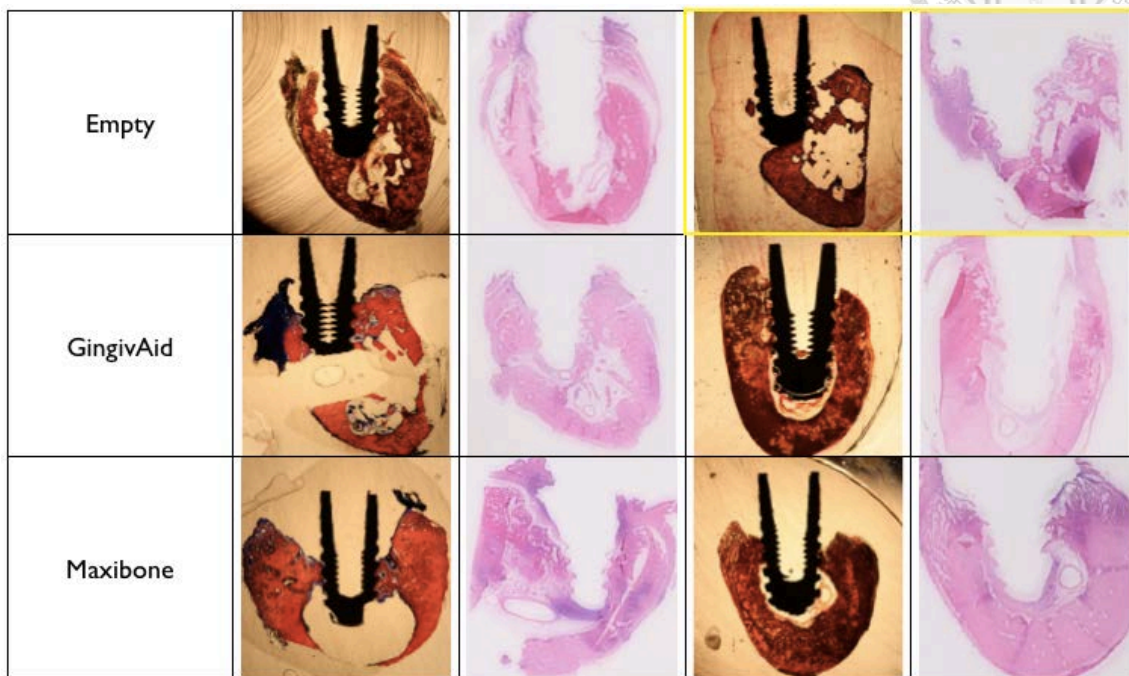


圖 4-2 4 週組之組織磨片與切片，黃框為排除於實驗組的樣本。

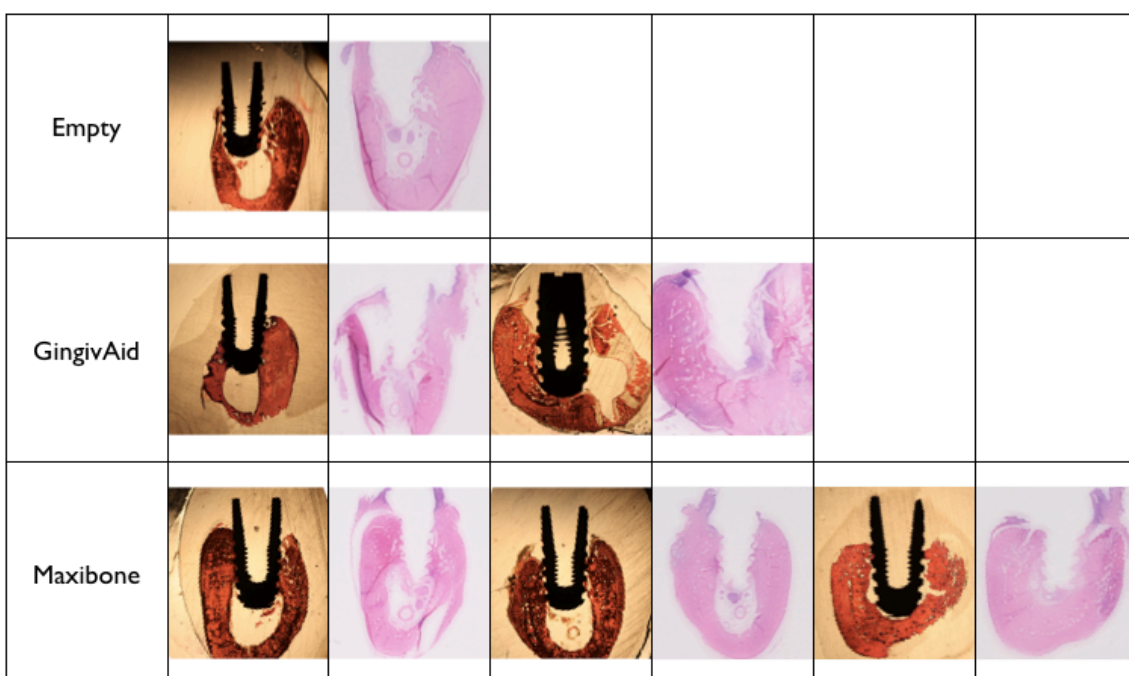


圖 4-3 8 週組之組織磨片與切片

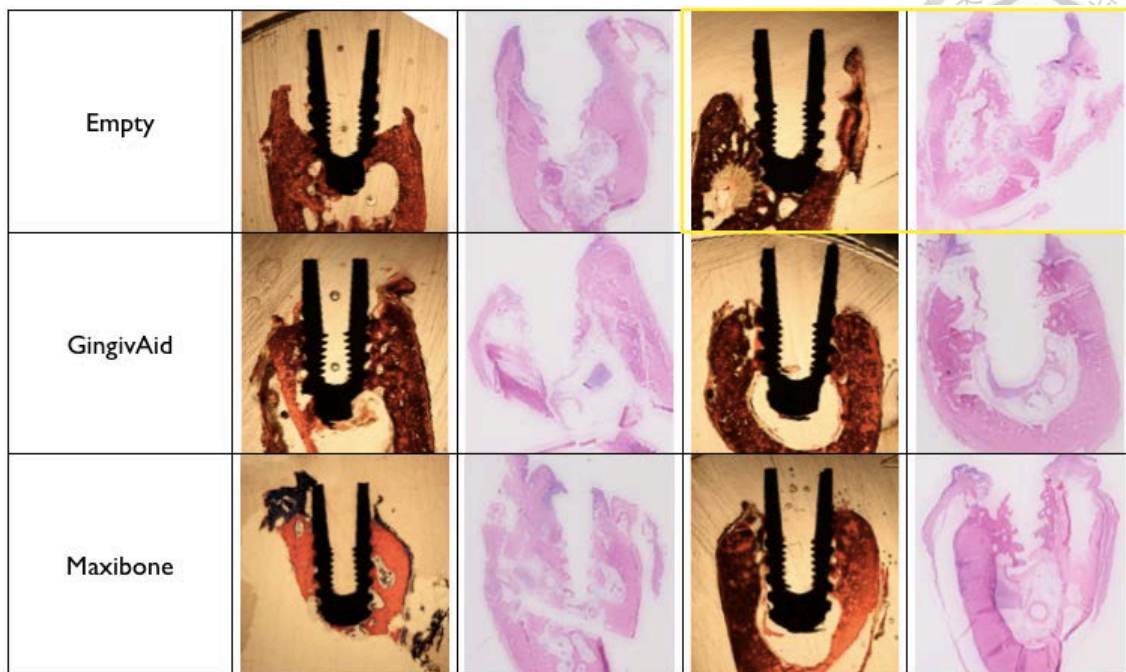


圖 4-4 12 週組之組織磨片與切片，黃框為排除於實驗組的樣本。

本實驗會針對染色好的植體磨片使用數位病理掃描機(SCANSCOPE CS)來作掃描，配合數位病理管理量測分析系統(AperioTechnologies.Inc.Vista, CA, USA)，將切片影像數位化以 50 到 200 倍率觀察，接著使用 Image-J 軟體先從植體的頂部平台上拉出一條垂直植體長軸的直線，分別計算這條直線與植體根尖處、頰側骨頭與植體表面接觸的最高點、頰側骨頭的最高點、舌側骨頭與植體表面接觸的最高點與舌側骨頭的最高點共五個位置的垂直距離，如此在植體頰側的部分可以將頰側骨頭與植體表面接觸的最高點到植體平台的距離除以植體平台到植體根尖的距離來代表頰側的植體周圍骨吸收(marginal bone loss)，另外也可以將頰側骨頭最高點到植體平台的距離除以植體平台到植體根尖的距離來代表頰側的骨頭最高點的骨吸收(alveolar ridge bone loss)，而舌側的位置同樣也可以得到這兩個數值，最後計算頰側與舌側的平均值來代表此植體的植體周圍骨吸收(marginal bone loss)與植體周圍最高點的骨吸收(alveolar ridge bone loss)，進一步則反推出植體根尖到骨頭新生最高點的距離來代表植體周圍的骨覆蓋率(marginal bone height and alveolar

ridge bone height)，結果如下表所示。

表 4-17 植體周圍骨覆蓋率(marginal bone height)

4 週組				平均值
Blood clot only(Empty)	30.15%	37.38%		33.76%
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	47.37%	68.73%		58.05%
DCPD+HA(Maxibone)	44.03%	47.99%		46.01%
8 週組				
Blood clot only(Empty)	28.16%			28.16%
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	44.85%	50.71%		47.78%
DCPD+HA(Maxibone)	64.02%	48.56%	56.4%	56.33%
12 週組				
Blood clot only(Empty)	35.31%	26.46%		30.88%
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	63.6%	61.38%		62.49%
DCPD+HA(Maxibone)	69.61%	72.98%		71.29%

表 4-18 植體周圍骨頭最高點的骨覆蓋率(alveolar ridge bone height)

4 週組				平均值
Blood clot only(Empty)	70.7%	47.75%		59.23%
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	62.04%	76.81%		69.42%
DCPD+HA(Maxibone)	81.43%	50.32%		65.88%
8 週組				
Blood clot only(Empty)	40.68%			40.68%
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	47.27%	73.48%		60.37%
DCPD +HA(Maxibone)	70.2%	60.21%	63.7%	64.7%

12 週組			
Blood clot only(Empty)	52.84%	37.68%	45.26%
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	66.48%	64.11%	65.29%
DCPD+HA(Maxibone)	75.95%	73.68%	74.82%

植體周圍骨覆蓋率與植體周圍骨頭最高點的骨覆蓋率分別針對 18 件樣本會產生 18 個結果，其中在 4 週組與 12 週組中各有一組實驗組的樣本因為術後 2 週內材料脫落而被排除並歸類在對照組 Blood clot only(Empty)中，特別以紅字標明，植體周圍骨覆蓋率(marginal bone height)與植體周圍骨頭最高點的骨覆蓋率(alveolar ridge bone height)這些數值的統計結果依照不同時間點分別列表如下。

表 4-19 4 週組：植體周圍骨覆蓋率之統計結果

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	0.224	No
GingivAid vs. Empty	0.021	Yes
Maxibone vs. GingivAid	0.075	No

表 4-20 4 週組：植體周圍最高點骨覆蓋率之統計(*表示無法計算)

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	*	No
GingivAid vs. Empty	*	No
Maxibone vs. GingivAid	*	No



表 4-21 8 週組：植體周圍骨覆蓋率之統計結果

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	0.014	Yes
GingivAid vs. Empty	0.054	No
Maxibone vs. GingivAid	0.142	No

表 4-22 8 週組：植體周圍最高點骨覆蓋率之統計(*表示無法計算)

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	*	No
GingivAid vs. Empty	*	No
Maxibone vs. GingivAid	*	No

表 4-23 12 週組：植體周圍骨覆蓋率之統計結果

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	0.001	Yes
GingivAid vs. Empty	0.002	Yes
Maxibone vs. GingivAid	0.163	No



表 4-24 12 週組：植體周圍最高點骨覆蓋率之統計(*表示無法計算)

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	*	No
GingivAid vs. Empty	*	No
Maxibone vs. GingivAid	*	No

在 4 週組中，實驗組 Maxibone 的植體周圍骨覆蓋率平均值為 46.01%、植體周圍骨頭最高點的覆蓋率平均值為 65.88%，對照組 GingivAid 的植體周圍骨覆蓋率平均值為 58.05%、植體周圍骨頭最高點的覆蓋率平均值為 69.42%，對照組 Empty 的植體周圍骨覆蓋率平均值為 33.76%、植體周圍骨頭最高點的覆蓋率平均值為 59.23%。在實驗組 Maxibone 中有一組樣本因為材料在術後 2 週內脫落而被歸類在對照組 Blood clot only(Empty)中，如表 4-19 與 4-20 所示，其中 GingivAid 與 Empty 在植體周圍骨覆蓋率的差距於統計上有明顯的差異。

在 8 週組中，實驗組 Maxibone 的植體周圍骨覆蓋率平均值為 56.33%、植體周圍骨頭最高點的覆蓋率平均值為 64.7%，對照組 GingivAid 的植體周圍骨覆蓋率平均值為 47.78%、植體周圍骨頭最高點的覆蓋率平均值為 60.37%，對照組 Empty 的植體周圍骨覆蓋率平均值為 28.16%、植體周圍骨頭最高點的覆蓋率平均值為 40.68%，如表 4-21 與 4-22 所示，其中 Maxibone 與 Empty 在植體周圍骨覆蓋率的差距於統計上有明顯的差異。

在 12 週組中，實驗組 Maxibone 的植體周圍骨覆蓋率平均值為 71.29%、植體周圍骨頭最高點的覆蓋率平均值為 74.82%，對照組 GingivAid 的植體周圍骨覆蓋率平均值為 62.49%、植體周圍骨頭最高點的覆蓋率平均值為 65.29%，對照組 Empty 的植體周圍骨覆蓋率平均值為 30.88%、植體周圍骨頭最高點的覆蓋率平均值為 45.26%。在實驗組 Maxibone 中有一組樣本因為材料在術後 2 週內脫落而被歸類在



對照組 Blood clot only(Empty)中，如表 4-23 與 4-24 所示，其中 GingivAid 與 Empty、Maxibone 與 Empty 兩者在植體周圍骨覆蓋率的差距於統計上有明顯的差異。

在不同時間點的統計結果比較上，附上圖表如下。

表 4-25 植體周圍骨覆蓋率之統計結果在不同時間點的比較

	Maxibone	GingivAid	Empty
12 wks vs. 8 wks	P=0.097	P=0.142	P=0.974
12 wks vs. 4 wks	P= 0.041	P=0.188	P=0.905
8 wks vs. 4 wks	P=0.277	P=0.122	P=0.865

在實驗組 Maxibone 的部分，隨著時間的增加植體周圍骨覆蓋率也有明顯的增加，其中 4 週到 12 週的差距在統計上有明顯的差異。

在對照組 GingivAid 的部分，隨著時間的增加植體周圍骨覆蓋率到 12 週才開始有增加，但在統計上並沒有明顯的差異。

在對照組 Empty 的部分則看不出時間的增加對植體周圍骨覆蓋率是否有幫助，在統計上也看不出任何差異。

4.5 斷層掃描分析

本實驗主要使用 micro-CT (Bruker-microCT[®]SkyScan1176 in-vivo micro-CT)掃描所有原始標本，使用的像素尺寸為 35.52398 μ m，電壓為 80kV，電流為 313 μ A，最後再利用 Skyscan[™] CT -analyser software 分析得到的數據，計算出每支植體周圍 2 公釐範圍內骨頭的量與硬度，其結果如下表所示。

表 4-26 CT-bone volume (單位: mm³)

4 週組				平均值
Blood clot only(Empty)	139.872	85.338		112.605

HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	107.383	157.04		132.212
DCPD+HA(Maxibone)	153.746	114.565		134.155
8 週組				
Blood clot only(Empty)	102.647			102.647
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	152.549	118.041		135.295
DCPD+HA(Maxibone)	149.746	156.304	95.577	133.876
12 週組				
Blood clot only(Empty)	113.24	120.293		116.766
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	161.589	142.759		152.174
DCPD+HA(Maxibone)	165.326	166.597		165.962

表 4-27 CT-bone mineral density

4 週組				平均值
Blood clot only(Empty)	0.89	0.863		0.877
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	0.914	0.977		0.946
DCPD+HA(Maxibone)	0.998	0.911		0.955
8 週組				
Blood clot only(Empty)	0.922			0.922
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	0.946	0.972		0.959
DCPD+HA(Maxibone)	0.971	0.986	0.933	0.963
12 週組				
Blood clot only(Empty)	0.906	0.907		0.906
HA+ β -TCP+Collagen(GingivAid)	0.993	0.984		0.989
DCPD+HA(Maxibone)	0.982	1.052		1.017



總共 18 個位置所產生的 18 個結果，其中在 4 週組與 12 週組中各有一組實驗組的樣本因為術後 2 週內材料脫落而被排除並歸類在對照組 Blood clot only(Empty) 中，特別以紅字標明，斷層掃描骨量(CT-bone volume)與斷層掃描骨密度(CT-bone mineral density)這些數值的統計結果依照不同時間點分別列表如下。

表 4-28 4 週組：植體周圍骨量之統計結果(*表示無法計算)

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	*	No
GingivAid vs. Empty	*	No
Maxibone vs. GingivAid	*	No

表 4-29 4 週組：植體周圍骨密度之統計結果

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	0.084	No
GingivAid vs. Empty	0.069	No
Maxibone vs. GingivAid	0.131	No



表 4-30 8 週組：植體周圍骨量之統計結果(*表示無法計算)

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	*	No
GingivAid vs. Empty	*	No
Maxibone vs. GingivAid	*	No

表 4-31 8 週組：植體周圍骨密度之統計結果

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	0.545	No
GingivAid vs. Empty	0.519	No
Maxibone vs. GingivAid	0.859	No

表 4-32 12 週組：植體周圍骨量之統計結果(*表示無法計算)

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	*	No
GingivAid vs. Empty	*	No
Maxibone vs. GingivAid	*	No



表 4-33 12 週組：植體周圍骨密度之統計結果

Comparison	P	P<0.05
Maxibone vs. Empty	0.018	Yes
GingivAid vs. Empty	0.043	Yes
Maxibone vs. GingivAid	0.327	No

在 4 週組中，實驗組 Maxibone 的植體周圍骨量平均值為 134.16mm^3 、植體周圍骨密度平均值為 0.955，對照組 GingivAid 的植體周圍骨量平均值為 132.21mm^3 、植體周圍骨密度平均值為 0.946，對照組 Empty 的植體周圍骨量平均值為 112.61mm^3 、植體周圍骨密度平均值為 0.877。在實驗組 Maxibone 中有一組樣本因為材料在術後 2 週內脫落而被歸類在對照組 Blood clot only(Empty)中，如表 4-28 與 4-29 所示，其中植體周圍骨量與植體周圍骨密度的差距在統計上沒有差異。

在 8 週組中，實驗組 Maxibone 的植體周圍骨量平均值為 133.88mm^3 、植體周圍骨密度平均值為 0.963，對照組 GingivAid 的植體周圍骨量平均值為 135.3mm^3 、植體周圍骨密度平均值為 0.959，對照組 Empty 的植體周圍骨吸收率平均值為 102.65mm^3 、植體周圍骨密度平均值為 0.922，如表 4-30 與 4-31 所示，其中植體周圍骨量與植體周圍骨密度的差距在統計上沒有差異。

在 12 週組中，實驗組 Maxibone 的植體周圍骨量平均值為 165.96mm^3 、植體周圍骨密度平均值為 1.017，對照組 GingivAid 的植體周圍骨量平均值為 152.17mm^3 、植體周圍骨密度平均值為 0.989，對照組 Empty 的植體周圍骨量平均值為 116.77mm^3 、植體周圍骨密度平均值為 0.906。在實驗組 Maxibone 中有一組樣本因為材料在術後 2 週內脫落而被歸類在對照組 Blood clot only(Empty)中，如表 4-32 與 4-33 所示，其中在植體周圍骨密度的部分，Maxibone 與 Empty 的差距、GingivAid 與 Empty 的差距兩者在統計上是有差異的。



在不同時間點的統計結果比較上，附上圖表如下。

表 4-34 植體周圍骨量針對不同時間點之統計結果(*表示無法計算)

	Maxibone	GingivAid	Empty
12 wks vs. 8 wks	P= *	P= *	P= *
12 wks vs. 4 wks	P= *	P= *	P= *
8 wks vs. 4 wks	P= *	P= *	P= *

表 4-35 植體周圍骨密度針對不同時間點之統計結果

	Maxibone	GingivAid	Empty
12 wks vs. 8 wks	P=0.251	P=0.669	P=0.643
12 wks vs. 4 wks	P=0.102	P=0.320	P=0.741
8 wks vs. 4 wks	P=0.368	P=0.626	P=0.673

在實驗組 Maxibone 的部分，隨著時間的增加植體周圍骨量與骨密度也有明顯的增加，從 8 週就開始有差異，到 12 週更為明顯，但在統計上並沒有明顯的差異。

在對照組 GingivAid 的部分，同樣隨著時間的增加植體周圍骨量與骨密度也有明顯的增加，只是到 12 週才開始有差異，但在統計上並沒有明顯的差異。

在對照組 Empty 的部分則看不出時間的增加對植體周圍骨量是否有幫助，但是在植體周圍骨密度的部分隨著時間的增加，植體周圍骨密度也持續增加，從 8 週就開始有差異，到 12 週更為明顯，但在統計上也看不出任何差異。

4.6 骨頭螢光標定

在本實驗中，主要在動物犧牲前的第 4 週注入被激發後會產生綠光的 calcein green，在動物犧牲前的第 2 週注入被激發後會產生紅光的 alizarin complexone。對

4 週組的樣本而言，產生綠光的區域代表植入骨材當下發生骨頭新生的區域，而產生紅光的區域則是代表植入植體與骨材術後 2 週當下發生骨頭新生的位置。我們可以從 4 週組的樣本裡發現在植體植入的當下骨頭新生的區域多半侷限在靠近原本骨頭附近的螺紋處，這個現象不論在實驗組或對照組都可以清楚地被發現。如下圖所示，上面三張圖為包含植體的磨片在光學顯微鏡下的影像，而下面三張圖為經由倒立螢光顯微鏡(Inverted fluorescence microscope, Axiovert200M

Zeiss/PhotometricsCoolSnap HQ)並使用 DAPI+FITC+Rhodamine 螢光濾片來觀察兩種不同染劑產生螢光的範圍，並使用軟體 MetaMorph(Universal Imaging Co. US)來擷取所需要的影像。

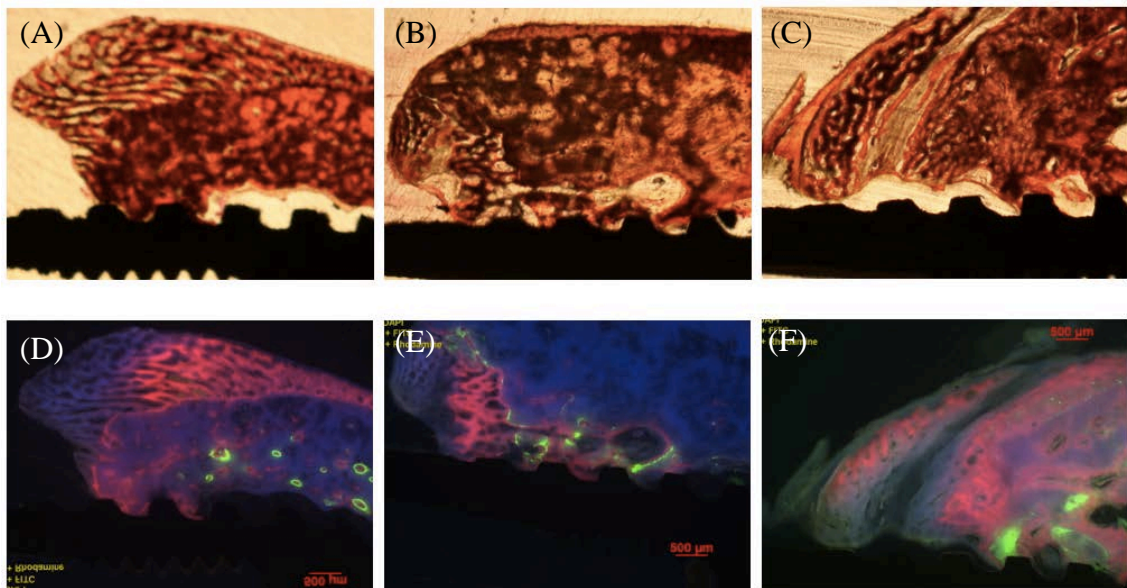


圖 4-5 4 週組 (A)(D) : Maxibone (B)(E) : GingivAid (C)(F) : Empty

對 8 週組的樣本而言，產生綠光的區域代表植入植體與骨材後 4 週當下發生骨頭新生的區域，而產生紅光的區域則是代表植入植體與骨材術後 6 週當下發生骨頭新生的位置。我們可以從 8 週組的樣本裡發現在植體植入 4 週後其骨頭新生的區域多半發生在靠近骨膜的位置，這個現象不論在實驗組或對照組都可以清楚地被發現，只是在實驗組 Maxibone 的部分表現得比較明顯，骨頭新生的範圍也比

較大。如下圖所示，上面三張圖為包含植體的磨片在光學顯微鏡下的影像，而下面三張圖為經由倒立螢光顯微鏡(Inverted fluorescence microscope, Axiovert200M Zeiss/PhotometricsCoolSnap HQ)並使用 DAPI+FITC+Rhodamine 螢光濾片來觀察兩種不同染劑產生螢光的部位與範圍，最後使用軟體 MetaMorph(Universal Imaging Co. US)來擷取所需要的影像。

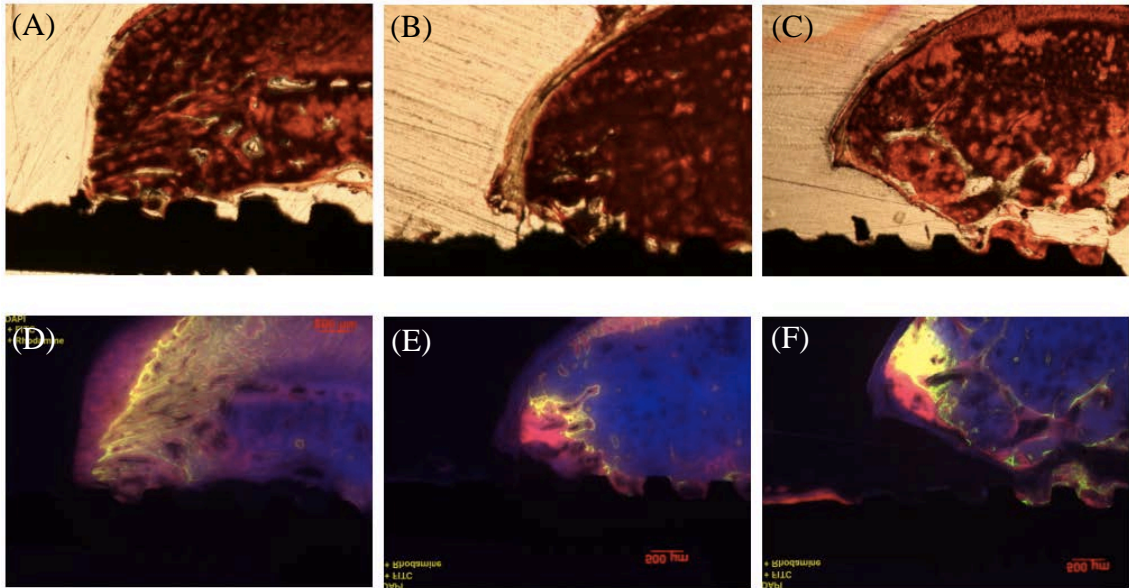


圖 4-6 8 週組 (A)(D) : Maxibone (B)(E) : GingivAid (C)(F) : Empty

對 12 週組的樣本而言，產生綠光的區域代表植入植體與骨材後 8 週當下發生骨頭新生的區域，而產生紅光的區域則是代表植入植體與骨材術後 10 週當下發生骨頭新生的位置。我們可以從 12 週組的樣本裡發現實驗組 Maxibone 與其他兩組對照組有明顯不同地表現。在實驗組的部分我們可以發現植體植入 8 週後其骨頭新生的區域已經減少很多，只有少數靠近植體肩台頸部與植體螺紋的區域被發現有骨頭新生，而在對照組 GingivAid 與 Empty 的部分，還是可以在植體周圍的整區骨頭中發現骨頭新生有從骨膜往植體表面方向生長的趨勢，並且範圍還是很大，其中對照組 GingivAid 骨頭新生的區域似乎比起 Empty 組更靠近植體表面，所以我們認為實驗組 Maxibone 可以加速骨頭新生，GingivAid 也有相似的效果但是速

度較慢，其表現如下圖所示，上面三張圖為包含植體的磨片在光學顯微鏡下的影像，而下面三張圖為經由倒立螢光顯微鏡並使用 DAPI+FITC+Rhodamine 螢光濾片來觀察兩種不同染劑產生螢光的部位與範圍，最後使用軟體 MetaMorph(Universal Imaging Co. US)來擷取所需要的影像。

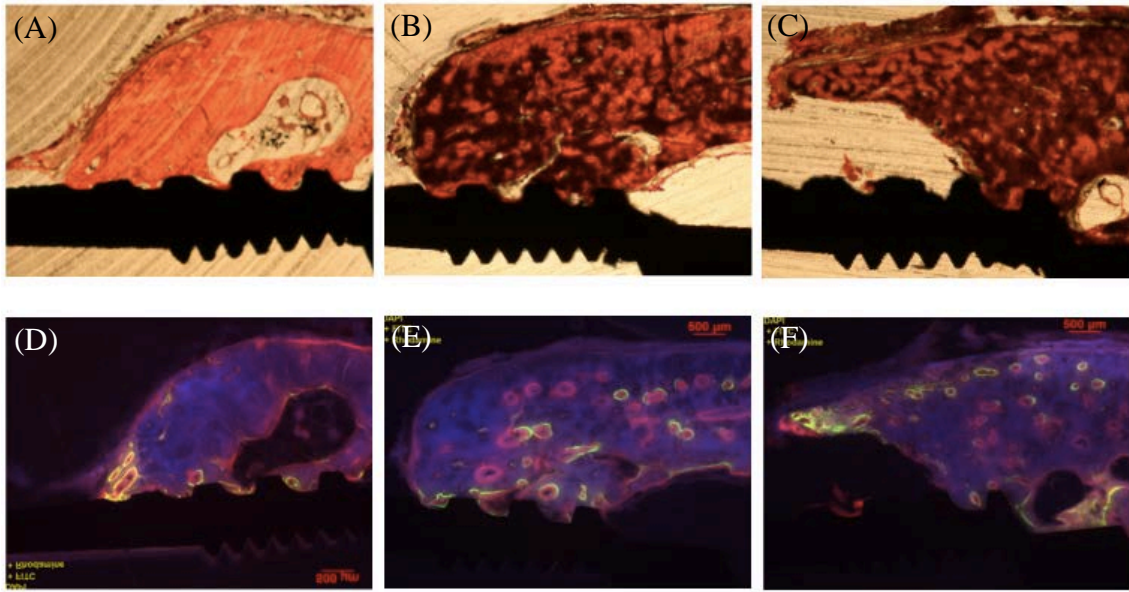


圖 4-7 12 週組 (A)(D) : Maxibone (B)(E) : GingivAid (C)(F) : Empty



第五章 討論

5.1 存活率與排除樣本之探討

在存活率的部分，由於所有樣本在手術完成後均使用 3-0 nylon 進行初級縫合，即便骨材有脫落的那兩組在傷口裂開後仍舊以 nylon 將傷口進行初級縫合，所以植體不致於暴露在口腔中，也造就了即使空白組沒有補骨材幫助骨頭新生，僅憑原先植體周圍 4mm 的骨頭與植體有良好的骨整合就可以穩定植體，所以在本實驗中 18 支植體的存活率為 100%。

被排除的兩個樣本原先都是使用雙鈣磷酸鹽合併氫氧基磷灰石的實驗組，一個是 4 週組而另一個是 12 週組。令人注意的是這兩組在實驗動物口腔內的位置都緊鄰著犬齒，所以我們認為傷口會裂開導致材料脫落的主要原因是實驗動物在沒有後牙的情況下，常常會使用犬齒去磨咬鐵籠等硬物，同時實驗動物的食慾都很好，即便在術後 2 週都給予泡軟的飼料，咀嚼動作確實會對這個位置的樣本造成影響。我們認為緊鄰著犬齒的位置很容易會因此造成傷口裂開，在實驗的設計上若能避開這個位置便可大幅地減少咬合傷害對實驗材料的影響，但也必須使用更多的實驗動物以獲得足夠的樣本，在理想的情況下應盡可能達成。

5.2 植體穩定商數(ISQ)之探討

影響植體穩定商數的因素主要包括以下幾點：

- (1) 植牙位置骨頭的密度(Testori, Meltzer et al. 2004, Boronat-Lopez, Penarrocha-Diago et al. 2006, Magno Filho, Cirano et al. 2012)：

本實驗的樣本主要分布在實驗動物下顎骨的第一、二、三、四小白齒及第一大白齒，這些位置骨頭的量及密度並無明顯差異，此外手術位置與植入材料種類採隨機平均分布方式，所以判定在本實驗中植牙部位並不



影響植體穩定商數的結果。

(2) 植體植入時的扭力(Park, Kwon et al. 2012)：

本實驗每一支植體植入時設定的扭力值均為 35 牛頓，所以此因素不影響植體穩定商數的結果。

(3) 植體的初期穩定度：

植體的初期穩定度目前被認為跟植體表面的螺紋設計有關，主要在物理機械因素上若增加植體與骨頭間的摩擦力，植體穩定商數就會增加。在本實驗中主要觀測的是植體植入後 4 週、8 週與 12 週的植體穩定商數，最短的 4 週也被認為已經有骨整合產生，並不能算是植體植入初期，所以這個部分並不影響植體穩定商數的結果。

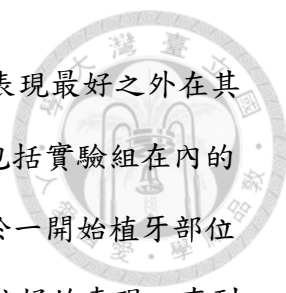
(4) 骨整合的程度：

骨整合的程度會隨著時間逐漸增加，骨代謝生長也會隨之變化(Ure, Oliver et al. 2011)，時間過的越久，就會有越多的鈣化骨組織沉積在植體表面形成骨整合，造成植體穩定商數在 12 週的時候有最好的表現。

(5) 咬合干擾(Rismanchian, Attar et al. 2012)：

在本實驗中，所有植體在植入時皆遵循二階段植體手術的流程，最後都會鎖上覆蓋螺絲(cover screw)合併傷口初級縫合，植體理當不會受到任何程度的咬合干擾。此外術後 2 週內都給予動物泡軟的飼料避免不當的咬合干擾影響到傷口，所以在本實驗中咬合干擾被認為對植體穩定商數的結果沒有影響。

在本實驗中 ISQ 值的結果上，實驗組 Maxibone 表現在 8 到 12 週期間較好。對照組 GingivAid 則在 12 週才有比較好的表現，所以我們認為實驗組 Maxibone 對於植體的穩定度從 8 週開始就有顯著的幫助，直到術後 12 週對照組 GingivAid 對植體的穩定度才有幫助，進一步呼應了骨整合的程度與植體的穩定度有正相關，所以我們得知實驗組 Maxibone 能有效快速的幫助骨整合，對照組 GingivAid 也有



相同的效果但是速度較慢。另外對照組 Empty 則除了在 4 週組表現最好之外在其他兩個時間點的表現都是最差的，所以我們也得知在術後 4 週包括實驗組在內的兩種骨材對於骨整合的幫助還不顯著，此時的骨整合仍然取決於一開始植牙部位的骨頭密度與周圍的軟組織量，也因此對照組 Empty 才会有比較好的表現。直到術後 8 週開始實驗組 Maxibone 對於骨整合的幫助才開始顯露出來，最後到術後 12 週對照組 GingivAid 對骨整合的幫助也才開始發揮。

5.3 放射線影像分析之探討

用來判斷放射線影像上植體周圍骨量的方法常常被使用在針對植體周圍骨吸收的研究裡(Hollender and Rockler 1980, Bragger 1994, Tabanella, Nowzari et al. 2009)。在本實驗中所使用的方法一便是在過去文獻中常見的方法之一：使用植體螺紋做為參考來判斷比較周圍骨頭的量(Tabanella, Nowzari et al. 2009, Komiyama, Hultin et al. 2012)，使用這樣的方法最重要的就是拍攝放射線影像的時候要能清楚地拍出植體的螺紋，重點當然就是放射線要能垂直於植體的長軸並同時垂直於感光底片。在本實驗中拍攝的植體已經被一分為二，所以在拍攝的時候植體的橫切平面可以很緊密的貼合在底片上，而放射線光束已經被固定在垂直射向底片的位置，因此拍攝的角度不會構成判斷上的誤差而影響到結果。

在本實驗的放射線影像分析結果中，實驗組 Maxibone 的表現在術後 8 週開始顯露出來，直到術後 12 週更顯示出其與其他兩組的差距，對骨頭新生的幫助最大。在對照組 GingivAid 的部分在術後 12 週才有比較好的表現，如此也呼應了植體穩定商數的結果，GingivAid 對骨頭新生的幫助直到術後 12 週才顯露出來。另外對照組 Empty 除了在術後 4 週的表現比較好之外在其他兩個時間點的表現都是最差的，同樣也呼應了植體穩定商數的結果，印證實驗組 Maxibone 對骨頭新生的幫助從術後第 8 週開始顯露出來，到術後 12 週的時候更好，而對照組 GingivAid 的幫助則在術後第 12 週才開始表現出來，而沒有補骨材的對照組 Empty 隨著癒合時間



的拉長，骨頭不但沒有新生，甚至還有骨頭吸收的現象發生。

5.4 植體周圍齒槽骨再生之探討

骨頭的生理代謝主要隨著癒合的時間拉長而逐漸成熟，其中骨細胞間質會隨著時間逐漸鈣化，另外來自咀嚼力量的生理刺激也有助於骨代謝速度。在本實驗結果可以觀察到，隨著傷口癒合的時間延長，植體周圍齒槽骨再生的百分比也會逐漸增加(Jung, Yildizhan et al. 2008)。

在實驗動物犧牲的時候我們採用牙周病測量牙齒搖動度的方式，來記錄觀察臨床穩定度與植體周圍齒槽骨再生之間的關係，我們發現所有樣本的臨床的穩定度觀察並無差異，所以我們可以說只要植體周圍齒槽骨再生到達一定程度，其臨床穩定度就不會有差異(Woods, Buschang et al. 2009)。

在本研究中，在三個時間點裡都是有補骨材的組別其植體周圍齒槽骨再生的百分比表現比起空白組要來的好。在 8 週以及 12 週這兩個時間點都是實驗組 Maxibone 優於 GingivAid，在 4 週這個時間點則是 GingivAid 優於 Maxibone。另外針對實驗組 Maxibone，隨著時間的增加其植體周圍齒槽骨再生的百分比也變得更多；而對照組 GingivAid 與 Empty 則可以明顯看到 12 週組的植體周圍齒槽骨再生的百分比最多，比較不一樣的則是 4 週組表現得比 8 週組來的好，雖然差異不大，但卻會影響到統計上的判讀，推測是在 4 週組的樣本裡植體初始植入的深度太深，植體周圍的骨量較多，又因為植體癒合的週數較少，植體周圍新生的骨量較少，所以這項變數會對 4 週組造成較大的影響，而對 8 週組與 12 週組的影響較小。

本實驗主要是從帶有植體的磨片來計算植體周圍齒槽骨再生的百分比，可避免因脫鈣過程中植體脫離時，對切片組織意外造成損傷，而產生統計時的誤差(Bernhardt, Kuhlisch et al. 2012)。

在實驗動物的脫鈣切片或帶有植體的磨片中，都可以觀察到隨著植體植入的

時間增加，植體與骨組織間的縫隙減少(Mathieu, Vayron et al. 2012)，可能原因是新生骨的鈣化程度也會隨著時間而增加，原本無法被判定為骨組織的骨前驅物質逐漸成熟，造成隨著癒合時間延長植體與骨組織間的縫隙減少的結果。



5.5 斷層掃描分析之探討

在植體周圍骨量的部分，在 4 週這個時間點，有補骨材的兩組表現沒有空白組來的好，但是三組的表現差異不大($<10\text{mm}^3$)。在 8 週這個時間點，我們可以發現有補骨材的兩組表現明顯比空白組來的好，而實驗組 Maxibone 與對照組 GingivAid 的差異並不大。到 12 週這個時間點，實驗組 Maxibone 的表現明顯優於對照組 GingivAid，而對照組 Empty 的表現最差。隨著癒合時間的拉長，我們可以發現有補骨材的兩組對於植體周圍骨量的增加有越來越顯著的趨勢，在對照組 Empty 的部分則發現癒合時間對植體周圍骨量增加似乎沒有正相關的趨勢。

5.6 骨頭螢光標定的探討

在本實驗中，骨頭螢光標定可以讓我們看出不同材料對新骨生成的趨勢有著不同的影響。以骨頭新生的趨勢而言，我們可以發現植體周圍骨頭的新生一開始是沿著原本骨頭與植體交界的部分向骨缺損的位置生長，但經過一段時間之後，新骨的生長會從外側皮瓣下的骨膜逐漸擴散至整個骨缺損的區域，直到最後新生的骨頭會集中在皮瓣與植體交界位置堆積。

從骨頭螢光標定的結果來看，實驗組 Maxibone 在植入骨材 4 週就可以發現活躍的骨頭新生，到 8 週的時候新生的骨頭已經開始趨於成熟；對照組 GingivAid 與 Empty 則是在植入骨材 8 週才發現有活躍的骨頭新生；新生骨頭的量則是實驗組 Maxibone 優於對照組 GingivAid 優於 Empty。如此的癒合模式也呼應了本實驗中其他項目的結果，實驗組 Maxibone 幫助新骨生成與成熟的速度明顯優於對照組

GingivAid 與 Empty，附上示意圖如下。

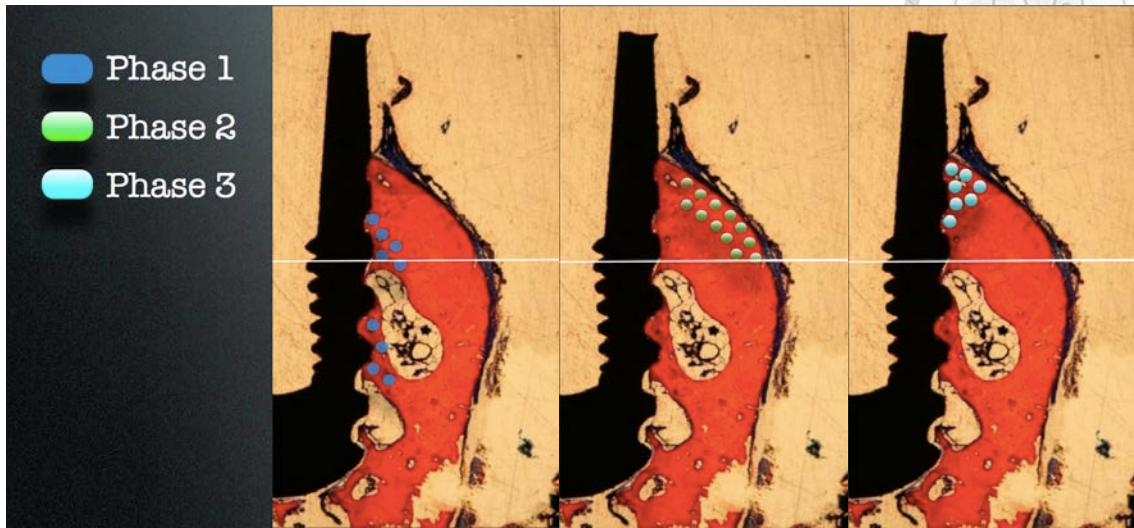


圖 5-1 植體周圍骨癒合模式示意圖

從這張示意圖我們可以看到從骨標定染色結果觀察到的癒合模式，在中間這條水平的白線以上便是新生的骨頭，在這邊主要將骨頭癒合分成三個 phase：

(1) Phase 1 時期：

骨頭新生區域主要會發生在原来的骨頭與靠近植體表面的部分，在本實驗中的三個組別這個時期都是發生在補骨手術當下。

(2) Phase 2 時期：

骨頭新生很明顯的是從皮瓣也就是骨膜下往植體長回來，在本實驗中的三個組別這個時期都是發生在補骨手術後 4 週，其中實驗組 Maxibone 的骨頭新生區域最大，最為活躍。

(3) Phase 3 時期：


整體骨質趨於成熟，最後骨頭新生的區域主要是在植體與皮瓣上骨膜交界的地方，在本實驗中只有實驗組 Maxibone 在術後 8 週才看得到這樣的趨勢，針對對照組 GingivAid 與 Empty 在術後 8 週其整體骨質還處於活躍的 phase 2，並不像實驗組 Maxibone 已經進入到成熟的 phase 3。

5.7 實驗設計限制之探討

本實驗的標準差(standard deviation, SD)在植體穩定商數、放射線影像分析、骨頭與植體表面接觸面積以及斷層掃描的統計分析上有時會出現相當大的變異性，若能有較大的母群體，比較可能得到一致性的標準差。



第六章 結論



相同的植體配合兩種不同骨材與一組空白組在植入後 4 週、8 週與 12 週的觀察時間點，我們發現實驗組與兩組對照組的植體存活率均為 100%。整體而言實驗組 Dicalcium phosphate dihydrate+HA 對於幫助新骨生成的部分，不論是新骨的量與質地或是新骨出現的快慢，其結果都優於對照組 HA+ β -TCP+collagen 與對照組 Blood clot only。在統計上有明顯差異的部分分別是 12 週組的 ISQ 值、12 週組的 x 光片植體周圍骨覆蓋率、8 週組與 12 週組的組織磨片植體周圍骨覆蓋率以及 12 週組的斷層掃描植體周圍骨密度。另外在骨頭螢光標定的部分也顯示出實驗組 Dicalcium phosphate dihydrate+HA 在骨頭成熟的速度是明顯優於其他兩組對照組。綜合以上結論，透過本研究團隊所建立的動物試驗模式，可以證明雙鈣磷酸鹽合併氫氧基磷灰石之複合代用骨水泥塊具有作為骨填補材的潛力。另外透過骨標定染色技術，除了呼應本實驗的其他結果，也讓我們發現新骨在骨缺損處生成的模式。

參考文獻



- Al-Munajjed, A. A., J. P. Gleeson and F. J. O'Brien (2008). "Development of a collagen calcium-phosphate scaffold as a novel bone graft substitute." Stud Health Technol Inform 133: 11-20.
- Al-Munajjed, A. A. and F. J. O'Brien (2009). "Influence of a novel calcium-phosphate coating on the mechanical properties of highly porous collagen scaffolds for bone repair." J Mech Behav Biomed Mater 2(2): 138-146.
- Alkhraisat, M. H., F. T. Marino, J. R. Retama, L. B. Jerez and E. Lopez-Cabarcos (2008). "Beta-tricalcium phosphate release from brushite cement surface." J Biomed Mater Res A 84(3): 710-717.
- Alkhraisat, M. H., F. T. Marino, C. R. Rodriguez, L. B. Jerez and E. L. Cabarcos (2008). "Combined effect of strontium and pyrophosphate on the properties of brushite cements." Acta Biomater 4(3): 664-670.
- Alkhraisat, M. H., C. Rueda, J. Cabrejos-Azama, J. Lucas-Aparicio, F. T. Marino, J. Torres Garcia-Denche, L. B. Jerez, U. Gbureck and E. L. Cabarcos (2010). "Loading and release of doxycycline hyclate from strontium-substituted calcium phosphate cement." Acta Biomater 6(4): 1522-1528.
- Alkhraisat, M. H., C. Rueda, L. B. Jerez, F. Tamimi Marino, J. Torres, U. Gbureck and E. Lopez Cabarcos (2010). "Effect of silica gel on the cohesion, properties and biological performance of brushite cement." Acta Biomater 6(1): 257-265.
- Alkhraisat, M. H., C. Rueda, F. T. Marino, J. Torres, L. B. Jerez, U. Gbureck and E. L. Cabarcos (2009). "The effect of hyaluronic acid on brushite cement cohesion." Acta Biomater 5(8): 3150-3156.
- Arrington, E. D., W. J. Smith, H. G. Chambers, A. L. Bucknell and N. A. Davino (1996). "Complications of iliac crest bone graft harvesting." Clin Orthop Relat Res(329): 300-309.
- Barradas, A. M., H. Yuan, C. A. van Blitterswijk and P. Habibovic (2011). "Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms." Eur Cell Mater 21: 407-429; discussion 429.
- Bernhardt, R., E. Kuhlisch, M. C. Schulz, U. Eckelt and B. Stadlinger (2012). "Comparison of bone-implant contact and bone-implant volume between 2D-histological sections and 3D-SRmicroCT slices." Eur Cell Mater 23: 237-247; discussion 247-238.
- Boronat-Lopez, A., M. Penarrocha-Diago, O. Martinez-Cortissoz and I. Minguez-Martinez (2006). "Resonance frequency analysis after the placement of 133

dental implants." Med Oral Patol Oral Cir Bucal 11(3): E272-276.

Bragger, U. (1994). "Radiographic parameters for the evaluation of peri-implant tissues." Periodontol 2000 4: 87-97.

Cano-Sanchez, J., J. Campo-Trapero, J. C. Gonzalo-Lafuente, L. A. Moreno-Lopez and A. Bascones-Martinez (2005). "Undecalcified bone samples: a description of the technique and its utility based on the literature." Med Oral Patol Oral Cir Bucal 10 Suppl 1: E74-87.

Cawley, P., B. Pavlakovic, D. N. Alleyne, R. George, T. Back and N. Meredith (1998). "The design of a vibration transducer to monitor the integrity of dental implants." Proc Inst Mech Eng H 212(4): 265-272.

Chapman, M. W., R. Bucholz and C. Cornell (1997). "Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial." J Bone Joint Surg Am 79(4): 495-502.

De Smet, E., S. V. Jaecques, J. J. Jansen, F. Walboomers, J. Vander Sloten and I. E. Naert (2007). "Effect of constant strain rate, composed of varying amplitude and frequency, of early loading on peri-implant bone (re)modelling." J Clin Periodontol 34(7): 618-624.

De Smet, E., S. V. Jaecques, M. Wevers, J. V. Sloten and I. E. Naert (2011). "Constant Strain Rate and Peri-Implant Bone Modeling: An In Vivo Longitudinal Micro-CT Analysis." Clin Implant Dent Relat Res.

Ersanli, S., C. Karabuda, F. Beck and B. Leblebicioglu (2005). "Resonance frequency analysis of one-stage dental implant stability during the osseointegration period." J Periodontol 76(7): 1066-1071.

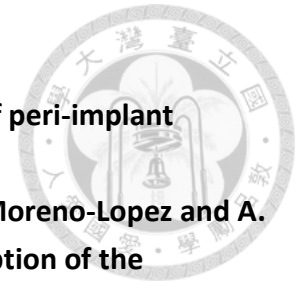
Fan, Y., K. Duan and R. Wang (2005). "A composite coating by electrolysis-induced collagen self-assembly and calcium phosphate mineralization." Biomaterials 26(14): 1623-1632.

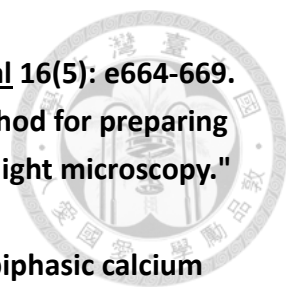
Fischer, K., M. Backstrom and L. Sennerby (2009). "Immediate and early loading of oxidized tapered implants in the partially edentulous maxilla: a 1-year prospective clinical, radiographic, and resonance frequency analysis study." Clin Implant Dent Relat Res 11(2): 69-80.

Froum, S. J., H. Simon, S. C. Cho, N. Elian, M. D. Rohrer and D. P. Tarnow (2005). "Histologic evaluation of bone-implant contact of immediately loaded transitional implants after 6 to 27 months." Int J Oral Maxillofac Implants 20(1): 54-60.

Giannoudis, P. V., H. Dinopoulos and E. Tsiridis (2005). "Bone substitutes: an update." Injury 36 Suppl 3: S20-27.

Gonzalez-Garcia, R., F. Monje and C. Moreno-Garcia (2011). "Predictability of the resonance frequency analysis in the survival of dental implants placed in the anterior





non-atrophied edentulous mandible." Med Oral Patol Oral Cir Bucal 16(5): e664-669.

Gotfredsen, K., E. Budtz-Jorgensen and L. N. Jensen (1989). "A method for preparing and staining histological sections containing titanium implants for light microscopy." Stain Technol 64(3): 121-127.

Grimes, J. S., T. J. Bocklage and J. D. Pitcher (2006). "Collagen and biphasic calcium phosphate bone graft in large osseous defects." Orthopedics 29(2): 145-148.

Gupta, R. K. and T. V. Padmanabhan (2011). "An Evaluation of the Resonance Frequency Analysis Device: Examiner Reliability and Repeatability of Readings." J Oral Implantol.

Heinemann, S., C. Heinemann, S. Wenisch, V. Alt, H. Worch and T. Hanke (2013). "Calcium phosphate phases integrated in silica/collagen nanocomposite xerogels enhance the bioactivity and ultimately manipulate the osteoblast/osteoclast ratio in a human co-culture model." Acta Biomater 9(1): 4878-4888.

Herrero-Climent, M., M. Albertini, J. V. Rios-Santos, P. Lazaro-Calvo, A. Fernandez-Palacin and P. Bullon (2012). "Resonance frequency analysis-reliability in third generation instruments: Osstell mentor(R)." Med Oral Patol Oral Cir Bucal 17(5): e801-806.

Hild, N., O. D. Schneider, D. Mohn, N. A. Luechinger, F. M. Koehler, S. Hofmann, J. R. Vetsch, B. W. Thimm, R. Muller and W. J. Stark (2011). "Two-layer membranes of calcium phosphate/collagen/PLGA nanofibres: in vitro biomineralisation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells." Nanoscale 3(2): 401-409.

Hollender, L. and B. Rockler (1980). "Radiographic evaluation of osseointegrated implants of the jaws. Experimental study of the influence of radiographic techniques on the measurement of the relation between the implant and bone." Dentomaxillofac Radiol 9(2): 91-95.

Hong, Y. J., J. S. Chun and W. K. Lee (2011). "Association of collagen with calcium phosphate promoted osteogenic responses of osteoblast-like MG63 cells." Colloids Surf B Biointerfaces 83(2): 245-253.

Hsu, F. Y., S. W. Tsai, C. W. Lan and Y. J. Wang (2005). "An in vivo study of a bone grafting material consisting of hydroxyapatite and reconstituted collagen." J Mater Sci Mater Med 16(4): 341-345.

Iezzi, G., G. Pecora, A. Scarano, V. Perrotti and A. Piattelli (2006). "Histologic evaluation of 3 retrieved immediately loaded implants after a 4-month period." Implant Dent 15(3): 305-312.

Jesus, T., T. Faleh, A. Mohammad, C. P. Juan and L. C. Enrique (2011). Bone Substitutes. Implant Dentistry - The Most Promising Discipline of Dentistry.

<http://www.intechopen.com/books/implant-dentistry-the-most-promising-discipline-of-dentistry/bone-substitutes>, Ilser Turkyilmaz.

Jung, B. A., F. Yildizhan and H. Wehrbein (2008). "Bone-to-implant contact of orthodontic implants in humans--a histomorphometric investigation." Eur J Orthod 30(6): 552-557.

Kang, I. H., C. W. Kim, Y. J. Lim and M. J. Kim (2011). "A comparative study on the initial stability of different implants placed above the bone level using resonance frequency analysis." J Adv Prosthodont 3(4): 190-195.

Karadas, O., D. Yucel, H. Kenar, G. Torun Kose and V. Hasirci (2012). "Collagen scaffolds with in situ-grown calcium phosphate for osteogenic differentiation of Wharton's jelly and menstrual blood stem cells." J Tissue Eng Regen Med.

Keeney, M., E. Collin and A. Pandit (2009). "Multi-channelled collagen-calcium phosphate scaffolds: their physical properties and human cell response." Tissue Eng Part C Methods 15(2): 265-273.

Kesmas, S., S. Swasdison, S. Yodsanga, S. Sessirisombat and P. Jansisyanont (2010). "Esthetic alveolar ridge preservation with calcium phosphate and collagen membrane: preliminary report." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 110(5): e24-36.

Khan, S. N., H. S. Sandhu, H. K. Parvataneni, F. P. Girardi and F. P. Cammisa, Jr. (2000). "Bone graft substitutes in spine surgery." Bull Hosp Jt Dis 59(1): 5-10.

Khan, S. N., E. Tomin and J. M. Lane (2000). "Clinical applications of bone graft substitutes." Orthop Clin North Am 31(3): 389-398.

Komiyama, A., M. Hultin, K. Nasstrom, D. Benchimol and B. Klinge (2012). "Soft tissue conditions and marginal bone changes around immediately loaded implants inserted in edentate jaws following computer guided treatment planning and flapless surgery: a \geq 1-year clinical follow-up study." Clin Implant Dent Relat Res 14(2): 157-169.

Lawson, A. C. and J. T. Czernuszka (1998). "Collagen--calcium phosphate composites." Proc Inst Mech Eng H 212(6): 413-425.

Maas, M., P. Guo, M. Keeney, F. Yang, T. M. Hsu, G. G. Fuller, C. R. Martin and R. N. Zare (2011). "Preparation of mineralized nanofibers: collagen fibrils containing calcium phosphate." Nano Lett 11(3): 1383-1388.

Magno Filho, L. C., F. R. Cirano, F. Hayashi, F. S. Hsu, C. Alexandre, L. Dib and M. Z. Casati (2012). "Assessment of the Correlation between Insertion Torque and Resonance Frequency Analysis of Implants placed in Bone Tissue of Different Densities." J Oral Implantol.

Malchiodi, L., A. Cucchi, P. Ghensi and P. F. Nocini (2013). "Evaluation of the esthetic results of 64 nonfunctional immediately loaded postextraction implants in the

maxilla: correlation between interproximal alveolar crest and soft tissues at 3 years of follow-up." Clin Implant Dent Relat Res 15(1): 130-142.

Maniatopoulos, C., A. Rodriguez, D. A. Deporter and A. H. Melcher (1986). "An improved method for preparing histological sections of metallic implants." Int J Oral Maxillofac Implants 1(1): 31-37.

Mathieu, V., R. Vayron, E. Soffer, F. Anagnostou and G. Haiat (2012). "Influence of healing time on the ultrasonic response of the bone-implant interface." Ultrasound Med Biol 38(4): 611-618.

Moreau, J. L., M. D. Weir and H. H. Xu (2009). "Self-setting collagen-calcium phosphate bone cement: mechanical and cellular properties." J Biomed Mater Res A 91(2): 605-613.

Nevins, A., W. Wrobel, R. Valachovic and F. Finkelstein (1977). "Hard tissue induction into pulpless open-apex teeth using collagen-calcium phosphate gel." J Endod 3(11): 431-433.

Nevins, A. J., F. Finkelstein, B. G. Borden and R. Laporta (1976). "Revitalization of pulpless open apex teeth in rhesus monkeys, using collagen-calcium phosphate gel." J Endod 2(6): 159-165.

Nevins, A. J., R. F. LaPorta, B. G. Borden and L. S. Spangberg (1980). "Pulpotomy and partial pulpectomy procedures in monkey teeth using cross-linked collagen-calcium phosphate gel." Oral Surg Oral Med Oral Pathol 49(4): 360-365.

O'Hara, R. M., J. F. Orr, F. J. Buchanan, R. K. Wilcox, D. C. Barton and N. J. Dunne (2012). "Development of a bovine collagen-apatitic calcium phosphate cement for potential fracture treatment through vertebroplasty." Acta Biomater 8(11): 4043-4052.


Park, K. J., J. Y. Kwon, S. K. Kim, S. J. Heo, J. Y. Koak, J. H. Lee, S. J. Lee, T. H. Kim and M. J. Kim (2012). "The relationship between implant stability quotient values and implant insertion variables: a clinical study." J Oral Rehabil 39(2): 151-159.

Pattijn, V., C. Van Lierde, G. Van der Perre, I. Naert and J. Vander Sloten (2006). "The resonance frequencies and mode shapes of dental implants: Rigid body behaviour versus bending behaviour. A numerical approach." J Biomech 39(5): 939-947.

Perez, R. A., M. P. Ginebra and M. Spector (2011). "Cell response to collagen-calcium phosphate cement scaffolds investigated for nonviral gene delivery." J Mater Sci Mater Med 22(4): 887-897.

Perez, R. A., H. W. Kim and M. P. Ginebra (2012). "Polymeric additives to enhance the functional properties of calcium phosphate cements." J Tissue Eng 3(1): 2041731412439555.

Pikner, S. S., K. Grondahl, T. Jemt and B. Friberg (2009). "Marginal bone loss at



implants: a retrospective, long-term follow-up of turned Branemark System implants." Clin Implant Dent Relat Res 11(1): 11-23.

Rebaudi, A., B. Koller, A. Laib and P. Trisi (2004). "Microcomputed tomographic analysis of the peri-implant bone." Int J Periodontics Restorative Dent 24(4): 316-325.

Rismanchian, M., B. M. Attar, S. M. Razavi, A. N. Shamsabad and M. Rezaei (2012). "Dental implants immediate loading versus the standard 2-staged protocol: an experimental study in dogs." J Oral Implantol 38(1): 3-10.

Roldan, J. C., R. Detsch, S. Schaefer, E. Chang, M. Kelantan, W. Weiss, T. E. Reichert, G. C. Gurtner and U. Deisinger (2010). "Bone formation and degradation of a highly porous biphasic calcium phosphate ceramic in presence of BMP-7, VEGF and mesenchymal stem cells in an ectopic mouse model." J Craniomaxillofac Surg 38(6): 423-430.

Salasznyk, R. M., W. A. Williams, A. Boskey, A. Batorsky and G. E. Plopper (2004). "Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells." J Biomed Biotechnol 2004(1): 24-34.

Scarano, A., F. Carinci, A. Quaranta, G. Iezzi, M. Piattelli and A. Piattelli (2007). "Correlation between implant stability quotient (ISQ) with clinical and histological aspects of dental implants removed for mobility." Int J Immunopathol Pharmacol 20(1 Suppl 1): 33-36.

Sim, C. P. and N. P. Lang (2010). "Factors influencing resonance frequency analysis assessed by Osstell mentor during implant tissue integration: I. Instrument positioning, bone structure, implant length." Clin Oral Implants Res 21(6): 598-604.

Skoglund, A., P. Hising and C. Young (1997). "A clinical and histologic examination in humans of the osseous response to implanted natural bone mineral." Int J Oral Maxillofac Implants 12(2): 194-199.

Stoppie, N., J. P. van der Waerden, J. A. Jansen, J. Duyck, M. Wevers and I. E. Naert (2005). "Validation of microfocus computed tomography in the evaluation of bone implant specimens." Clin Implant Dent Relat Res 7(2): 87-94.

Svezut, C. E., P. E. Faria, C. M. Magdalena, A. E. Trivellato, F. V. Mello-Filho, C. A. Paccola, S. Gogolewski and L. A. Salata (2008). "Reconstruction of mandibular segmental defects using the guided-bone regeneration technique with polylactide membranes and/or autogenous bone graft: a preliminary study on the influence of membrane permeability." J Oral Maxillofac Surg 66(4): 647-656.

Tabanella, G., H. Nowzari and J. Slots (2009). "Clinical and microbiological determinants of ailing dental implants." Clin Implant Dent Relat Res 11(1): 24-36.

Testori, T., A. Meltzer, M. Del Fabbro, F. Zuffetti, M. Troiano, L. Francetti and R. L. Weinstein (2004). "Immediate occlusal loading of Osseotite implants in the lower

edentulous jaw. A multicenter prospective study." Clin Oral Implants Res 15(3): 278-284.

Torres, J., F. Tamimi, M. H. Alkhraisat, J. C. Prados-Frutos, E. Rastikerdar, U. Gbureck, J. E. Barralet and E. Lopez-Cabarcos (2011). "Vertical bone augmentation with 3D-synthetic monetite blocks in the rabbit calvaria." J Clin Periodontol 38(12): 1147-1153.

Trehanne, R. W. and C. T. Brighton (1979). "The use and possible misuse of tetracycline as a vital stain." Clin Orthop Relat Res(140): 240-246.

Ure, D. S., D. R. Oliver, K. B. Kim, A. C. Melo and P. H. Buschang (2011). "Stability changes of miniscrew implants over time." Angle Orthod 81(6): 994-1000.

Urist, M. R. and K. H. Ibsen (1963). "Chemical Reactivity of Mineralized Tissue with Oxytetracycline." Arch Pathol 76: 484-496.

Wang, H. L. and L. Boyapati (2006). ""PASS" principles for predictable bone regeneration." Implant Dent 15(1): 8-17.

Wernike, E., M. O. Montjovent, Y. Liu, D. Wismeijer, E. B. Hunziker, K. A. Siebenrock, W. Hofstetter and F. M. Klenke (2010). "VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo." Eur Cell Mater 19: 30-40.

Woods, P. W., P. H. Buschang, S. E. Owens, P. E. Rossouw and L. A. Opperman (2009). "The effect of force, timing, and location on bone-to-implant contact of miniscrew implants." Eur J Orthod 31(3): 232-240.

Wu, T. J., H. H. Huang, C. W. Lan, C. H. Lin, F. Y. Hsu and Y. J. Wang (2004). "Studies on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite." Biomaterials 25(4): 651-658.

包, 鈺. 綸. (2008). 人類胚胎上顎間質細胞在不同無機鹽聚己內酯複合材上之成骨細胞活性. 碩士 碩士論文, 台灣大學.

歐, 士. 輔. (2005). 鈣磷酸鹽骨水泥於不同 pH 值磷酸鈉緩衝溶液下相變化之研究. 碩士論文, 國立台灣科技大學.

蔡, 佩. 樺. (2007). 幾丁聚醣/硫酸鈣/富血小板膠血漿微粒製備及其為牙科植材之評估. 碩士 碩士論文, 義守大學.

鄧, 乃. 嘉., 濬. 賢. 黃, 勝. 揚. 李 and 正. 昌. 楊 (2006). "新感溫自我硬化型磷酸鈣骨填補材之合成與特性." Chin Dent J (中華牙誌) 25(3): 157-168.