臺北醫學大學口腔醫學院牙醫學系碩士班

碩士論文

Graduate Institute of Dentistry

College of Oral Medicine

Taipei Medical University

Master Thesis

以蘭嶼迷你豬評估不同植體螺紋設計和間距對骨整合之影響

Effect of different thread geometry and inter-distances on the osseointegration of dental implant with Lan-Yu mini-pig model

指導教授： 李 勝 揚 教授 (Sheng-Yang Lee, DDS, PhD)

王 敦 正 教授 (Dun-Zheng Wang, DDS, PhD)

研究生：錢 世 康 (Shih-Kang Chien) 撰

中華民國一百年七月

臺北醫學大學碩士學位考試委員審定書

論文題目:

利用動物實驗評估不同植體螺紋設計和間距對骨整合之影響

Effect of different thread shapes and distances on the osseointegration of dental implant — A mini-pig animal study

本論文係錢世康君(學號 M204096010)於臺北醫學大學口腔醫學院牙醫學系研究所完成之碩士學位論文，承下列委員審查通過及口試及格，特此證明。

論文考試委員：

楊正昌 召集人簽名

楊正昌副教授，臺北醫學大學口腔醫學院

郭宗甫 委員簽名

郭宗甫教授，國立台灣大學獸醫專業學院

許明倫 委員簽名

許明倫教授，國立陽明大學牙醫學系

王敦正 指導教授簽名

王敦正教授，臺北醫學大學口腔醫學院牙醫學研究所

李勝揚 指導教授簽名

李勝揚教授，臺北醫學大學口腔醫學院牙醫學系/研究所

中華民國 100 年 7 月 7 日

臺北醫學大學電子暨紙本學位論文書目同意公開申請書

（本文件影本與論文一併裝訂）

申請人姓名	錢世康	畢業年月	民國 100 年 7 月
學號	M204096010	系所名稱	牙醫系碩士班
聯絡電話	0912496986	學位	☑碩士班 □博士班
電子郵件	hysterickon@gmail.com		
論文題目	以蘭奧豬評估不同植體螺紋設計和間距對骨整合之影響		
同意項目			
☑立即公開	※若選擇立即公開，相關研究成果即將喪失申請專利權利		
□ 延後公開 含紙本論文及電子論文書目資料(包含書目、目次、摘要、引用文獻)	延後公開原因：		
	公開日期： 中華民國　　年　　月　　日起（年限最長為 5 年）		
	備註 1：紙本論文(平裝本)連同本申請書正本提供教務處；另提供紙本論文予圖書館(精裝本)及系所(平裝本)，各保管單位應盡保密責任。 備註 2：電子論文全文延後公開，請於系統提交論文時務必於系統上勾選延後公開及設定時間。		

申請人簽名：錢世康

指導教授簽名：

研究所所長簽名：

申請日期：中華民國 100 年 7 月 7 日

臺北醫學大學學位考試保密同意書暨簽到表

（本文件影本與論文一併裝訂）

學位考試基本資料：

論文題目	以動物實驗評估不同植體螺紋設計和間距對骨整合之影響-以豬為例		
	Effect of different thread shapes and thread distances on the osseointegration of dental implant — A mini-pig animal study		
指導教授	李勝揚	職　稱	教授
學生姓名	錢世康	系　所	牙醫學系碩士班
		學　號	M204096010
考試時間	100 年 7 月 7 日(上)/下午 8 時 00 分		
考試地點	口腔醫學大樓四樓討論室		

本論文考試涉及揭露方所告知或交付之研發成果或技術秘密等重要智慧財產權，該機密資訊為揭露方所擁有之法定權利或期待利益，**僅限以下特定人士參與，所有與會者了解並同意對參與本考試所接觸到之機密內容保守秘密**，不得自行利用或以任何方式使第三人利用「機密資訊」或取得任何權利，**直到本論文開放閱覽或完成專利申請為止。**

考試委員簽署：

姓名	服務單位	職稱	簽名
李勝揚	臺北醫學大學口腔醫學院牙醫系	系主任/所長	李勝揚
王敦正	臺北醫學大學口腔醫學院	臨床教授	王敦正
楊正昌	臺北醫學大學口腔醫學院	副教授	楊正昌
許明倫	國立陽明大學牙醫學院牙醫系	系主任	許明倫
郭宗甫	國立臺灣大學獸醫專業學院	教授	郭宗甫

誌　　謝

這篇論文的完成，必須感謝許許多多人的幫助、指導和建議，單靠我一人之力，是絕對無法完成的。生命中，最重要的是遇到對的人，做對的事。上天對我真的很好，在碩士班的四年中，遇到許許多多的貴人，給我幫助、指導和啟發，在我困惑或矛盾時給予我幫助和扶持。在此，真誠的感謝那些過去曾經幫助過我的老師們、學長姊、及貴人們。

首先，一定要感謝王敦正老師的提攜和指導。猶還記得當年考取研究所時，老師的諄諄教誨和指導，讓學生敬佩不已。老師在我大學時期即在我心中種下了種子，讓我勇往直前，選對的事做，在此真心感謝老師對學生的任何點點滴滴的教導和幫助。

此文的完成，尤其感謝我的指導教授李勝揚所長的大力幫助。從實驗架構、實驗的資源、思考的邏輯、論文的修改等，都是有賴所長悉心的教導和建議下，才得順利完成。由衷感謝所長對我的耐心和付出，學生沒齒難忘。

很感謝台大獸醫學院的郭宗甫教授，從實驗之初，除提供了動物實驗的經驗和手術的場地，甚至從豬隻照料到犧牲，都全程參與，給予學生很多的幫忙和啟發，在此感謝郭老師的幫忙，才能完成這次的動物實驗。

楊正昌老師及許明倫老師，謝謝你們在口試時，提出寶貴的意見及想法，使本文可以更趨完善。也感謝老師們可在繁忙之下，還可耐心的訂正本文中的缺失和錯誤，此對我有莫大的幫助。

此外，感謝林志聲醫師對本研究大力的幫助，舉凡植體的設計和製造，以及實驗經費的贊助，林醫師都無私地提供，讓本論文得以完成，而不須擔心。

另外，我要感謝在身邊一起奮鬥的夥伴們；萬芳醫院的冠老大，阿吉學長、小黑學長、育誠學長，感謝你們對我在臨床上的諄諄教誨。感謝研究所的宏達學長，每每在我實驗困頓時給予的幫助。在萬芳醫院口腔外科努力的各位住院醫師及實習醫師們，感謝你們忍受這樣任性的我。

還有，暘凱學長，沒有四年前你對我的啟發，就沒今天的我，你是最特別的！

最後感謝我的父母，女友雅勻，沒有你們的支持，我是無法走到最後的，有你們才讓我知道我不是一個人的，在此感謝你們，我愛你們！

錢世康

謹誌

中華民國 100 年 7 月 17 日

目錄

標題.....i

審定書.....ii

論文書目同意公開申請書.....iii

學位考試保密同意書暨簽到表.....iv

上網授權書.....v

誌謝.....vi

目錄.....vii

表目錄.....x

圖目錄.....xi

中文摘要.....xiv

英文摘要.....xvii

第一章 緒論..... 1

1.1. 背景.....1

1.2. 文獻回顧.....4

1.2.1. 過去人工植體設計.....4

1.2.2. 現今人工植體設計.....5

1.2.3. 植體外型及咬合力之關係.....8

1.2.4. 動物實驗.....10

1.2.5. 掃描式電子顯微鏡.....16
1.2.6. Masson Goldner 染色.....17
1.2.7. 免疫組織化學法染色.....18
1.3. 研究目的.....21
1.4. 研究假說.....23
第二章 研究材料與方法.....24
2.1. 研究對象.....24
2.2. 材料.....24
2.3. 麻醉.....24
2.4. 手術.....25
2.4.1. 第一階段手術.....25
2.4.2. 第二階段手術.....26
2.5. 犧牲.....26
2.6. 標本製備.....27
2.6.1. 電子顯微鏡之標本製備.....27
2.6.2. Masson Goldner 染色之標本製備.....27
2.6.3. 免疫化學染色之標本製備.....29
2.7. 評估.....30
2.8. 統計分析.....31

第三章 結果.....32

第四章 討論.....37

第五章 結論與展望.....41

第六章 參考文獻.....42

第七章 附錄.....49

7.1. 表.....53

7.2. 圖.....65

7.3. 動物試驗許可證明.....106

表目錄

表 2-1.....53

表 2-2.....54

表 2-3.....55

表 2-4.....56

表 3-1.....57

表 3-2.....58

表 3-3.....59

表 3-4.....60

表 3-5.....61

表 3-6.....62

表 3-7.....63

表 3-8.....64

圖目錄

圖 1-1.....65
圖 1-2.....66
圖 1-3.....67
圖 1-4.....68
圖 2-1.....69
圖 2-2.....70
圖 2-3.....71
圖 2-4.....72
圖 2-5.....73
圖 2-6.....74
圖 2-7.....75
圖 2-8.....76
圖 2-9.....77
圖 3-1.....78
圖 3-2.....79
圖 3-3.....80
圖 3-4.....81
圖 3-5.....82

圖 3-6.....83
圖 3-7.....84
圖 3-8.....85
圖 3-9.....86
圖 3-10.....87
圖 3-11.....88
圖 3-12.....89
圖 3-13.....90
圖 3-14.....91
圖 3-15.....92
圖 3-16.....93
圖 3-17.....94
圖 3-18.....95
圖 3-19.....96
圖 3-20.....97
圖 3-21.....98
圖 3-22.....99
圖 3-23.....100
圖 3-24.....101

圖 4-1.....102

圖 4-2.....103

圖 4-3.....104

圖 4-4.....105

論 文 摘 要

論文名稱: 以蘭嶼迷你豬評估不同植體螺紋設計和間距對骨整合之影響

臺北醫學大學醫學口腔醫學院牙醫學系碩士班

研究生姓名:錢世康

畢業時間:99 學年度第 2 學期

指導教授: 李勝揚 台北醫學大學口腔醫學院牙醫學系教授

王敦正 台北醫學大學口腔醫學院牙醫學系教授

目的:

本實驗乃比較兩種不同螺紋外型(梯型及方型)之植體，在不同螺紋間距(1.6、1.2、1.0、0.8、0.6 mm)下，植入蘭嶼豬上下顎骨後，評估可達到最多骨生成之最佳化螺紋組合。

料與方法:

共 8 隻四個月大蘭嶼迷你豬，先行拔除同側上下顎之乳齒及其底下恆牙牙胚。並於 2 個月後植入兩種螺紋之植體。其中 4 隻豬於植入後 8 週犧牲，其餘 4 隻於 16 週犧牲。犧牲後取下包含植體之骨塊以進行掃描式電子顯微鏡、Masson Goldner 染色及免疫組織化學染色，分別觀察螺距間軟硬組織之生長、骨組織之生長及骨組織之成熟度。以螺紋間之骨植體接觸百分比(BIC, bone-to-implant contact)作為測量，其數值以(平均值 ± 標準差)計算呈現。顯著差界值為 $P < 0.05$。同測試時間點同螺紋間距而不同螺紋外型，與不同測試時間點同螺紋外型同螺紋間距者以 t 檢定作統計，相同測試時間點相同螺紋外型但具不同螺紋間距則以變異數分析(ANOVA)作統計。

結果:

在 8 週組中，以掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察下之方型螺紋，其骨植體接觸百分比(BIC)依螺紋間距 1.6 mm、1.4 mm、1.0 mm、0.8 mm、0.6 mm 分別為 24.8 ± 9.8%、40.9 ± 10.3%、36.8 ± 8.9%、33.1 ± 14.2%、25.1 ± 17.4%；而梯型螺紋則依序為 45.8 ± 15.0%、59.2 ± 7.8%、64.7 ± 13.6%、48.3 ± 12.0%、35.9 ± 7.6%。在 Masson Goldner 染色下之 BIC，方型螺紋依序為 24.4 ± 13.6%、24.4 ± 15.7%、33.6 ± 13.6%、25.2 ± 18.0%、14.3 ± 10.9%；梯型螺紋為 41.5 ± 10.3%、46.9 ± 15.1%、53.1 ± 8.4%、62.8 ± 7.5%、37.0 ± 13.3%。在 16

週組，SEM 之結果，方型螺紋為 32.4 ± 18.0%、35.2 ± 6.6%、58.9 ± 19.4%、42.6 ± 18.4%、38.0 ± 9.5%；梯型螺紋為 45.6 ± 7.3%、53.9 ± 15.3%、61.9 ± 9.1%、69.2 ± 4.4%、61.4 ± 8.9%。在 Masson Goldner 染色組中，方型螺紋為 37.2 ± 7.2%、44.1 ± 14.6%、55.4 ± 18.8% 、40.1 ± 12.5%、34.5 ± 9.5%；梯型螺紋為 44.7 ± 13.5%、45.8 ± 13.4%、53.4 ± 8.5%、64.1 ± 10.8%、42.3 ± 11.7%。8 週與 16 週的實驗均顯示，不論何種螺距，在 BIC 上梯型螺紋均優於方型螺紋，其中又以 16 週之 0.8 mm 螺距的梯型螺紋之 BIC 較多。檢測時間點上，大多數方型螺紋螺距在 16 週之骨生成量優於 8 週；而梯型螺紋則於 8 週與 16 週無統計學上顯著差異。免疫組織化學染色發現，BMP-2 與 OC 在 8 週及 16 週皆出現在梯型與方型螺紋之骨組織中，但梯形螺紋之 BMP-2 及 OC 呈現較規則排列，且在 16 週時觀察到骨元現象，顯示梯型螺紋所產生骨組織較方型螺紋來得成熟。

結論:

本研究顯示梯型螺紋為人工植牙較佳設計之螺紋，且其間距為 0.8 mm 時，比方型螺紋快速達到較好之骨整合效果。

Abstract

Title of Thesis: Effect of different thread geometry and inter-distances on the osseointegration of dental implant with Lan-Yu mini-pig model

Author: Shih-kang Chien

Thesis adivsed by Sheng-Yang Lee, D.D.S, Ph.D.

Taipei Medical University,

School of Dentistry, College of Oral Medicine

Dun-Zheng Wang, DDS, PhD

Taipei Medical University,

School of Dentistry, College of Oral Medicine

Purpose: The objective of this study was to evaluate the efficacy of osteointegration for the implants with two different threads shape (trapezoidal and square) and different thread pitch (1.6 mm, 1.2 mm, 1.0 mm, 0.8 mm, 0.6 mm), implanted in mini-pig jaw, to assess the best combination of threads.

Method: Eight Lan-Yu mini-pigs were implanted with 2 different thread shape implants (trapezoidal and square)

with five different thread pitchs (1.4 mm, 1.2 mm, 1.0 mm, 0.8 mm, 0.6 mm) into maxilla and mandible. Before implantation, the primary premolars and tooth buds of secondary premolar within maxilla and mandible in the same side were removed. After two months, all eight implants were placed within maxilla and mandible in each mini-pig. Four implants thread were trapezoidal shape and the others were square shape. The eight Lan-Yu mini-pigs were divided into 2 groups for sacrifice after implantation, for 8 weeks and 16 weeks. The hard and soft tissue between each threads was observed by the scanning electron microscope (SEM). The bone formation in the each threads after implantation was observed by the Masson Goldner's stain. The bone formation and maturation was detected by immunohistochemistry stain with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and osteocalcin (OC). The Bone-to-Implant contact (BIC) was collected under scanning electron microscope (SEM) and Masson Goldner's stain. The data was expressed with mean ± standard deviation. The significant difference was ranged at $P < 0.05$.

The different pitch in different thread implant was detected by one-way analysis of variance (ANOVA). The results of different thread shape in same pitch were compared by the *t* test.

Results: In the 8 weeks group, the BIC for square thread shape with each pitch from 1.4 mm to 0.6 mm were individually get 24.8 ± 9.8%、40.9 ± 10.3%、36.8 ± 8.9%、33.1 ± 14.2% and 25.1 ± 17.4% by SEM method. The group of trapezoidal thread shapes were individually get 45.8 ± 15.0%、59.2 ± 7.8%、64.7 ± 13.6%、48.3 ± 12.0% and 35.9 ± 7.6%. The square thread shapes were individually get 24.4 ± 13.6%、24.4 ± 15.7%、33.6 ± 13.6%、25.2 ± 18.0% and 14.3 ± 10.9% by Masson Goldner' s stain, the trapezoidal thread shapes were 41.5 ± 10.3%、46.9 ± 15.1%、53.1 ± 8.4%、62.8 ± 7.5% and 37.0 ± 13.3%. In the 16 weeks group, the BIC for the square thread shapes were individually get 45.6 ± 7.3%、53.9 ± 15.3%、61.9 ± 9.1%、69.2 ± 4.4% and 61.4 ± 8.9%, the trapezoidal thread shapes were individually get 45.6 ± 7.3%、53. 9± 15.3%、61.9 ± 9.1%、69.2 ± 4.4% and 61.4 ± 8.9% by SEM method. The square thread shapes were

individually get 37.2 ± 7.2%、44.1 ± 14.6%、55.4 ± 18.8% 、40.1 ± 12.5% and 34.5 ± 9.5%, the trapezoidal thread shapes were individually get 44.7 ± 13.5%、45.8 ± 13.4%、53.4 ± 8.5%、64.1 ± 10.8% and 42.3 ± 11.7% by the Masson Goldner' s stain. In 8 weeks, the BIC in the implants of trapezoidal thread shape with 1.0 mm and 0.8 mm in pitch distance gained much more than the square thread shape. In 16 week group, the BIC in the implants with trapezoidal thread shape with 0.8 mm in pitch distance had the most value. Comparison between 8 and 16 week group, the BIC value in the 16 week group of square thread shapes was better than in 8 week group. The BIC value in the trapezoidal thread shape was no significant different between 8 and 16 week group. The bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and osteocalcin (OC) were appeared in both thread pattern. The BMP-2 and OC in trapezoidal thread was showed more regular than the square thread in arrangement. In the 16 weeks group, the osteon was appeared in trapezoidal thread pattern. The bone in the trapezoidal thread group was more mature than in the square thread pattern.

Conclusion: The obtained result from this study support that the implants of trapezoidal thread shape with 0.8 mm pitch distance which can achieve the best value of BIC and faster than square thread shape. The implant of trapezoidal thread shape with 0.8 mm pitch distance is the best combination for dental implant.

第一章

緒論

1.1. 背景

根據國民健康局2007年統計，65歲以上人口平均缺牙14.8顆，12歲以上亦達到5.6顆。而牙齒缺損往往會造成齒槽骨塌陷、軟組織的變化，進而影響咀嚼、吞嚥、說話、社交、美觀等能力。此外缺牙患者所喪失牙齒之其他鄰牙，也會隨著傾倒，或其對咬牙過度生長，進而造成嚴重咬合干擾。

過去依照患者缺牙的多寡和區域，可以固定或活動假牙來重建，但這類傳統假牙都存有缺點。舉凡，固定式假牙之牙橋，必須藉助健康支台齒(abutment tooth)作為牙橋支撐，然而修磨支台齒往往造成健康牙齒不必要之損傷。而完成之固定牙橋，也常清潔不易導致假牙與支台齒相接處之齲齒發生。平均固定假牙的使用年限約在10年左右(Walton et al. ,1986)。

而全口無牙患者，常因喪失牙齒而導致齒槽脊的持續吸收。根據Wolff’s law，骨組織隨著應力增加可以提高其強度(Wolff et al. ,1892)，而持續付予骨組織應力，則維持其骨吸收與再生之生理平衡，因此牙齒的存在對於齒槽骨的量與質之維持是非常重要的。在大臼齒喪失後的第一年，齒槽骨寬度約會減少50%，其中三分之二的

吸收發生在拔牙後三個月內(Schropp et al. ,2003)。另有文獻指出，拔牙後六個月，齒槽骨高度喪失 40%，寬度則喪失 60%(Levokic et al. ,1997 ,1998)。嚴重齒槽骨喪失的患者，不只咬合、咀嚼、發音等功能受到影響，其外觀也會因咬合高度(occlusal vertical dimension)的喪失而造成明顯改變。對於無牙患者，傳統上可以活動式假牙重建，但是活動式假牙並不能停止齒槽骨的吸收和喪失。隨著缺牙時間漸長，齒槽骨甚至可吸收至基底骨，而造成咬合高度的嚴重喪失，進而造成外觀上極端改變。此外，長期活動假牙配戴，也可能造成顳顎關節的移位(Goiato et al. ,2010)，甚至因嚴重齒槽骨吸收的上下顎，會使得全口假牙面臨固持力不足問題。

牙科植體(dental implant)之研究開始於 1960 中葉，而 1965 年 Branemark 首次臨床上使用牙科植體(Branemark et al. ,1969)。在 15 年的臨床經驗後，Branemark 提出完整報告，其中上下顎的植體成功率均達 78%，同時也提出骨整合(osseointegration)概念(Branemark et al. ,1981)。而植體的成功率決定於骨整合結果，亦即骨細胞可以攀附於植體表面，分泌骨質(osteoid)，將植體完整包覆，提供良好的固持力同時抵擋咬合的力量。影響骨整合程度的因素相當多，包括手術方式、材料生物相容性以及接受施力時的情況等(Albrektsson et al. ,1981)。而植體植入時，決定骨整合的關鍵為

初級穩固(primary stability)，其移動量若大於100μm，將導致骨整合失敗而使得植體無法與骨產生癒合(Brunski et al. ,1999)。

影響植牙初級穩固度則與植體的設計息息相關。其設計可分為微型設計(micro-design)和巨型設計(macro-design)兩大類。市面上不少植體廠商標榜不同的微型設計，即植體之表面處理(surface treatment)，以增加植體的表面積為主。但對於植體剛植入骨組織中，必須先達到初級穩固才能產生骨整合的效果，卻較少著墨。其實植體表面處理之目的為增加骨整合時，骨細胞組織在植體表面的攀附程度，但對於初級穩固之助益則不若植體外型設計來得重要。亦即，欲讓植體植入時迅速有效而達到初級穩固，不同的植體外型探討相對表面處理來得重要許多。有學者以有限元分析來評估不同螺紋設計當承受咬合應力時所造成的影響，其中 Chung et al.(2008)發現方型植體具有最佳的抗剪力效果，而 Kong et al.(2006)則提出，當螺紋間距為 0.8 mm 時，V 型螺紋之柱狀植體有理想的應力分散和初級穩固，但也有學者認為 V 型螺紋易產生不良剪力效應(Misch et al.,2008)。因此，迄今人工植體之螺紋最佳化設計在牙醫領域尚無共識。

。

1.2. 文獻回顧

1.2.1. 過去人工植體設計

透骨式植體(transosteal implant)在 1976 年提出，以重建嚴重吸收的下顎骨。在下顎骨下方以一基底板鈦板(base plate)，以緻密骨釘(cortical screw)固定於下顎骨。在緻密骨釘之間有穿下顎骨釘(transmandibular posts)貫穿下顎骨進入口內，作為覆蓋式假牙的支撐。此方法可以免除因為嚴重骨吸收必須多次的補骨和手術，縮短重建的時間，以及患者的不適，但手術範圍大，患者必須全身麻醉，造成現今此類植體已經乏人津(Bosker et al. ,1983)。

骨膜下植體(subperiosteal implants)於 1943 年即有學者提出，而在 1949 年後才廣為使用(Goldberg et al. ,1949)。其製作方式為在嚴重吸收的下顎齒槽骨先將軟組織切開露出下齒槽骨，以印模材印出骨脊的外型，再將傷口縫合。之後依翻印出的齒槽骨製造出網狀之植體，二次手術時，依第一次手術之切線切開牙齦組織再將植體放入。此類植體的特點為其不置於骨組織中，而是在骨膜之下，骨組織之上，植體並不會與骨產生骨整合現象，因此在術後待軟組織癒合即可製作假牙。但也因無骨整合，骨吸收會持續進行，故隨著時間，植體會漸漸與骨組織不合，造成植體晃動甚至感染的現象而必須移除。其成功

率在五年時約為 90%，但是十五年成功率則為 50-60% (Bodine et al. ,1996)。

刀刃式植體(blade implant)由 Dr. Linkow 於 1963 年提出，其植體為扁平刀刃狀，主要用於狹窄的骨脊處使用。將骨脊中央切開一長條溝槽，再將植體以敲擊方式植入。由於近年引導骨再生術(Guided bone regeneration)之進步，以及骨脊劈開術(bone splitting technique)的成熟，已少有人使用刀刃式植體。

1.2.2 現今人工植體設計

現今的植體多呈柱狀(cylinder form)或是牙根狀(root form)。而各家植體廠牌持續研發不同的植體設計以提高植體的成功率。這些植體的設計可以分成兩大類：巨觀設計(macrodesign)與微觀設計(microdesign)(Abuhussein et al. ,2010)。巨觀設計主要包含植體的螺紋部分，通常以螺紋外型(thread geometry)、面角(face angle)、螺紋間距(thread pitch)、螺紋深度(thread depth)、螺紋寬度(thread width)、螺紋截面角(thread helix angle)為主(圖 1-1)(Geng et al. ,2004)。

1.2.2.1 螺紋外型(thread shape)

螺紋外型由螺紋面角和厚度所決定。可以分為 V 型(V-shape)、方型(square shape)、拱壁型(buttress shape)、返拱壁型(reverse buttress shape)(Bogganet al. ,1999)。 1892 年 Wolff 提出了 Wolff’s law，此理論為當骨組織之應力增加時，其強度也會隨著增加。反之，如果骨組織沒有承受到適當外力而產生適當應力時則會漸漸吸收。而 Frost et al.在 1990 年時提出，如果骨組織產生過多應力時，反而會加速骨吸收(Frost et al. ,1990)。因此，植體的螺紋必須設計到可以理想地將外力施予骨組織而產生適度應力，減少過大的應力集中而導致骨吸收。

功能性咬合力施於植體時，會引起周圍骨組織的再塑形(remodeling)，而刺激骨的增生。而過大的應力集中則會造成骨的微骨折(microfracture)而造成骨分解(osteoclastogenesis)(Hansson et al. ,2003)。當微骨折產生速度大過於骨生成速度時，會產生大量的骨缺損(Prendergast et al. ,1996)。爾後此種骨缺損會被纖維組織所取代，並被微生物附著，最終支撐植體的骨組織減少，植體的失敗率即升高(Misch et al. ,2001)。

隨著電腦科技的進步，可以利用有限元素分析(finite element analysis, FEA)模擬植體在骨中的應力變化，以使臨床使用前，可先

行設計出理想的植體螺紋。有學者利用有限元素分析不同螺紋的應力分布情形，發現V型植體以及寬方型植體在海綿骨(cancellous bone)中，可產生最少的應力集中，而在皮質骨中，螺紋設計與應力集中無關(Geng et al. ,2004)。Chun的研究中，也支持方形螺紋為最不易造成應力集中的設計(Chun et al. ,2002)。

1.2.2.2. 螺紋間距(tread pitch)

螺紋間距為兩個螺紋中心之間的距離，或可以當植體旋轉一圈而沿長軸前進的距離。單一螺紋(single-thrad)植體之導程(lead)相當於螺紋間距。而雙螺紋(Double-thread)植體之導程則為螺紋間距的兩倍(圖1-2)。

導程決定植體鎖入骨中的速度，意即當植體選轉一圈，雙導程植體可以前進單導程植體的兩倍距離，也可以解釋為所需的時間為一半。有學者利用有限元素分析發現，當螺紋間距為0.8 mm時，其抵抗垂直力的能力比起1.6 mm和2.4 mm者為佳(Ma et al. ,2007)。

當植體螺紋距離減少時，因為表面積的增加，應力較能分散至骨組織中(Chung et al. ,2008)。在螺距大小的比較中，0.8 mm可以獲得較佳的第一級穩固，也可獲得較佳的應力分散，而過大或過小的

螺紋間距，都會製造不合適的應力(Kong et al. ,2006)。

1.2.2.3. 螺紋截面角(thread helix angle)

對單一螺紋間距的植體，導程與螺紋間距相等。而雙螺紋間距之植體，其導程為螺紋間距的兩倍。而螺紋截面角則決定於螺紋斜面與植體長軸垂線所交之角度。而不同螺紋之植體，其螺紋截面角也會不同。有學者以相同的螺紋間距 0.8 mm 而不同的螺紋截面角以有限元素分析，截面角越小的植體之穩固度最好(Ma et al. ,2007)。

1.2.2.4. 螺紋深度及寬度

螺紋深度為螺紋最大徑與最小徑之差，而螺紋之寬度則為螺紋在同一軸面下單一螺紋的厚度(Misch et al. ,2008)。螺紋寬度以及深度皆與植體的表面積大小有關，植體深度越深，表面積就越大，對於植體植入也會較為困難。但相對於較軟的骨質，較寬的植體就能達到理想的第一級穩固(Misch et al. ,2008)。理想的植體寬度與深度經過有限元素分析，寬度為 0.18 mm 至 0.3 mm 及深度為 0.34 mm 至 0.5 mm。而植體的深度較寬度容易產生應力集中(Kong et al. ,2006)。

1.2.3. 植體外型及咬合力之關係

應力施予植體以及骨組織的交接面會影響骨整合的結果。應力可

以分為三種：壓力(compression)、張力(tensile)、剪力(shear)。壓力對於骨組織而言是較理想的，可以增加骨組織的密度和強度。但是張力與剪力則對骨組織較易產生不利的影響(Misch et al. ,2008)。

就植體而言，施予骨組織的外力所產生之應力為何種類型決定於植體的外型。因此理想的植體設計必須能使壓力與張力平衡，並且產生最小的剪力。目前已發現錐形植體(taper implant)比起柱狀植體(cylinder implant)能提供較好的壓力(Lemons et al. ,1993)，而錐形植體的失敗率也較柱型植體低(Misch et al. ,2008)。不同的螺紋外型產生不同的螺紋面角，而螺紋面角與骨組織的交界處會因咬合應力而產生剪力，因此植體與骨組織交接面的剪力產生決定於螺紋面角的大小(Bumgardner et al. ,2000)，當螺紋面角越大時，因咬合應力產生的剪力就會越大。在各形狀植體外型的研究中發現，V 型植體較反拱壁型和方形植體易產生剪力(Misch et al. ,2008)，而 V 型植體和拱壁型植體也最易造成骨缺損(Hansson et al. ,2003)。另外，方形和拱壁型植體可以分散平行植體長軸之應力(Bumgardner et al. ,2000)，而 V 型植體和反拱型植體則會產生剪力與張力(Misch et al. ,2008)。

而應力對於植體螺紋與骨組織交接面的影響研究中發現，在植體

未受應力影響時，在螺紋上下方之骨密度是相近的。而在承受咬合力後，螺紋下方之骨密度會增加，而在螺紋邊緣處則為骨密度最低處(Bolind et al. ,2005)。在動物實驗中發現，方型螺紋相較於V型植體和反拱型植體能有較佳的植體骨組織交接面積與較高的抗扭力，(Steigenga et al. ,2004)。

1.2.4.動物實驗

1.2.4.1. 理想品種選擇

對於骨形成的研究，不論是牙科或骨科，皆不停探討何種動物物種比 較適合骨形成機制的研究。豬被發現在骨骼生理是與人類最相近的。但是其不同物種以及體型大小，骨的形成也不盡相同，因此也必須選擇與人類骨形成相近的品種。Schmidt et al. (2001)提出了理想的骨植體材料的條件，必須有生物相容性(biocompatible)的化學成分，避免造成過度組織反應(tissue reaction)，良好抵抗周圍環境侵蝕(corrosion)的能力，足夠的強度(strength)可以抵抗磨損，同時骨組織相近的彈性係數，以避免造成植體周圍的骨組織吸收。

為瞭解不同設計的植體能否在生物體長期使用，所以必須經過反

覆的生物體外和體內的測試。動物實驗可以模擬生物材料在人體的狀況，但是必須明白，動物也只是相當近似人體，而不同種的動物品種也各有優點和缺點。

而動物實驗物種的選擇必須有所考量，包括所需的花費、飼養的難易、動物是否為大眾社會所能接受的、動物取得的難易等。另外，對於每個物種的骨組織結構(microstructure)和骨再塑形的特性都必須瞭解。而適當的動物體型大小(macrostructure)，是否與人類相似，以作為模擬植體植入，也是研究骨組織與植體的重要因素(Schimandle et al. ,1994)。而單一種物種即能達成理想的動物實驗條件，是相當困難的，所以嘗試不同物種的實驗，也是動物實驗的另一個考慮(Hazzard et al. ,1992)。目前常用於植體與骨組織之動物實驗的物種有：狗、羊(sheep)、豬、兔等(圖 1-4)(Pearce et al. ,2007)。

1.2.4.2 狗

1991 至 1995 年間，以狗與貓為動物實驗對象幾乎占了所有使用動物的 11%(Neyt et al. ,1998)。在骨科方面，單就狗為實驗對象，於 1970 到 2001 年就占了 9%(Martin et al. ,2001)。狗，相對其他

動物是較容易馴服的，因此在某些特定需求時，可以訓練狗之行為。另外，市面上也可輕易取得為狗所設計的手術器械，因此在動物的取得以及實驗操作，都較為簡單。但是隨著大眾對狗的認知與寵愛，漸漸有了道德倫理上的考量，故目前使用狗作為動物實驗對象也較過去來得困難。而狗的體型和外型皆與人類較不相近，並不是一種適合仿生的動物實驗對象。

在骨組織方面，人類骨組織在位於骨板處(lamella)有第二骨元的特徵(secondary osteonal structure)，大於 100 μm，並含有血管和沉積線(cement line)。而狗則在骨膜(periosteum)和骨內膜(endosteum)等緻密骨(cortical bone)旁即有第二骨元。此類的現象多出現在生長快速的骨組織中，而人類中，兒童之骨組織才會見到。另外，這類骨組織也較人類之骨組織有較高的礦化程度，因此就骨組織的結構，人狗並不相似(Wang et al. ,1998)。然而成分方面，無論是骨密度、有機或無機物成分分析上，人狗其實是相當相似的(Aerssens et al. ,1998)。

在骨再塑形(Remodeling)方面，狗的骨再塑形率依照不同部位有極大的差異，從每年 12%至 200%者皆有，而其個體差異也相當大，平均骨的再塑形率約為每年 100%(Kimmel et al. ,1982)；而人骨組織的再塑形率則為每年 5 至 15%

(Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I et al. 2006)。由此得知，狗的骨生長是相當快速的，與人類的骨生理比較，其再塑形率甚至達到十倍差距。雖然狗的骨成分與人類類似，但由於結構上和生長速度的差異，在動物實驗模擬時必須移除這些因子所可能造成的誤差，才會有較合理的實驗設計。

1.2.4.3.羊

在 1980 年代，羊(Sheep)用於骨研究上占所有實驗動物的 5%，但到了 1990 年代，其數據上升到 9 至 12%(Martini et al. ,2001)。而其使用數量的上升，被認為是因為其他物種的道德倫理考量而改選羊為動物實驗對象。

雖然狗較羊的骨組織更接近人類，但是羊的體重較接近人類，也可以較能模擬人類植體使用的情形，或是一些無法使用於較小型動物上的植體，故羊還是成為植體動物實驗時的考量之一(Newman et al. ,1995)。

在骨組織結構上，人與羊的結構是相當不同的。羊之骨組織多為第一骨元(primary osteonal structure)，其多小於 100 μm，缺乏沉積線。羊的骨密度也遠較人類者高，為 0.61 g/cm^3，人類為 0.43

g/cm^3(Nafei et al. 2000)。其骨小樑骨(trabecular bone)之密度甚至是人類的1.5至2倍(Liebschner et al. ,2004)。

1.2.4.4. 兔

兔(Rabbits)為肌肉骨骼研究中最常見的物種，約占了35%(Neyt et al. ,1998)。主要原因為其好操作、容易飼養，其骨組織也只需六個月就能完成成熟。但是因為兔體型較小，許多植體的應用必須受到大小的限制。其植體建議不適合超過直徑2㎜,和長度不超過6㎜，為其他實驗物種的一半大小(International Standard ISO 10993-6 ,1994)。

在骨組織結構上，兔與人也是相當不同的。體型之差異造成骨組織在受力時的差異。而於再塑形上，兔的骨再塑形速度快於人類，極難模擬植體在人類上的臨床表現(Castaneda et al. ,2006)。

1.2.4.5. 豬

豬作為骨科或牙科植體的動物實驗行之有年(An et al ,1999;

Buser et al. ,1991)。但目前商業用的豬並不適合做為動物實驗，因為其相較於人類過快之生長速度，以及其體重在成年後會較人類超出許多。因此，目前以豬為動物實驗多選擇迷你豬(minipig)為主。骨組織結構上，由骨解剖、形態學上，癒合的過程以及再塑形，豬的骨皆與人類極為相似(Thorwarth et al. ,2005)。在骨密度與成分上，人類和豬的骨也是相當近似的(Aerssens et al. 1998)。在骨的再塑形方面，人、狗、豬之三者比較其速度，以豬與人最為接近。人的骨再塑形率為 1.0~1.5 mm/day，豬為 1.2~1.5 mm/day，狗則為 1.5~2.0 mm/day(Laiblin et al. ,1979)。以氟化物(fluoride)於緻密骨研究礦化率上也發現，成長中的豬骨礦化率也極為相近於人類的骨組織(Kragstrup et al. ,1989)。

目前並沒有單一種物種的動物實驗可以完全模擬人類的骨組織，但相對於羊和兔，狗與豬在組織上以及體型大小似乎較相似於人類(圖 1-4)。但目前對於狗的道德倫理議題漸漸被重視，反觀豬和羊等家畜較無此類問題。故綜觀以上論點，豬為人工植體以及人類骨組織的動物實驗適合對象，因此本實驗選擇以迷你豬(蘭嶼豬)作為動物實驗的對象。

1.2.5. 掃描式電子顯微鏡

掃描式電子顯微鏡發展於 1935 年，由 Max Knoll 所發明。其為利用高加速電壓將電子束打擊於標本表面後產生之訊號，分析標本表面之特徵。目前掃描式電子顯微鏡廣泛應用在多個研究領域上，包括材料、機械、電機、電子材料、冶金、地質、礦物、生物醫學、化學、物理等。掃描式電子顯微鏡用於骨組織觀察於 1983 年開始(Mc Carthy et al. 1983)。於 1990 年，有學者使用掃描式電子顯微鏡觀察牙科植體與口腔組織間之關係(Steflik et al., 1990)。在 1991 年，更有學者利用掃描式電子顯微鏡觀察蝕骨細胞(osteoclast)的結構及功能(Pierce et al., 1991)。目前掃描式電子顯微鏡於牙科植體上多用於植體經表面處理後之觀察(Kim et al. 2010)，但也有學者使用於螺紋外型設計之動物實驗，觀察植體與骨組織之交接面(Büchter et al., 2006)。以掃描式電子顯微鏡觀察骨植體表面可了解骨組織之生成型態，同時也可觀察植體表面對骨細胞所產生之影響。且掃描式電子顯微鏡比光學顯微鏡有更佳之分辨率，可觀察到更細節之部分。而掃描式光學顯微鏡具有大景深，比起光學顯微鏡更可觀察表面起伏程度較大之試片。但掃描式電子顯微鏡對於不同組織之分辨，僅能藉由表面型態之不同做鑑別，無法藉由染色或其他更精確方法輔助鑑定，

為其缺點。

1.2.6. Masson Goldner 染色

骨組織未脫鈣標本切片之染色最主要有三種：Solochrome cyanine 染色、von Kossa 染色、Masson Goldner 染色。其中 Masson Goldner 染色為三套染色(trichrome)，其可以凸顯骨組織，同時還可染出細胞質及細胞核，具有極高的便利性跟正確性(Gruber et al. 1992)。

Masson 染色最早出現於 1929 年，由 Dr. Masson 發明，可針對膠原纖維(collagen fiber)染色(Masson et al., 1929)。而 Goldner et al.於 1937 年提出 Masson 染色之改良技術，簡化 Masson 染色之步驟，使其可更快速完成(Goldner et al.,1937)。但此時之 Masson Goldner 染色並未用於骨組織標本，直到 1983 年 Recker et al.使用 Masson Goldner 染色技術於未脫鈣骨組織之樹脂標本，並且後續才有多位學者使用此技術 (Gruber et al., 1992, Kung et al., 2010)。

Masson Goldner 染色依據其染料不同，其骨組織可被染成藍色(toludine)或是綠色(light green)。而細胞質部份則為紅色(acid

fucin)。而 Weigert’s 蘇木紫溶液則可染出細胞核。在未脫鈣骨組織標本中，紅色部分可為新生骨(osteoid)，而藍色或綠色部分則為鈣化而較成熟之骨組織。

1.2.7. 免疫組織化學法染色

Coon et al.在 1941 年提出以免疫螢光(immunofluorescence)偵測標本細胞的抗體，此為第一例的免疫組織化學法染色。免疫組織化學染色利用特定的抗體(antibody)偵測標本細胞上特定抗原(antigen)，再利用顯色劑將標定的抗體顯色，以證明標本上有特定的蛋白質反應。

經過抗體處理的標本，其抗體-抗原化合物必須經過偵測(detection)之後才會顯現，此動作稱為標記(labeling)。而標記物質可以是螢光化合物(fluorescent compounds)、酵素(enzymes)和金屬(metal)(Taylor et al.,2002)。其中酵素為最常作為標記之物質，舉凡過氧化酵素(peroxidase)、鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)和葡萄糖氧化酶(glucose oxidase)等。酵素會結合於抗體-抗原化合物上，並且色原體(chromogen)會在附著於酵素上，達到成色的效果。選擇偵測系統對於免疫組織化學法染色相當重要，其會影響專一性及

敏感性。偵測系統可分為直接法(direct method)和間接法(indirect method)。

直接法為最簡單的免疫組織化學法偵測系統，其第一級抗體含有報告分子(reporter molecule)，而報告分子即為標記，其成分可以是螢光物、酵素和生物素(biotin)(Coons et al. 1950)。故標本經過第一級抗體處理後即可觀察。其優點為快速，單一步驟，但是缺乏足夠的敏感性。

間接法為改善直接法敏感度不足之問題，Coons et al.於1955年提出間接法，其為兩步驟法。其第一級抗體不含有標記物質，而待第一級抗體與抗原作用後，再以含有標記之第二級抗體(secondary antibody)來偵測第一級抗體。因第一級抗體至少被兩個第二級抗體所結合，所以標記訊號增強，也可觀察到更稀少的抗原。

免疫組織化學染色常用來診斷惡性腫瘤及感染，也可用來偵測細胞記號(cell marker)及特定之蛋白質。藉由偵測特定蛋白質的表現，也可說明特定細胞的活性及分化(Walivarra et al. ,1994)。在植體與骨整合方面，也有學者使用免疫組織化學染色評估骨細胞在植體表面的狀況。Schwarz et al. (2006)利用 transgkutaminase II 偵測血管生成(angiogenesis)及 OC 偵測骨的形成。Schlegel et al. (2005)以 BMP-2、OC 和 procollagen 偵測植體上骨之生成等。其中 BMP-2 及

OC 最常被用來研究植體與骨組織之間之關係。

BMP-2 為 BMP 家族中之一員，其可引起骨母細胞之分裂與生成。在骨生成的初期，骨母細胞分裂增生時，其 BMP-2 表現會增加，可以做為骨組織生成之早期指標(von Wilmowsky et al. 2011)。而 OC 同為骨母細胞產生之非膠原蛋白質，其在骨生成的過程中會與羥磷灰石(hydroxyapatite)結合，故可做為一種偵測骨組織鈣化程度的蛋白質之一。當骨組織鈣化後，其 OC 表現會相對增加，可代表骨較成熟時所產生的蛋白質(Lian et al. 1998; von Wilmowsky et al. 2011)因此對於骨整合而言，免疫組織化學染色可藉由標定 BMP-2 及 OC 來分析骨組織是為新生骨質抑或為鈣化之成熟骨。

1.3. 研究目的

人工植牙手術中，最重要的預後關鍵就是植體的穩固度(stability)。植入初期可藉由植體之幾何形狀與螺紋構型，使植體與骨組織間產生機械力嵌合以提供初期穩固度，再藉由骨組織後期的再生(regeneration)與重塑(remodeling)產生植體與骨組織之骨整合(osseointegration)效應，讓植體能夠承受咬合力的負載。

由過去研究瞭解，植體以方型螺紋對於垂直應力之分散效果最佳。但其螺紋面角為0°，代表其鎖入骨組織時抵抗力較大，不易植入定位。而V型螺紋在鎖入骨組織時，其螺紋面角利於植入定位，但在有限元分析及動物實驗則發現，螺紋邊緣易造成應力集中而產生骨缺損。於是本研究提供設計一種改良螺紋-梯形螺紋，亦即以V型螺紋為主，但將螺紋邊緣設計為平行植體長軸，使得既有利植入定位，有可以減少應力集中而造成可能之骨吸收。

再者，過去螺紋設計研究多以有限元分析模擬植體受力情況，鮮少以動物實驗觀察植體在植入生物體後，其螺紋外型對於骨組織之多元性質與量分析。因此，本研究擬比較文獻上似乎最理想之方型螺紋及本研究所改良設計之梯型螺紋，搭配不同之螺紋間距來進行動物實驗，並同時，以掃描式電子顯微鏡、Masson Goldner 染色、免疫組織化學染色觀察分析，以評估何種螺紋外型及螺紋間距組合可獲得最

佳之骨整合效果，以期未來能開發出最佳化之產品設計。

TAIPEI MEDICAL UNIVERSITY
1960

1.4. 研究假說

在蘭嶼豬的動物實驗中，其植體螺紋為梯型時，且其螺紋間距為0.8mm時，可以較方型螺紋以及其他螺紋間距者獲得更多的骨生成，以達到植體之最佳初期穩固。

第二章

研究材料與方法

2.1. 研究對象

以蘭嶼豬為動物實驗對象，豬齡為四個月，健康之豬體共 8 隻，每隻體重約 20 公斤。蘭嶼豬由行政院農委會畜產試驗所台東種畜繁殖場提供（圖 2-1），並通過動物試驗委員會（附錄 7.3.）。

2.2. 材料

試樣為實驗室研究團隊先行以切削方式製作出之兩種螺紋外型之鈦金屬植體，表面未施予任何表面處理。分別為方形螺紋與梯形螺紋，而螺紋間距皆分別為 0.6 mm，0.8 mm，1.0 mm，1.2 mm，1.4 mm。螺紋之厚度則皆為 0.6 mm(圖 2-2、2-3)。試樣各別清洗，於標準無塵室包裝後，以輻射滅菌進行消毒，等待動物實驗之用。

2.3 麻醉

先以舒泰(Zoletil Virbac, France)和阿托品(Atropine)做先行麻醉(induction phase)。舒泰為 Tiletamine 和 Zolezerm 以 1:1 劑

量混和，以 0.55~0.8 mg/kg，而 Atropine 則為 0.007~0.009 mg/kg，由豬隻耳後以肌肉方式注射。 舒泰為含鎮定劑與肌肉鬆弛劑的混和劑，可以提供動物引導麻醉的誘導劑，且具有誘導期短、副反應小、安全等特點。而阿托品則為副交感神經抑制劑，減少動物在麻醉之後唾液腺分泌而引起的吸入性肺炎。

當豬隻進入引導麻醉後進入深層睡眠，但呼吸心跳仍不受影響。此時將豬體移至動物專用手術台上，並以 27 gage 之蝴蝶針由豬耳後之靜脈插入，完成埋針動作。而蝴蝶針後接上三接頭，一端接上生理食鹽水(normal saline)吊帶，另一端接上 10ml 之注射針筒，內含有 Thiamylal (Citosol, 杏林新生製藥, 台灣)。維持期(maintain phase)以 Thuamylal 滴定方式藉由耳後靜脈注射，進入深層麻醉。

2.4. 手術

2.4.1. 第一階段手術

在豬體完成麻醉後，以碘酒消毒豬隻口腔內外部後，以無菌治療巾和洞巾鋪設，露出豬之口腔，並以拔牙鋌和拔牙鉗拔除豬單邊上下顎之小臼齒共 8 顆。保留單邊的牙齒使豬隻的咬合功能不受影響，而能維持進食能力。術後以可吸收之 3-0 Vicryl 縫線縫合，完成第一

級縫合，減少感染機會。術後由耳部靜脈注射給予豬隻 Cephazolin(Cephalosporin ,信東生技，台灣) 3 mg/kg，預防傷口感染。

2.4.2. 第二階段手術

在第一階段完成後二個月以待拔牙傷口癒合，進行第二階段手術。第二階段手術準備與第一階段相同，在完成麻醉、消毒以及鋪單後，在第一階段已經癒合之上下牙脊上劃開，約長 4 公分，並且將骨膜以及牙齦全層翻開，將上下齒槽骨露出。再以直徑 4 mm 之環鋸(trephine)以及高速手機(hand piece)，於垂直牙脊之軸向製造一直徑 4 mm，深度為 10 mm 之骨缺損(bony defect)，上下顎各四個骨缺損，而每個骨缺損相近至少要大於 3 mm。之後於骨缺損處植入植體，並以生理食鹽大量沖洗之後，以 4-0 Vicryl 將牙齦以及骨膜縫合。術後給予 Cephazolin 避免感染。而植體置入方式以圖示之(圖 2-4)

2.5. 犧牲

經過植入植體後，分別於兩個月和四個月後，給予豬隻犧牲。先以 Zolitel 0.55~0.8 mg/kg 麻醉之後，給予 200 伏特電壓電擊致死

後放血。取下豬隻之上下顎後進行剝肉之動作，並盡速冷凍保存。

2.6. 標本製備

2.6.1. 電子顯微鏡之標本製備

將取下之式樣及骨組織先行以帶鋸機分塊，並浸泡於含有 2% paraformaldehyde 及 2.5% glutaraldehyde 之 PBS 標本罐中兩天，先行防腐處理。將標本以鑽石切割機(圖 2-5)沿樣本之長軸切割，鑽石刀轉速約為每分鐘 200 轉，將式樣連帶骨組織對半分開。其中之一做為電子顯微鏡觀察之標本，而另一半標本則置回標本罐做為爾後 Masson Goldner 染色和免疫化學組織染色之用。而做為電子顯微鏡觀察之標本換裝成塑膠標本罐，並浸泡於 1%之鋨酸(OsO4)24 小時以進行組織固定。之後將標本依序浸泡於 50%，75%，95%，100%之酒精各兩天以進行脫水。脫水完成後之標本送入電子顯微鏡室，以 Hitachi S-2400 電子顯微鏡觀察植體與骨接觸面。

2.6.2. Masson Goldner 染色之標本製備

將置放於PBS之標本取出後，先依序以70%,95%酒精各浸泡2天，

再置入於 100%之 2-propanol 1 天，最後浸泡於 100%之 Xylene 1 天，完成脫水及組織固定之工作。接著將標本浸泡於甲基丙烯酸甲酯(methyl methacrylate)混和溶液(表 2-1)，並存入 4° C 冰箱中三天。置換新的甲基丙烯酸甲酯混和溶液，並以二甲基對甲苯胺(N,N-dimetyl-p-toluidine)當作起始劑加入標本罐中，使甲基丙烯酸甲酯混和溶液開始聚合硬化。於標本罐中灌入二氧化碳後密封，存入 4° C 冰箱中待聚合硬化完成。

硬化完成後之樹脂標本塊(圖 2-6)以鑽石切割機延植體長軸切片，取下約 0.5mm 厚度之樹脂標本，再以砂紙研磨機(圖 2-7)依序以 300，600，800 粒度(grit)之砂紙將樹指標本磨至約 200 μm(圖 2-8)，以待染色。

以 Masson Goldner 染色進行標本之觀察，使用之染色套件為 Merck 藥廠(cat. No:100485)提供。樹脂標本先浸泡於 Weigert’s 蘇木紫溶液(表 2-2)5 分鐘，再於流動自來水沖洗 5 分鐘。再以 1%冰醋酸溶液沖洗 30 秒後，浸泡於 Masson 染色套件之 Azophloxine 溶液 10 分鐘，以 1%冰醋酸溶液沖洗 30 秒。再將標本浸於 Tungstophosphoric acid orange G 溶液 1 分鐘，以 1%冰醋酸溶液沖洗 30 秒。再以 Light green SF 溶液浸泡 2 分鐘，以 1%冰醋酸溶液沖洗 30 秒。最後浸泡於 100%酒精脫水完成，將樹脂標本裁切至適當大小後置放於載玻片，再

以另一載玻片覆蓋，以膠帶固定完成後(圖 2-9)，在光學顯微鏡下觀察並照相記錄。

2.6.3 免疫化學染色之標本製備

先將以甲基丙烯酸甲酯溶液包埋好之標本切片並研磨完成，其步驟與 Masson Goldner 標本製備相同。

免疫化學染色所使用主抗體分別為 Osteocalcin (OC)(cat. No:ab13420)及 Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)(cat. No: ab6285)， 由 Abcam 公司出品。而標定系統使用 avidin-biotin complex 法(ABC method)，使用之藥劑由 Vectors Lab 公司出品之 Vectastain ABC Kit (PK-4002)(表 2-3)。而顯色系統使用 DAB 法(cat. No:ab64238, Abcam)(表 2-4)。

標本於染色前一天先放置於 0.9% NaCl 生理食鹽水浸泡一天。染色前標本先以 PBS 沖洗三次各 5 分鐘。再浸泡於 citrate buffer(10mM, pH 7.4)並於沸水中隔水加熱 10 分鐘。之後以 PBS 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。將標本靜置於 3%雙氧水（Merck）溶液中 1 小時。再以 PBS 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。將標本置於 normal serum blocking agent 中 60 分鐘，之後移除 normal serum blocking agent，並加入 OC 與 BMP-2

第一級抗體(1:50)，於 4° C 存放過夜。再以 PBS 沖洗 3 次，每次 5 分鐘後，加入 Biotinylared 2nd antibody，於室溫下靜置 1 小時。以 PBS 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。加入 Vectastain ABC Reagent，於室溫下靜置 1 小時。以 PBS 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。以 DAB 染色 2 分鐘。以流動清水沖洗 3 ~ 5 分鐘。再以蘇木紫作對比染色 1 分鐘。以流動清水沖洗 3 ~ 5 分鐘。將標本以 100%酒精脫水後，裁切至適當大小後置於載玻片，再以另一載玻片覆蓋，以膠帶固定後於光學顯微鏡下觀察並照相記錄。此染色法後之標本，其鑑定之蛋白質如存在時，會呈現棕色或暗紅色之顏色。

2.7. 評估

經掃描式電子顯微鏡觀察及經光學顯微鏡觀察之 Masson Goldner 染色標本，其影像以數位影像檔(JPEG)儲存，並以影像軟體 Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) 進行影像的量化分析。計算範圍為植體兩螺紋間之長度為分母，長入兩螺紋間之骨組織與植體表面接觸長度為分子，相除後之百分比則為骨植體接觸百分比(bone-to-implant contact, BIC %)，可做為植體對於骨整合優劣之量化探討。

經免疫組織化學染色之標本，以光學顯微鏡觀察並以數位影像檔儲存，觀察 BMP-2 及 OC 之表現及其分布狀態，進而了解螺紋間骨組織之生成及成熟程度，作為骨組織增生品質之分析參考。

2.8. 統計分析

以電子顯微鏡觀察及 Masson Goldner 染色觀察所獲得之數據以平均值 ± 標準差(SD)表示，並以 Microsoft Excel 2010 進行資料處理與分析，統計分析以 $P < 0.05$ 視為有統計上之差異。同時間點同螺紋間距而不同螺紋外型，以及不同時間點同螺紋外型同螺紋間距者，均以 t 檢定作統計，同時間點同螺紋外型而不同螺紋間距則以變異數分析(one-way ANOVA)作比較。

第三章

結果

所有 8 隻蘭嶼豬皆完成實驗並犧牲。8 周組共取下 30 支植體，其中方型植體 13 支，梯型植體 17 支。16 周組共取下 28 支植體，方型植體及梯型植體各 14 支。8 周組中，方型螺紋有 5 支及梯型螺紋有 8 支植體經過掃描式電子顯微鏡之觀察(圖 3-1，圖 3-2)，而另有 8 支方型螺紋及 9 支梯型螺紋經過樹脂包埋切片，其中方型螺紋及梯型螺紋各 6 支經過 Masson Goldner 染色處理後觀察(圖 3-3，圖 3-4)，各有 3 支之方型螺紋及梯型螺紋經過免疫化學組織染色。16 周組則為方型螺紋及梯型螺紋各 5 支經過掃描式電子顯微鏡觀察(圖 3-5，圖 3-6)，而各 8 支經過 Masson Goldner 染色處理(圖 3-7，圖 3-8)，各 3 支做免疫化學組織染色。

在 8 週組中，以掃描式電子顯微鏡觀察之方型螺紋，其骨植體接觸百分比(BIC)依螺紋間距 1.6 mm、1.4 mm、1.0 mm、0.8 mm、0.6 mm 為 24.8 ± 9.8%、40.9 ± 10.3%、36.8 ± 8.9%、33.1 ± 14.2%、25.1 ± 17.4%。而梯型螺紋則依序為 45.8 ± 15.0%、59.2 ± 7.8%、64.7 ± 13.6%、48.3 ± 12.0%、35.9 ± 7.6%(表 3-1)。在 Masson Goldner 染色組中，方型螺紋依序為 24.4 ± 13.6%、24.4 ± 15.7%、33.6 ± 13.6%、25.2 ± 18.0%、14.3 ± 10.9%。梯型螺紋為 41.5 ± 10.3%、46.9 ± 15.1%、

53.1 ± 8.4%、62.8 ± 7.5%、37.0 ± 13.3%(表 3-2)。

由圖 3-9 可知，在掃描式電子顯微鏡下，當螺紋間距為 1.4 mm、1.2 mm、1.0 mm、0.8 mm 時，梯型螺紋之 BIC 大於方型螺紋，且有統計上之顯著性差異($P < 0.05$)。而在 Masson Goldner 染色下，則是螺紋間距為 1.0 mm、0.8 mm、0.6 mm 時，梯型螺紋之 BIC 大於方型螺紋，且有統計上之顯著差異($P < 0.05$)。由此可知，當梯型螺紋間距為 1.0 mm 及 0.8 mm 時，不論在掃描式電子顯微鏡或是 Masson Goldner 染色下，都可以發現梯形螺紋皆優於方型螺紋。

從圖 3-10 中可以發現，在 8 週時，方型螺紋無論在掃描式電子顯微鏡或是 Masson Goldner 染色下，所有螺紋間距之組別沒有任何差異，意即方型螺紋於 8 週時，螺紋間距之差異對於骨整合並無顯著性影響。

比較 8 週梯型螺紋之不同螺紋間距對於骨生成之影響。由圖 3-11 得知，在掃描式電子顯微鏡下，1.0 mm 之螺紋間距其平均 BIC 為所有間距最高，且與 1.4 mm 及 0.6 mm 者有統計上之顯著差異($P < 0.05$)。而在 Masson Goldner 染色下，則為 0.8 mm 之平均 BIC 最高，且與 1.4 mm 及 0.6 mm 者有統計上之顯著差異($P < 0.05$)。其可以解釋為在 8 週之梯型螺紋，其在 1.0mm 和 0.8mm 之螺紋間距時可有最多之 BIC，而在最大(1.4 mm)及最小(0.6 mm)之螺紋間距其 BIC 最少，也

為最不適當之螺紋間距。

在 16 週組，以掃描式電子顯微鏡觀察之方型螺紋依序為 32.4 ± 18.0%、35.2 ± 6.6%、58.9 ± 19.4%、42.6 ± 18.4%、38.0 ± 9.5%，梯型螺紋為 45.6 ± 7.3%、53.9 ± 15.3%、61.9 ± 9.1%、69.2 ± 4.4%、61.4 ± 8.9% (表 3-3)。在 Masson Goldner 染色組中，方型螺紋為 37.2 ± 7.2%、44.1 ± 14.6%、55.4 ± 18.8% 、40.1 ± 12.5%、34.5 ± 9.5%。而梯型螺紋為 44.7 ± 13.5%、45.8 ± 13.4%、53.4 ± 8.5%、64.1 ± 10.8%、42.3 ± 11.7%(表 3-4)。

由圖 3-12 可知，在掃描式電子顯微鏡下，梯型螺紋在 1.2 mm、0.8 mm、0.6 mm 時，BIC 是優於方型螺紋，且有統計上顯著差異($P < 0.05$)。在 Masson Goldner 染色下，則發現梯型螺紋於 0.8 mm 時，其 BIC 優於方型螺紋。故可以發現梯型螺紋於 0.8 mm 時，無論是掃描式電子顯微鏡或 Masson Goldner 染色，皆是 BIC 接觸最高之組別。

由圖 3-13 中發現，方型螺紋在 1.0 mm 時有最多之 BIC，但只有在 Masson Goldner 染色下，與 0.6 mm 有統計上差異。在圖 3-14 中，梯型螺紋在 0.8 mm 時無論在掃描式電子顯微鏡或是 Masson Goldner 染色下，皆是最高之 BIC。且在掃描式電子顯微鏡下與 1.4 mm 有統計上之顯著差異($P < 0.05$)。而 Masson Goldner 染色下則是與 1.4 mm、

1.2 mm、0.6 mm 有統計上顯著差異($P < 0.05$)。意即在 16 週下，梯型螺紋依然是以 0.8 mm 之螺距有最多 BIC。

在時間點之分析上，由圖 3-15、圖 3-16 及表 3-5、表 3-6 中可知，方型螺紋之多數螺距在 16 週之 BIC 高於 8 週。而梯型螺紋則在 Masson Goldner 染色下發現 8 週與 16 週之 BIC 並無任何統計上顯著性差異($P < 0.05$)(表 3-7、表 3-8)。意即方型螺紋其 BIC 必須於 16 週時才會達到最高量，而梯型螺紋則在 8 週時即可達到 BIC 之最高量。換言之，梯形設計之螺紋可以較快獲得骨植體接觸。由以上結果可推論，對於方型螺紋而言，螺紋間距於 1.0 mm 時，為其最佳設計。而梯型螺紋之最佳設計則間距為 0.8 mm 。將這兩組最佳化設計做 t 檢定比較差異，發現並無統計上顯著性差異($P = 0.154$)($P < 0.05$)。

免疫化學組織學染色部分，在 8 週時，梯型及方型螺紋皆有 BMP-2 之表現，並且隨著骨組織排列，顯示在梯型及方型螺紋接有新生形成。在梯型螺紋方面，可以發現部分靠近植體表面處已經出現層狀骨，同時 BMP-2 隨著層狀骨排列(圖 3-17)，顯示在植體表面處，骨組織較成熟。而在螺紋間距處，骨組織以梭織骨呈現，BMP-2 呈現也較混亂，呈現出一新生骨質之特徵；方型螺紋而言，其骨組織多數以梭織骨方式呈現，BMP-2 之呈現也較無規則(圖 3-18)，顯示其新生骨較多也較不成熟。而在 OC 之標定上，梯型及方型螺紋皆有出現 OC，顯示已出

現部分骨組織鈣化之現象。但方型螺紋之 OC 多出現在螺紋外緣，靠植體表面處較少(圖 3-19)，顯示其骨組織鈣化位於植體外側，螺紋間距內骨組織成熟較慢。而梯型螺紋其 OC 表現呈層狀之規則排列(圖 3-20)，顯示骨組織已經成熟，並且開始鈣化。

在 16 週之免疫化學組織學染色,方型螺紋與梯型螺紋皆有 BMP-2 之表現，並出現於排列規則之層狀骨中， 且兩者皆較少出現梭織骨(圖 3-21，圖 3-22) ，顯示兩者其新生骨質已較成熟。在 OC 之標定，發現方型有 OC 之表現，但在骨植體接觸面有較明顯之 OC 表現(圖 3-23)，表示在方型植體，其鈣化由植體表面開始。而梯型螺紋中，OC 不只大量表現，更可以清楚看到其隨著骨元(osteon)外型排列(圖 3-24)，顯示此處之骨組織成熟並且癒合完成。

第四章

討論

過去研究植體螺紋外型及螺紋間距之研究多是以有限元素分析以電腦模擬，較少有動物實驗證實。而有限元素分析是以電腦模擬植體於受力時，螺紋間與骨組織之間應力的分佈現象。但對於植體植入生物體後，骨組織對於不同的螺紋外型及間距有何影響，並無法以有限元素分析模擬。在過去，也鮮少類似文獻的出現。故本研究以動物實驗，模擬植體在非受力的狀態下，在植入活體之骨組織中，觀察不同的螺紋及間距對骨組織所造成的影響，進而了解以何種螺紋外型及螺紋間距可以使骨組織快速的與植體發生骨整合，以達成第一級穩固，增加植體之成功率。

在 Stadlinger et al. 的研究中，以迷你豬為實驗對象。其所用之植體為鈦金屬，螺距約為 0.9 mm，螺紋近似梯型。其 4 週之 BIC 為 53.8% (Stadlinger et al. 2010)，近似本研究之梯型螺紋，1.0 mm 螺距於 16 週時之 BIC (53.1 ± 8.4%)。而在該研究中，其植體處以噴砂及酸蝕處理，故在 4 週即與本研究之 16 週結果相似。而在 Traini et al. 的研究中，其豬隻之犧牲時間同為 16 週，其螺紋同為梯形(Xive plus)，螺紋間距為 0.75mm，其 BIC 為 78.0 ± 5.8%，高於本研究結果。此研究中所使用之植體乃經過噴砂及酸蝕處理，而增

加了微表面積，可能是BIC較高的原因(Traini et al. 2008)。在其他文獻上也發現，使用切削植體於狗之動物實驗(Bonfante et al., 2010)。在該研究中，其切削植體之螺紋間距約1.0 mm，螺紋外型近似梯形螺紋(圖4-1)，表面未經過處理。其4週BIC為50%(圖4-2)，近似本研究結果(53.1 ± 8.4%)。推測狗之骨組織成熟較迷你豬約快速兩倍，故只需4週即可達到迷你豬16週之相似結果。

在植體置入骨組織初期，植體與骨之間會存在著間隙(gap)，會被血塊(blood clot)所填充。之後發生血管形成(angiogenesis)，並由間葉細胞(mesenchymal cell)分化骨母細胞(osteoblast)及嗜骨細胞(osteoclast)。先形成膠原纖維(collagen fiber)排列混亂之梭織骨(woven bone)，隨著骨組織之成熟，其膠原纖維會由排列混亂漸漸轉變為平行排列整齊之層狀骨(lamellar bone)(Schenk et al. 1994)。在本研究的標本中，可以發現在8週方型螺紋中有較多的梭織骨，而8週梯型螺紋含較少之梭織骨，取而代之的是多數之層狀骨。在16週之梯型螺紋及方型螺紋則皆可見到多數之層狀骨，顯示梯型螺紋內可使骨組織較快速成熟而形成層狀骨，而方型螺紋則需16週才能達成多數之層狀骨，此標本也與其他學者之研究相近(圖4-3)(Baas et al.,2006)。

而本研究同時利用BMP-2及OC作為骨成熟之比較。BMP-2為BMP

家族中之一員，其可引起骨母細胞之分裂與生成。在骨生成的初期，骨母細胞分裂增生時，其 BMP-2 表現會增加，可以做為骨組織生成之早期指標(von Wilmowsky et al. 2011)。而 OC 同為骨母細胞產生之非膠原蛋白質，其在骨生成的過程中會與羥磷灰石(hydroxyapatite)結合，故可做為一種偵測骨組織鈣化程度的蛋白質之一。當骨組織鈣化後，其 OC 表現會相對增加，可代表骨較成熟時所產生的蛋白質(Lian et al. 1998; von Wilmowsky et al. 2011)。本研究發現，8 週時方型螺紋之 BMP-2 表現呈現無規則排列，OC 則多位於螺紋外，梯型螺紋則可發現呈層狀排列之 BMP-2 及 OC。顯示骨組織在方型螺紋處生成較慢，其鈣化部分也較梯型螺紋慢。在 16 週中，BMP-2 皆出現於梯型及方型螺紋，且排列方式皆呈現層狀。但在 OC 的表現中，梯型螺紋比方型螺紋明顯，甚至出現骨元之外型，顯示梯型螺紋在 16 週時，其骨組織幾乎已成熟。在本研究之 Masson Goldner 染色中，梯型螺紋於 16 週之 0.8 mm 螺距之骨組織呈現較成熟之層狀骨，符合此免疫組織化學染色之結果。骨組織於梯型螺紋中，其骨生成較快速，且可以較快成熟，鈣化程度也較好。Schwarz et al.使用狗為實驗對象，發現 OC 的表現與骨植體接觸百分比有相關。在此學者的實驗中，植體表面出現層狀排列之 OC，其骨植體接觸面積也較多（Schwarz et al., 2006）。在本研究中，OC 於梯型螺紋中表現較方型螺紋明顯，

而在 Masson Goldner 染色下，梯型較方型螺紋多較成熟之層狀骨，此與此學者的研究相似。

在本研究中，發現方型螺紋在較大之螺紋間距(1.2 mm 及 1.4 mm)時，骨組織靠近螺紋內直角處其骨植體接觸百分比要比螺紋邊緣處要多(圖 3-3)，推測骨組織應先接觸至螺紋直角處，在漸漸往螺紋邊緣處生長。在 Puleo et al.之研究提及此現象，骨組織在接觸到植體後，會先沿著植體表面生長，之後其生長方向會沿著植體及遠離植體兩個方向進行。而其速率差則是遠離植體方向比沿著植體快 30%（圖 4-4)(Puleo et al., 1999)。故推測植體植入骨組織後，骨沿著植體接觸面生長，因此本研究可觀察到，在 1.4 mm 及 1.2 mm 之方型螺紋中，其螺紋深處先被骨組織占滿，接著才是螺紋外緣發生骨生成。在較小的方型螺紋間距(0.6 mm)中，觀察到骨組織由螺紋外緣長入，而螺紋深處則無骨組織生成。故推測方型螺紋間距小於 1.0mm 時，骨組織不易長入螺紋深處。而梯型螺紋則在 0.6 mm 時也發現此現象，推估當螺距為 0.6 mm 時，其整體外型較近似方型螺紋而造成此一相同現象。而梯形螺紋之其他螺距皆發現螺紋內側有骨生成，推測可能為螺紋外緣與螺紋面交角較小，使得骨組織較易順著螺紋外緣直接長入螺紋內側，而使梯型螺紋其骨生成較方型螺紋快速。

第五章

結論與展望

本研究結論支持利用梯形螺紋於 0.8 mm 螺距時，可以獲得較佳的骨整合。同時也發現，梯形螺紋之設計在植入骨後，其達成骨整合之速度快於方型螺紋。雖然方型螺紋在抵抗應力時有最佳之效果，但因其螺紋面角關係，導致其在操作上之不便。加上文獻顯示，具有切削力之 V 型螺紋雖然在操作上方便，但在植入受力時，其螺紋邊緣易產生應力集中而造成骨吸收。因此，本研結果顯示，梯形螺紋在植入骨時可提供比起方型螺紋較接近 V 形螺紋之楔型力量而幫助操作，同時亦能較快速達到骨整合效果，顯然可提供未來在設計牙科植體時的一種改良參考。

第六章

參考資料

Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI.A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw.Int J Oral Surg. 1981; Dec;10(6):387-416.

Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. Endocrinology. 1998; 139: 663-670.

Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. Eur Cell Mater. 2007 Mar 2;13:1-10.

Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.A. & Lindstrom, J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a longlasting,direct bone-to-implant anchorage in man. Acta Orthop Scand. 1981;52(2):155-70.

An YH, Friedman RJ. Animal selections in orthopaedic research. In: Animal Models in Orthopaedic Research. CRC Press LLC, Boca Raton, FL,. 1999; pp 39-57

Baas J, Lamberg A, Jensen TB, Elmengaard B, Søballe K.. The bovine bone protein lyophilisate Colloss improves fixation of allografted implants—an

experimental study in dogs. Acta Orthopaedica 2006; 77 (5): 791–798

Bodine, R.L., Yanase, R.T. & Bodine, A. Forty years of experience with subperiosteal implant dentures in 41 edentulous patients. J Prosthet Dent. 1996 Jan;75(1):33-44.

Boggan RS, Strong JT, Misch CE, Bidez MW. Influence of hex geometry and prosthetic table width on static and fatigue strength of dental implants. J Prosthet Dent. 1999 Oct;82(4):436-40.

Bolind PK, Johansson CB, Becker W, Langer L, Sevetz EB Jr, Albrektsson TO. A descriptive study on retrieved non-threaded and threaded implant designs. Clin Oral Implants Res. 2005 Aug;16(4):447-55.

Bonfante EA, Granato R, Marin C, Suzuki M, Oliveira SR, Giro G, Coelho PG. Early bone healing and biomechanical fixation of dual acid-etched and As-machined implants with healing chambers: An experimental study in dogs. Int J Oral Maxillofac Implants. 2011 Jan-Feb;26(1):75-82.

Bosker H : The transmandibular implant, academic thesis, The Netherlands, 1986, University if Utrecht.

Brunski JB. In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface. Adv Dent Res. 1999 Jun;13:99-119.

Bumgardner JD, Boring JG, Cooper RC Jr, Gao C, Givaruangsawat S, Gilbert JA, Misch CM, Steflik DE. Preliminary evaluation of a new dental implant design in canine models. Implant Dent. 2000;9(3):252-60.

Büchter A, Joos U, Wiesmann HP, Seper L, Meyer U. Biological and biomechanical evaluation of interface reaction at conical screw-type implants. Head Face Med. 2006 Feb 21;2:5.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. J Biomed Mater Res. 1991 Jul;25(7):889-902.

Castaneda S, Largo R, Calvo E, Rodriguez-Salvanes F, Marcos ME, Diaz-Curiel M, Herrero-Beaumont G. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. Skeletal Radiol. 2006 35: 34-41

Chun, H.J., Cheong, S.Y., Han, J.H., Heo, S.J., Chung, J.P., Rhyu, I.C., Choi, Y.C., Baik, H.K., Ku, Y. & Kim, M.H. Evaluation of design parameters of osseointegrated dental implants using finite element analysis. Journal of Oral Rehabilitation. 2002, 29: 565–574.

Chung, S.H., Heo, S.J., Koak, J.Y., Kim, S.K., Lee, J.B., Han, J.S., Han, C.H., Rhyu, I.C. & Lee, S.J. Effects of implant geometry and surface treatment

on osseointegration after functional loading: a dog study. Journal of Oral Rehabilitation. 2008, 35: 229–236.

Coons AH, Creech HJ, Jones RN: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc Soc Exp Biol Med 1941,47:200–202,

Coons AH, Kaplan MH: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J Exp Med. 1950,91:1–13.

Coons AH, Leduc EH, Connolly JM: Studies on antibody production. I: A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. J Exp Med 1955, 102:49–60,

Cornelius von Wilmowsky, Sebastian Bauer, Stefanie Roedl. The diameter of anodic TiO2 nanotubes affects bone formation and correlates with the bone morphogenetic protein-2 expression in vivo. Article first published online: 28 Mar 2011.

Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I, Alobera-Gracia MA, del Canto Pingarron M, Jerez LB. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006, 11: E47-E51

Frost, H.M. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (satmu): edefining Wolff's law: the bone modeling problem. Anatomical Record .1990, 226: 403–413.

Geng, J.P., Ma, Q.S., Xu, W., Tan, K.B. & Liu, G.R. Finite element analysis of four threadform configurations in a stepped screw implant. Journal of Oral Rehabilitation. 2004, 31: 233–239

Goiato MC, dos Santos DM, Monteiro DR Joint sounds in complete denture wearers. Literature review. N Y State Dent J. 2010 Jan;76(1):46-9.

Goldberg N.I. & Gershkoff A. The implant lower denture. Dental Digest.1949, 55:490-495

Goldner J. A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes.

Goodacre, C.J., Bernal, G., Rungcharassaeng, K. & Kan, J.Y. Clinical complications with implants and implant prostheses. Journal of Prosthetic Dentistry. 2003, 90: 121–132.

Gruber H. Adaptations of Goldner's Masson Trichrome Stain for the Study of Undecalcified Plastic Embedded Bone. Biotech. Histochem. 1992,(67):30-34.

Hansson, S. &Werke,M. The implant thread as a retention element in cortical bone: The effect of thread size and thread profile: a finite element study. Journal of Biomechanics.2003, 36: 1247–1258

Hazzard DG, Bronson RT, McClearn GE, Strong R Selection of an appropriate animal model to study aging processes with special emphasis on the use of rat strains. J Gerontol. 1992, 47: B63-B64.

Heba Abuhussein,Giorgio Pagni ,Alberto Rebaudi, Hom-Lay Wang, The effect of thread pattern upon implant osseointegration ,Clin. Oral Impl. Res. 21, 2010; 129–136

International Standard ISO 10993-6 (1994) Biological evaluation of medical devices - Part 6. 1-11.

Kim SW, Kwon YH, Chung JH, Shin SI, Herr Y. The effect of Er:YAG laser irradiation on the surface microstructure and roughness of Hydroxyapatite-coated implant. J Periodontal Implant Sci. 2010 Dec;40(6):276-82.

Kong, L., Liu, B.L., Hu, K.J., Li, D.H., Song, Y.L., Ma, P. & Yang, J. optimized thread pitch design and stress analysis of the cylinder screwed dental implant. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2006, 24: 509–512–515.

Kragstrup J, Richards A, Fejerskov O Effects of fluoride on cortical bone remodeling in the growing domestic pig. Bone .1989, 10: 421-424.

Kung S., Devlin H. The osteoinductive effect of chitosan-collagen composites around pure titanium implant surfaces in rats. J Periodontal Res. 2011 Feb;46(1):126-33.

Laiblin C, Jaeschke G Klinisch-chemische Untersuchungen des Knochen- und Muskelstoffwechsels unter Belastung bein Göttinger Miniaturschwein – eine experimentelle Studie ,Berl Münch Tierärztl Wschr. 1979;92: 124

Lemons, J. Biomaterials in Implant Dentistry Contemporary Implant Dentistry. St Louis: Mosby. 1993

Liebschner MA Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. Biomaterials. 2004;25: 1697-1714

Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Osteocalcin gene promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. J Cell Biochem Suppl. 1998;30-31:62-72

Ma, P., Liu, H.C., Li, D.H., Lin, S., Shi, Z. & Peng, Q.J. influence of helix angle and density on primary stability of immediately loaded dental implants: Three-dimensional finite element analysis. Zhonghua Kou

Qiang Yi Xue Za Zhi. 2007; 42: 618–62

Masson PJ. Some histological methods: trichrome stainings and their preliminary technique. Tech Methods 1929; 12:75-90.

Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R Sheep model in orthopedic research: a literature review. Comp Med. 2001; 51: 292-299

McCarthy DJ, Herzberg AJ, Saunders MM. The morphogenesis of common osseous pedal lesions. Part I: Scanning electron microscopic analysis. J Am Podiatry Assoc. 1983 Oct;73(10):497-509.

Misch, C.E., Bidez, M.W. & Sharawy, M. A bioengineered implant for a predetermined bone cellular response to loading forces. A literature review and case report. Journal of Periodontology. 2001; 72: 1276–1286

Misch, C. Contemporary Implant Dentistry. St Louis, MI: Elsevier. 2008

Nafei A, Danielsen CC, Linde F, Hvid I Properties of growing trabecular ovine bone. Part I: Mechanical and physical properties. J Bone Joint Surg Br. 2000; 82: 910-920.

Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. Iowa Orthop J. 1998; 18: 118-123.

Newman E, Turner AS, Wark JD The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. Bone. 1995; 16: 277S-284S

Pierce AM, Lindskog S, Hammarström L. Osteoclasts: structure and function. Electron Microsc Rev. 1991;4(1):1-45.

Prendergast, P.J. & Huiskes, R. Microdamage and osteocyte-lacuna strain in bone: amicrostructural finite element analysis. Journal of Biomechanical Engineering. 1996; 118: 240–246

Puleo D.A.,Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. Biomaterials. 1999; 20: 2311-21

Ramos-Vara J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. Vet Pathol. 2005; 42: 405-426

Robert Schenk, Buser. Healing Pattern of Bone Regeneration in Membrane-Protected Defects: A Histologic Study in the Canine Mandible. T Int J Oral Maxillofac Implants. 1994; Jan-Feb;9(1):13-29.

Schmidt C, Ignatius AA, Claes LE Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. J Biomed Mater Res. 2001; 54: 209-215.

Schimandle JH, Boden SD Spine update. The use of animal models to study spinal fusion. Spine. 1994; 19:1998-2006

Schlegel K, Thorwarth M, Plesinac A, Rupprecht S. Expression of bone matrix proteins during the osseus healing of topical conditioned implants: an experimental study, Clin. Oral Impl. Res. 2006; 17:666-672

Schwarz F, Herten M, Sager M, Wieland M, Dard M, Becker J. Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLAs titanium implants: preliminary results of a pilot study in dogs. Clin. Oral Impl. Res. 2007; 18: 481–488

Stadlinger, B.; Hennig, M.; Eckelt, U.; Kuhlisch, E.; Mai, R. Comparison of zirconia and titanium implants after a short healing period. A pilot study in minipig. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2010; 39: 585–592

Stadlinger B, Bierbaum S, Grimmer S. Increased bone formation around coated implants. J Clin Periodontol. 2009; Aug;36(8):698-704.

Steflik DE, McKinney RV, Sisk AL, Parr GR, Koth DL. Scanning electron microscopic studies of the oral tissue responses to dental implants. Scanning Microsc. 1990; Dec;4(4):1021-37

Taylor CR, Shi S-R, Barr NJ, Wu N: Techniques of immunohistochemistry:

principles, pitfalls, and standardization. In: Diagnostic Immunohistochemistry, ed. Dabbs DJ, pp. 3–43. Churchill Livingstone, New York, NY, 2002

Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticular hydroxyapatite. J Oral Maxillofac Surg. 2005; 63: 1626-1633.

Traini T, Neugebauer J, Thams U, Zöller JE, Caputi S, Piattelli A.i. Peri-Implant Bone Organization under Immediate Loading Conditions: Collagen Fiber Orientation and Mineral Density Analyses in the Minipig Model. Clinical Implant Dentistry and Related Research, Volume 11, Number 1, 2009 Mar;11(1):41-51.

Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM (An interspecies comparison of bone fracture properties. Biomed Mater Eng. 1998; 8: 1-9.

Wolff, J.(1892) The laws of bone remodeling. Berlin: Springer

表 2-1 甲基丙烯酸甲酯(methyl methacrylate)混和溶液配置方法 (100 ml)

1.	Methyl methacrylate	60 ml
2.	Butyl methacrylate	35 ml
3.	Methyl benzoate	5 ml
4.	Polyrthylene glycol 400	1.2 ml

表 2-2 Weigert’s 蘇木紫溶液配置方法

溶液 A

Hematoxylin	1 gm
Ethanol	100 ml

溶液 B

Ferric Chloride 29%	4 ml
Distilled Water	95 ml
HCl	1 ml

使用時將溶液 A 及溶液 B 等量混和

表 2-3 Vectastain ABC Kit (PK-4002) 配置法

Normal Serum	3 滴於 10ml PBS
Biotinylared 2nd antibody	2 滴於 10ml PBS
Vectastain ABC Reagent	Reagent A 4 滴+ Reagent B 4 滴於 10ml PBS
	*Reagent 使用前 30 分鐘配置

表 2-4 DAB kit 配置法

DAB chromogen	20ul
DAB substrate	1ml

表 3-1 方型螺紋與梯型螺紋於 8 週在掃描式電子顯微鏡下之比較

螺紋間距	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6
方型螺紋	24.8 ± 9.8%	40.9 ± 10.3%	36.8 ± 8.9%	33.1 ± 14.2%	25.1 ± 17.4%
梯形螺紋	45.8 ± 15.0%	59.2 ± 7.8%	64.7 ± 13.6%	48.3 ± 12.0%	35.9 ± 7.6%
P	0.01	0.003	0.001	0.04	0.09

表 3-2 方型螺紋與梯型螺紋於 8 週在 Masson Goldner 染色下之比較

螺紋間距	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6
方型螺紋	24.4 ± 13.6%	24.4 ± 15.7%	33.6 ± 13.6%	25.2 ± 18.0%	14.3 ± 10.9%
梯形螺紋	41.5 ± 10.3%	46.9 ± 15.1%	53.1 ± 8.4%	62.8 ± 7.5%	37.0 ± 13.3%
P	0.07	0.07	0.04	0.001	0.006

表 3-3 方型螺紋與梯型螺紋於 16 週在掃描式電子顯微鏡下之比較

螺紋間距	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6
方型螺紋	32.4 ± 18.0%	35.2 ± 6.6%	58.9 ± 19.4%	42.6 ± 18.4%	38.0 ± 9.5%
梯形螺紋	45.6 ± 7.3%	53.9 ± 15.3%	61.9 ± 9.1%	69.2 ± 4.4%	61.4 ± 8.9%
P	0.1	0.01	0.37	0.02	0.03

表 3-4 方型螺紋與梯型螺紋於 16 週在 Masson Goldner 染色下之比較

螺紋間距	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6
方型螺紋	37.2 ± 7.2%	44.1 ± 14.6%	55.4 ± 18.8%	40.1 ± 12.5%	34.5 ± 9.5%
梯形螺紋	44.7 ± 13.5%	45.8 ± 13.4%	53.4 ± 8.5%	64.1 ± 10.8%	42.3 ± 11.7%
P	0.1	0.4	0.4	0.0009	0.09

表 3-5 方型螺紋在掃描式電子顯微鏡下 8 週與 16 週之比較

螺紋間距	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6
8 週	24.8 ± 9.8%	40.9 ± 10.3%	36.8 ± 8.9%	33.1 ± 14.2%	25.1 ± 17.4%
16 週	32.4 ± 18.0%	35.2 ± 6.6%	58.9 ± 19.4%	42.6 ± 18.4%	38.0 ± 9.5%
P	0.25	0.07	0.01	0.23	0.17

表 3-6 方型螺紋在 Masson Goldner 染色下 8 週與 16 週之比較

螺紋間距	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6
8 週	24.4 ± 13.6%	24.4 ± 15.7%	33.6 ± 13.6%	25.2 ± 18.0%	14.3 ± 10.9%
16 週	37.2 ± 7.2%	44.1 ± 14.6%	55.4 ± 18.8%	40.1 ± 12.5%	34.5 ± 9.5%
P	0.02	0.02	0.02	0.06	0.002

表 3-7 梯型螺紋在掃描式電子顯微鏡下 8 週與 16 週之比較

螺紋間距	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6
8 週	45.8 ± 15.0%	59.2 ± 7.8%	64.7 ± 13.6%	48.3 ± 12.0%	35.9 ± 7.6%
16 週	45.6 ± 7.3%	53.9 ± 15.3%	61.9 ± 9.1%	69.2 ± 4.4%	61.4 ± 8.9%
P	0.49	0.23	0.36	0.002	0.03

表 3-8 梯型螺紋在 Masson Goldner 染色下 8 週與 16 週之比較

螺紋間距	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6
8 週	41.5 ± 10.3%	46.9 ± 15.1%	53.1 ± 8.4%	62.8 ± 7.5%	37.0 ± 13.3%
16 週	44.7 ± 13.5%	45.8 ± 13.4%	53.4 ± 8.5%	64.1 ± 10.8%	42.3 ± 11.7%
P	0.33	0.45	0.47	0.41	0.23

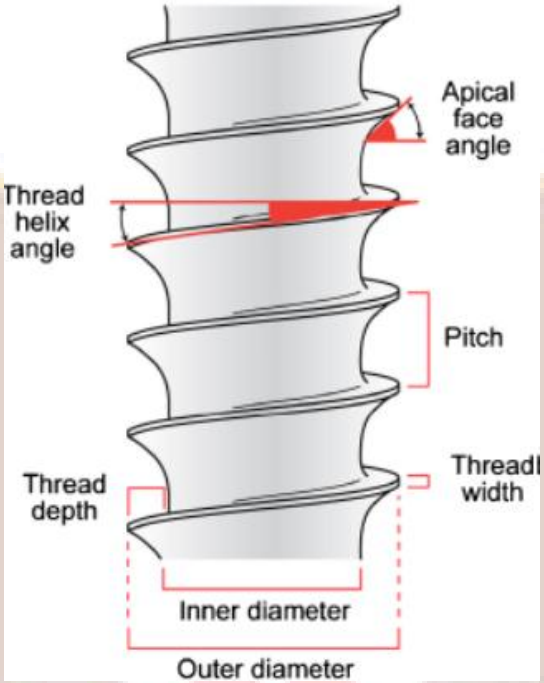


圖 1-1 牙科植體螺紋巨觀設計之影響因子（Adapted from Heba Abuhussein. The effect of thread pattern upon implant osseointegration. Clin. Oral Impl. Res. 21, 2010; 129－136.）

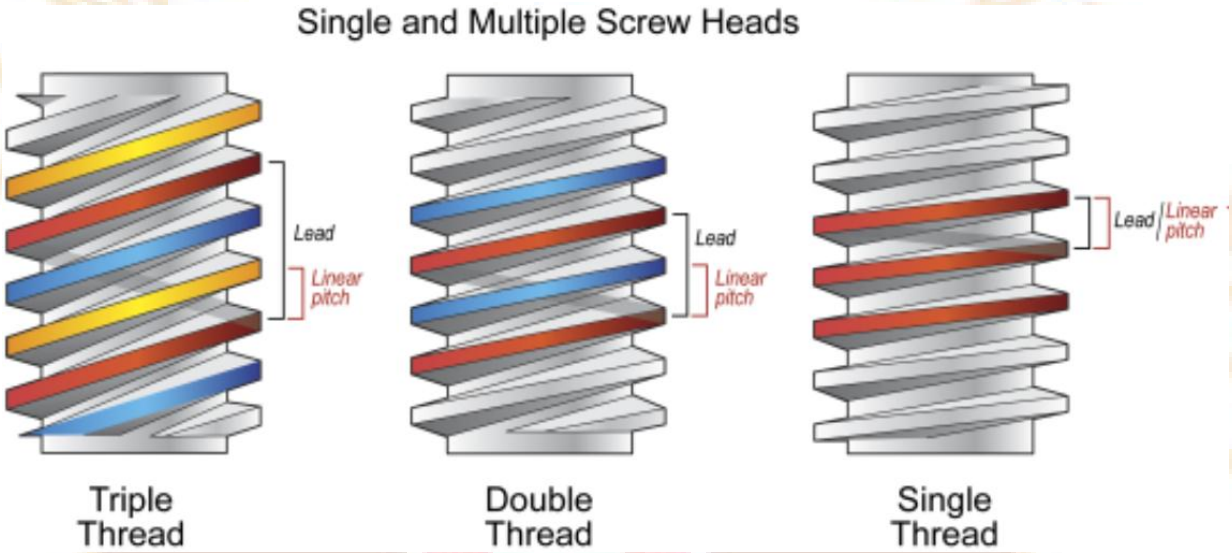


圖 1-2 導程及螺紋間距之關係（Adapted from Heba Abuhussein. The effect of thread pattern upon implant osseointegration. Clin. Oral Impl. Res. 21, 2010; 129－136.）

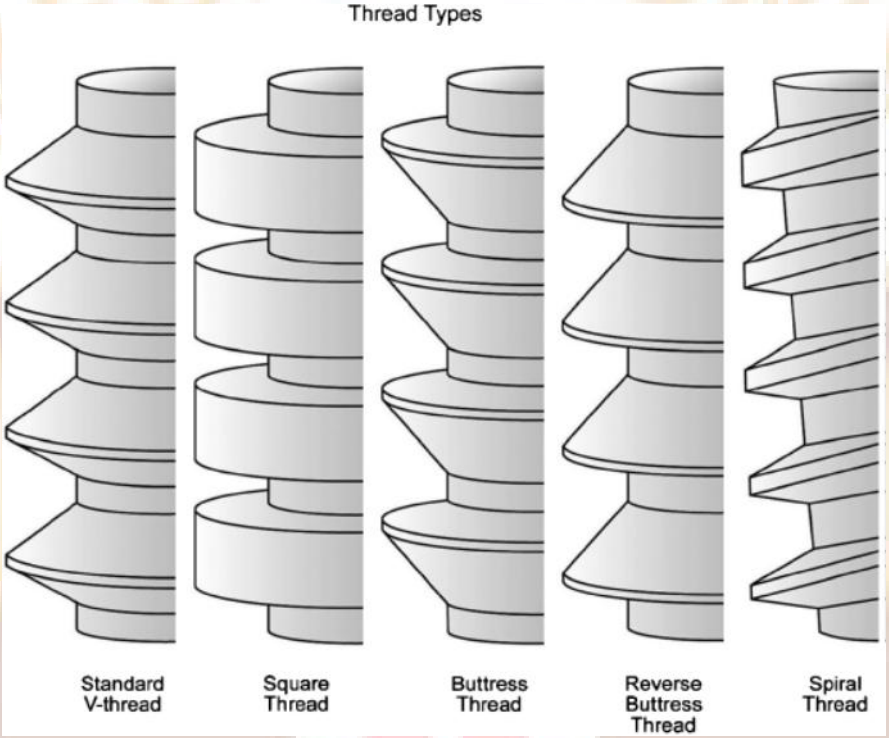


圖 1-3 目前常見之螺紋外型設計 (Adapted from Heba Abuhussein. The effect of thread pattern upon implant osseointegration. Clin. Oral Impl. Res. 21, 2010; 129－136.)

Summary of four key attributes in terms of similarity between animal and human bone.

	Canine	Sheep/Goat	Pig	Rabbit
Macrostructure	++	+++	++	+
Microstructure	++	+	++	+
Bone Composition	+++	++	+++	++
Bone Remodelling	++	++	+++	+

+ least similar, ++ moderately similar, +++ most similar.

圖 1-4 目前骨組織動物實驗常使用之對象-狗、羊、豬、兔，與人骨組織相似度比較（Adapted from AI Pearce. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. European Cells and Materials Vol. 13. 2007. Page:1-10 ）

圖 2-1 四個月豬齡之蘭嶼迷你豬

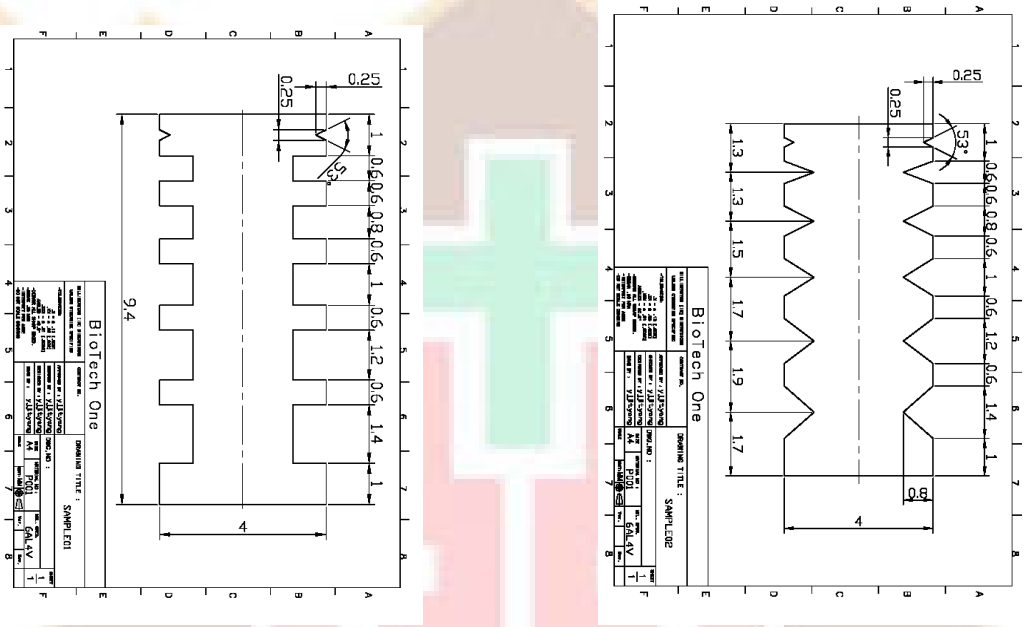


圖 2-2 植體工程設計圖，(左)方形螺紋，(右)梯形螺紋。

圖 2-3 植體實體影像（左)方型螺紋，(右)梯形螺紋。

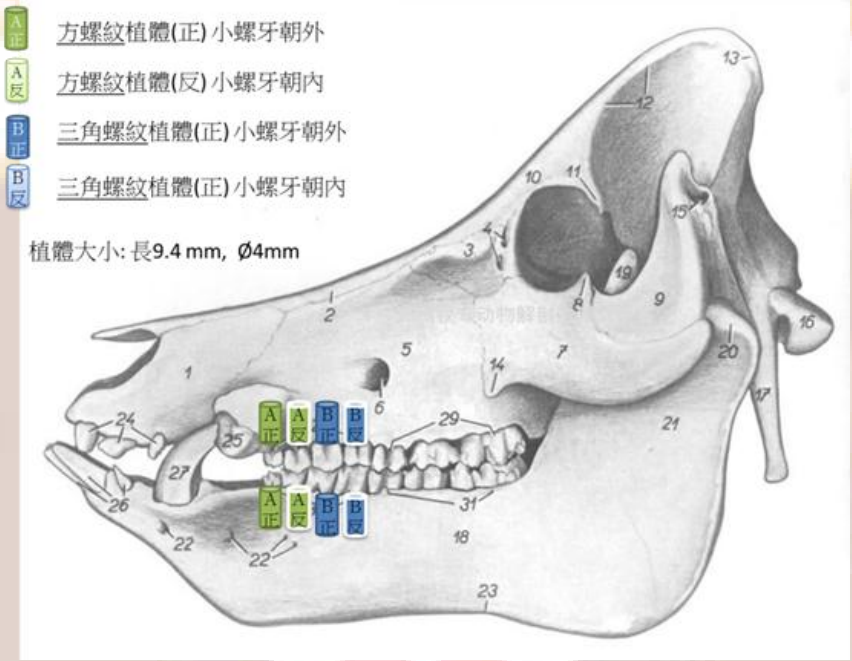


圖 2-4 蘭嶼迷你豬植體放置位置圖

圖 2-5 ALLEID TechCut 4 鑽石切割機

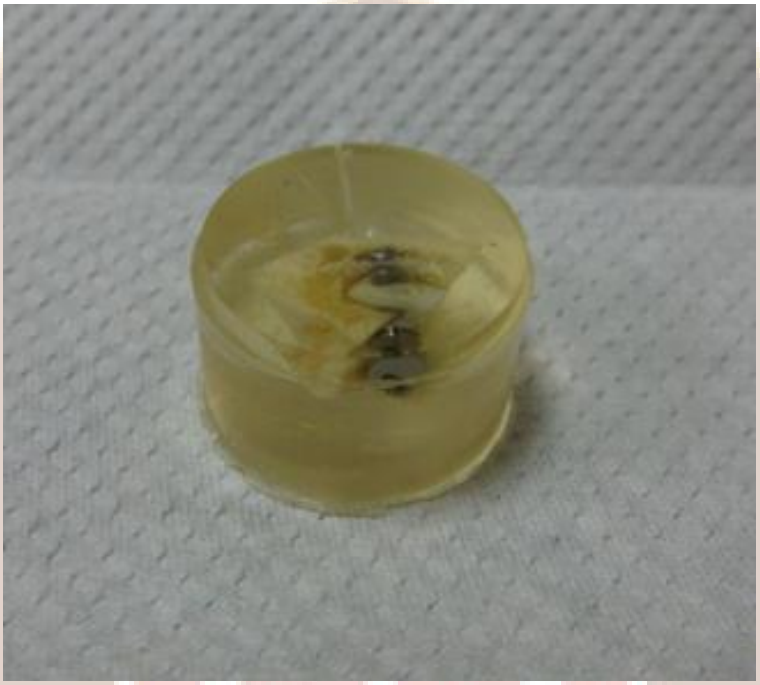


圖 2-6 聚合完成之樹脂標本

圖 2-7 砂紙研磨機

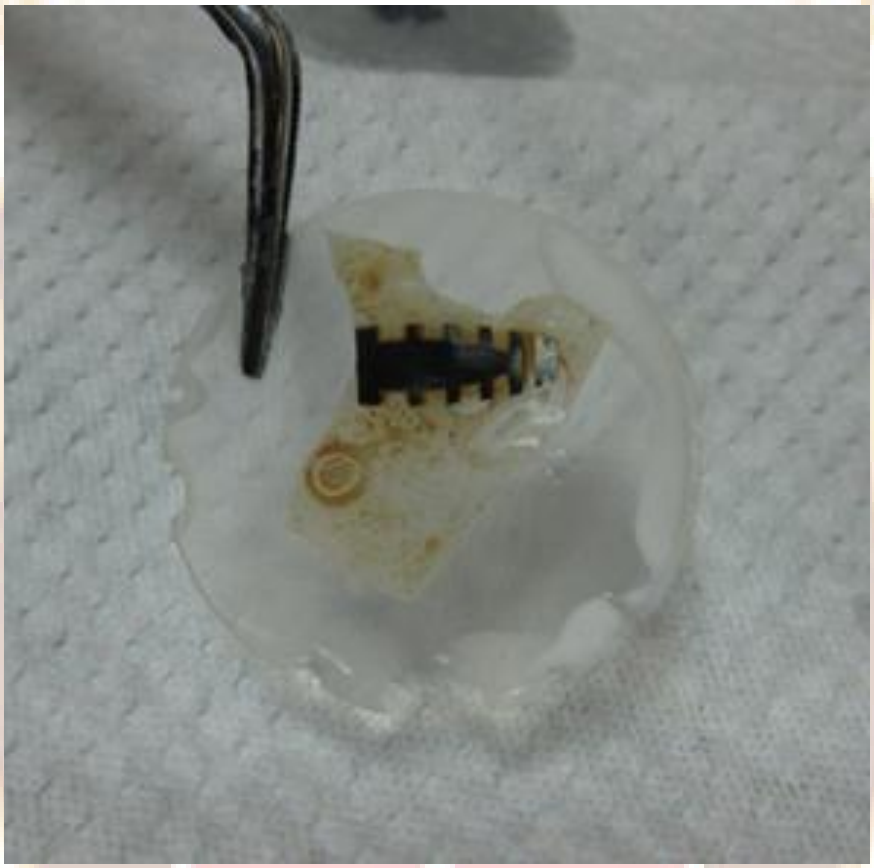


圖 2-8 製備完成之樹脂標本

圖 2-9 經 Masson Goldner 染色完成之樹脂標本

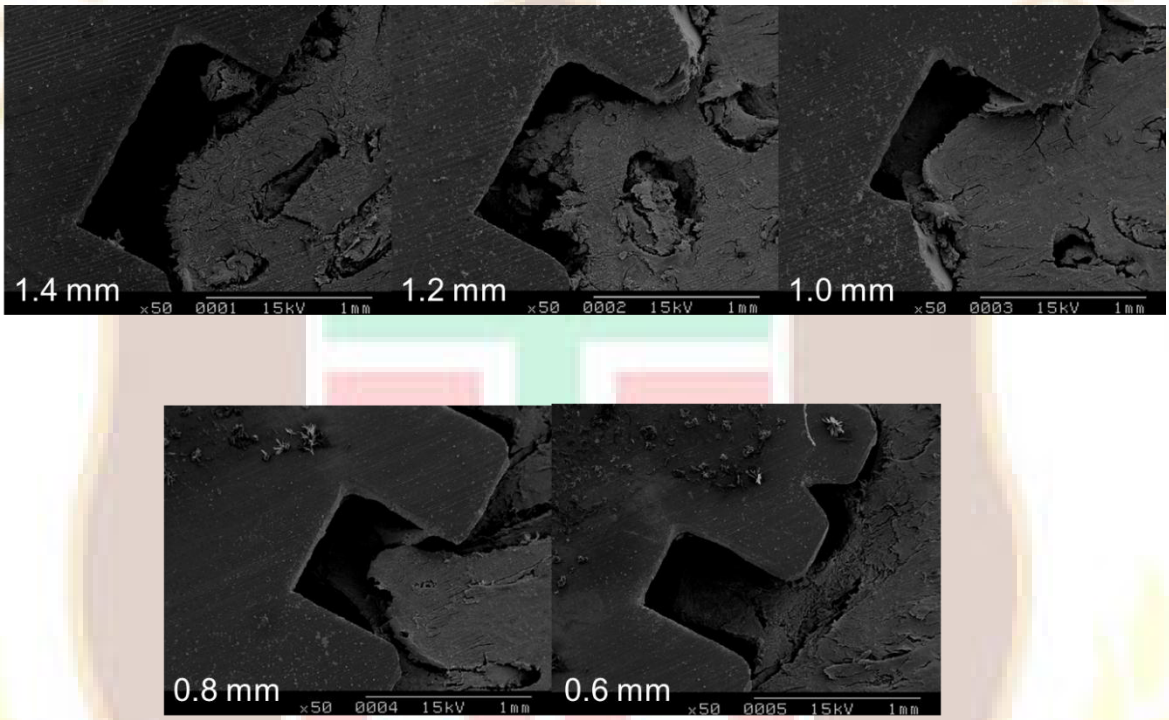


圖 3-1　8 週之方型螺紋於 50 倍下之掃描式電子顯微鏡影像

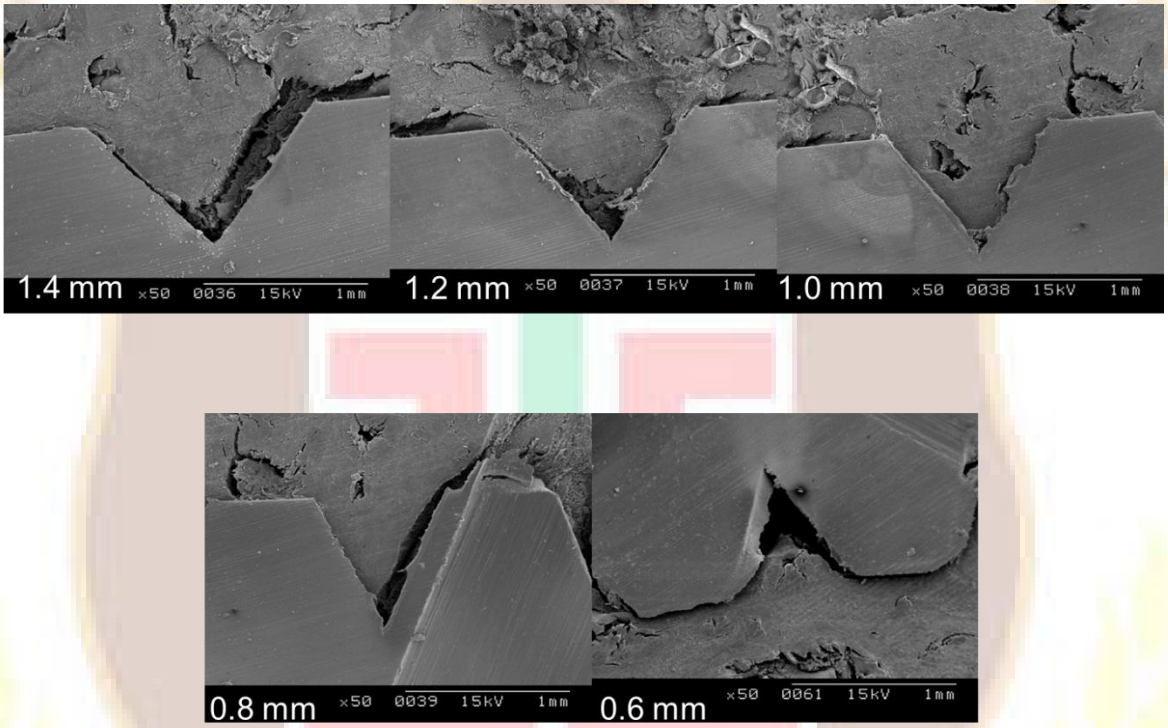


圖 3-2　8 週之梯型螺紋於 50 倍下之掃描式電子顯微鏡影像

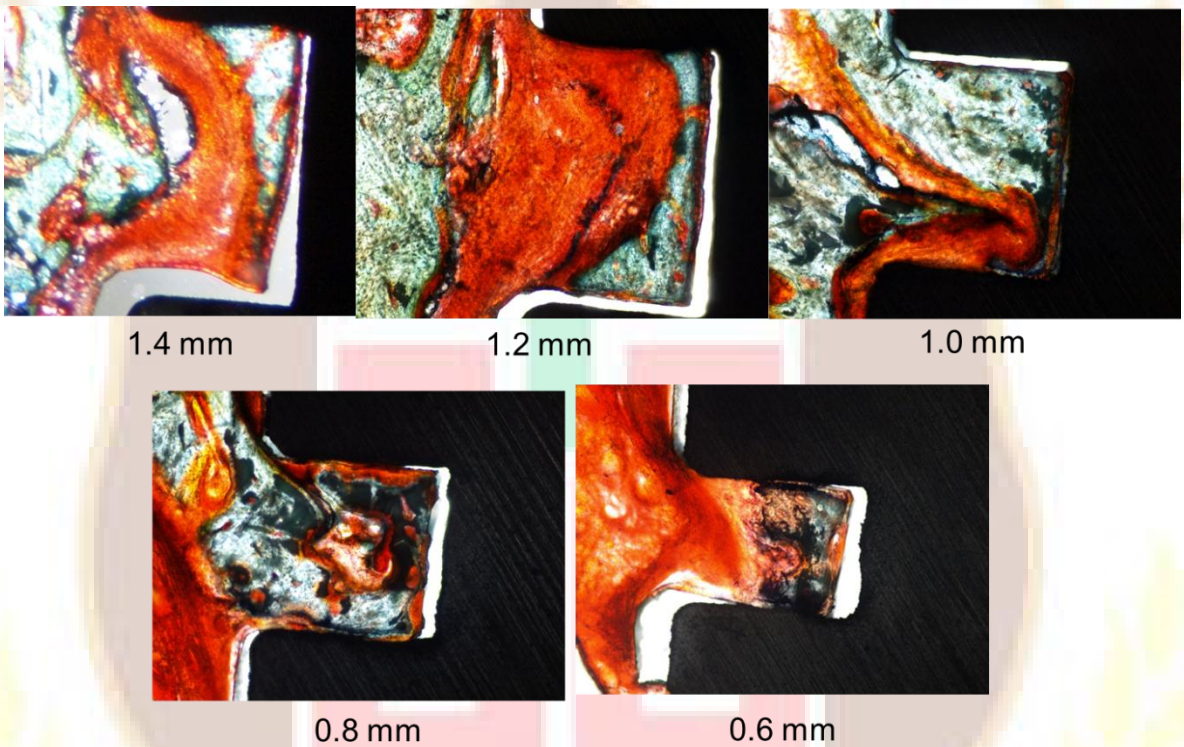


圖 3-3　8 週之方型螺紋於 Masson Goldner 染色下 10 倍之影像

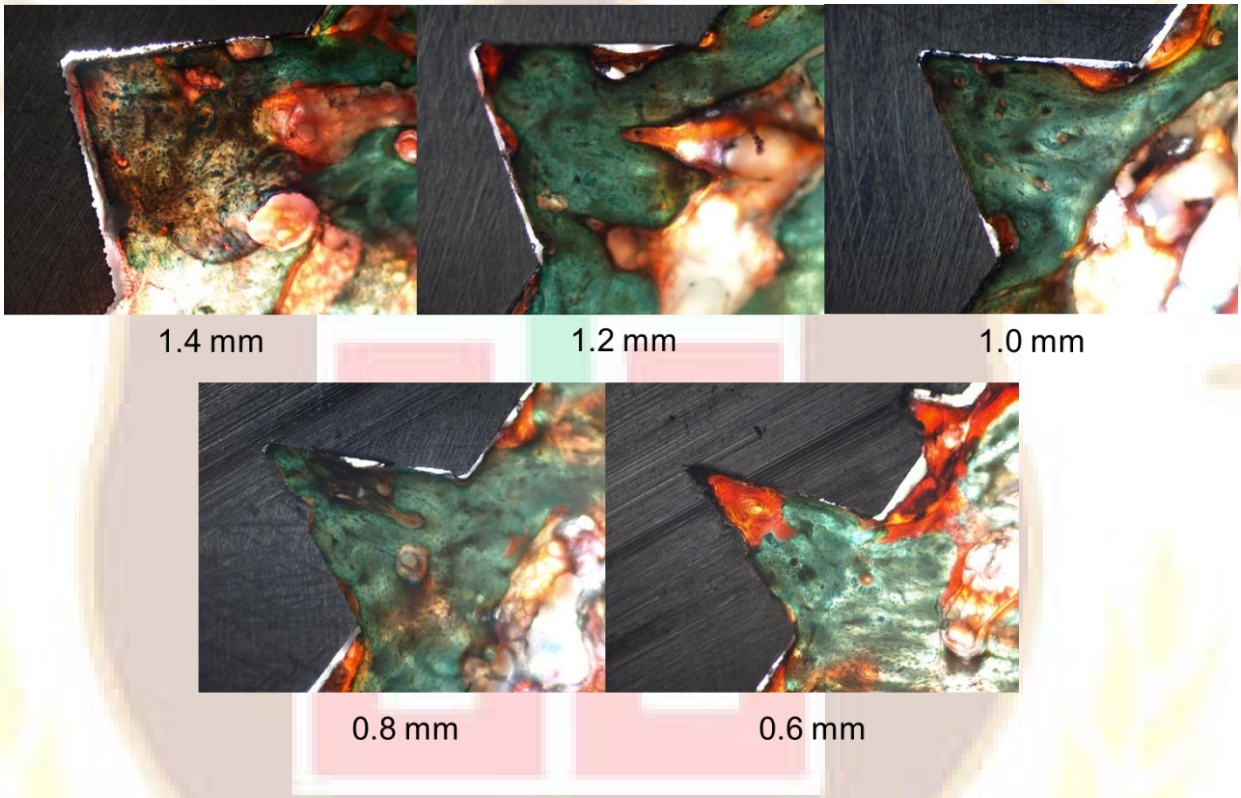


圖 3-4　8 週之梯型螺紋於 Masson Goldner 染色下 100 倍之影像

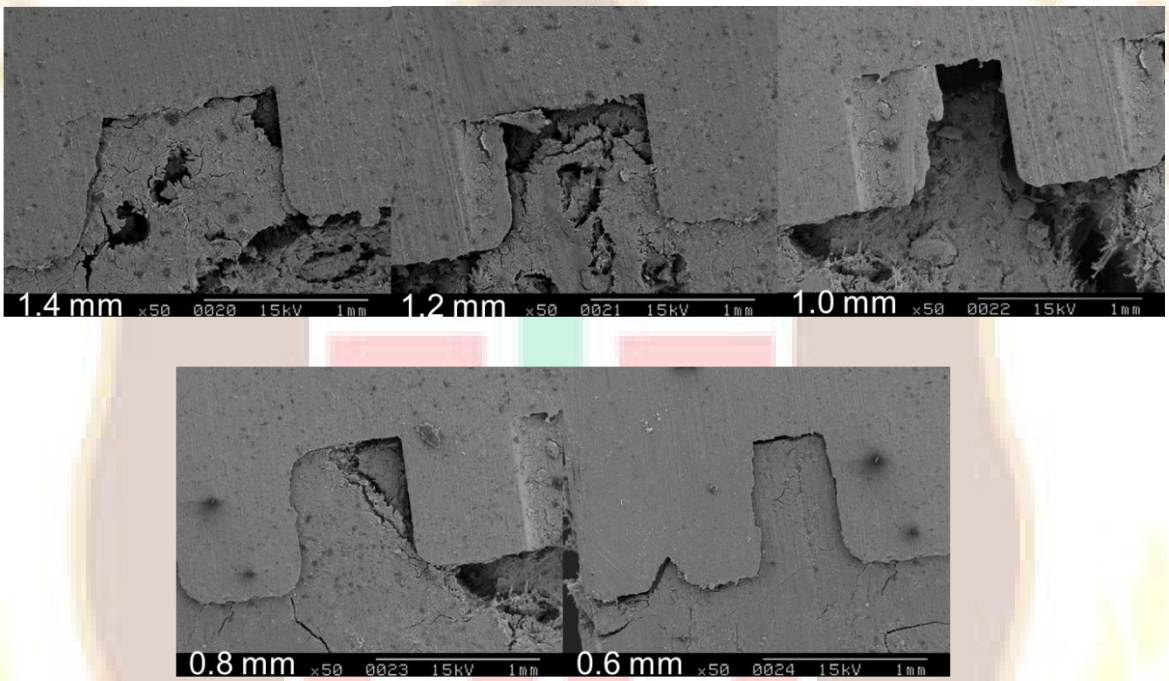


圖 3-5　16 週之方型螺紋於 50 倍下之掃描式電子顯微鏡影像

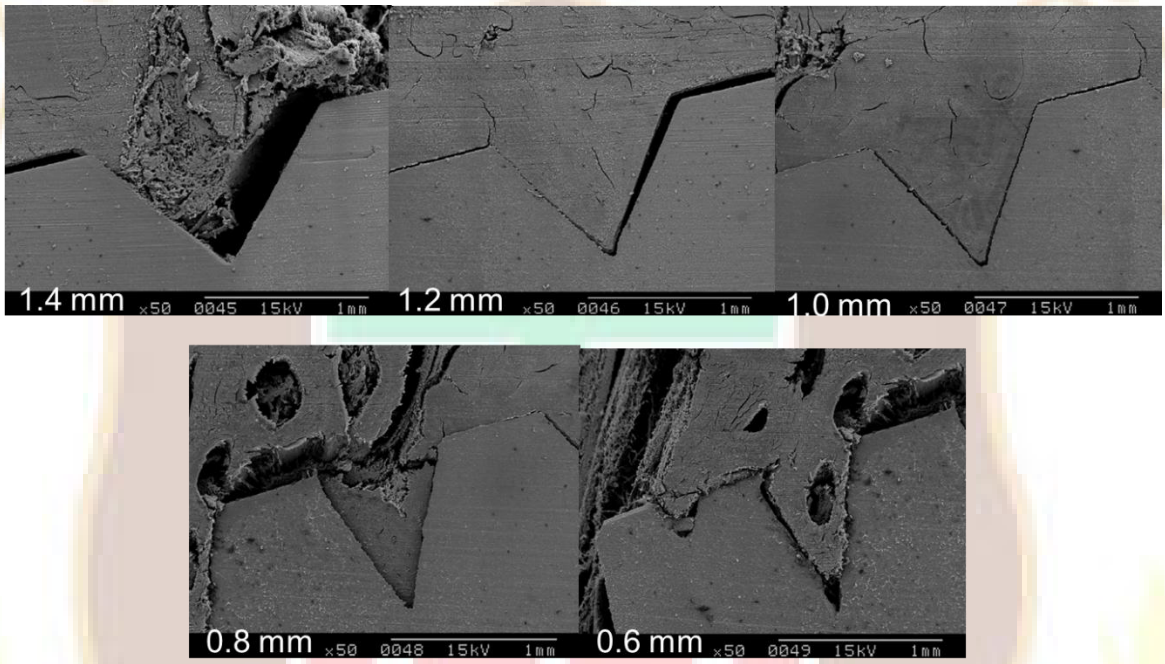


圖 3-6　16 週之梯型螺紋於 50 倍下之掃描式電子顯微鏡影像

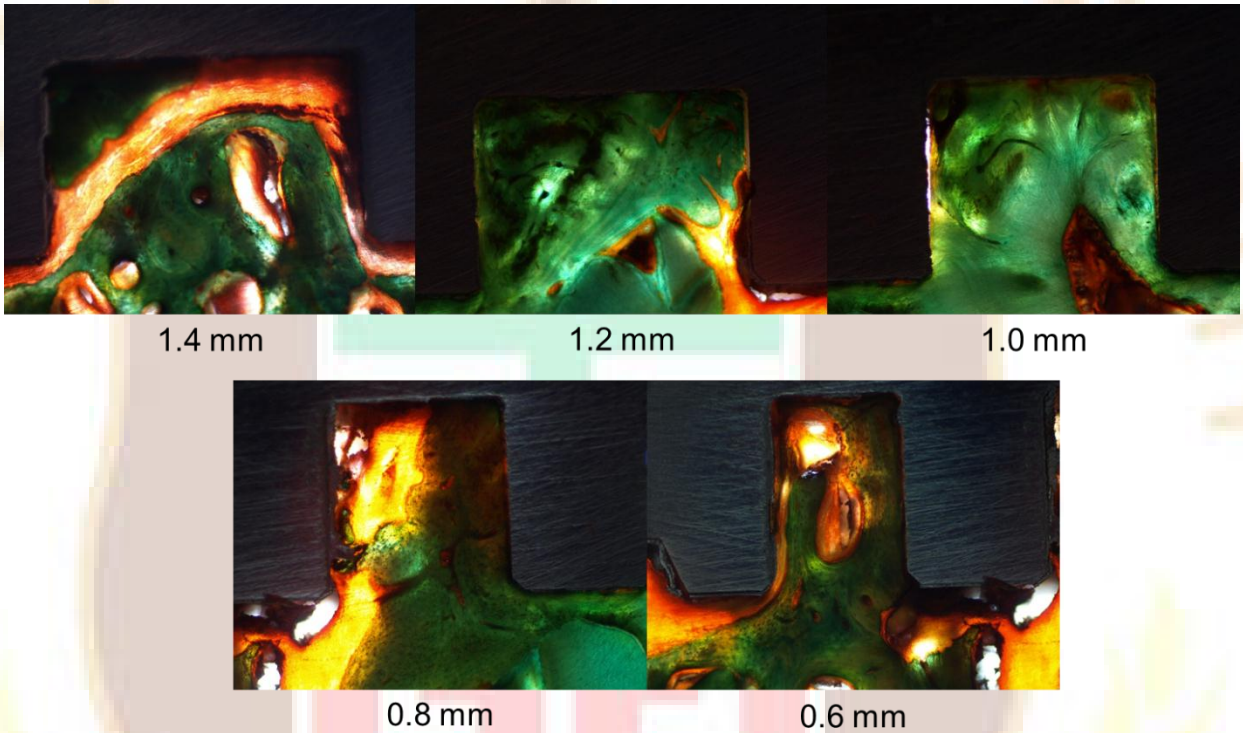


圖 3-7　16 週之方型螺紋於 Masson Goldner 染色下 100 倍之影像

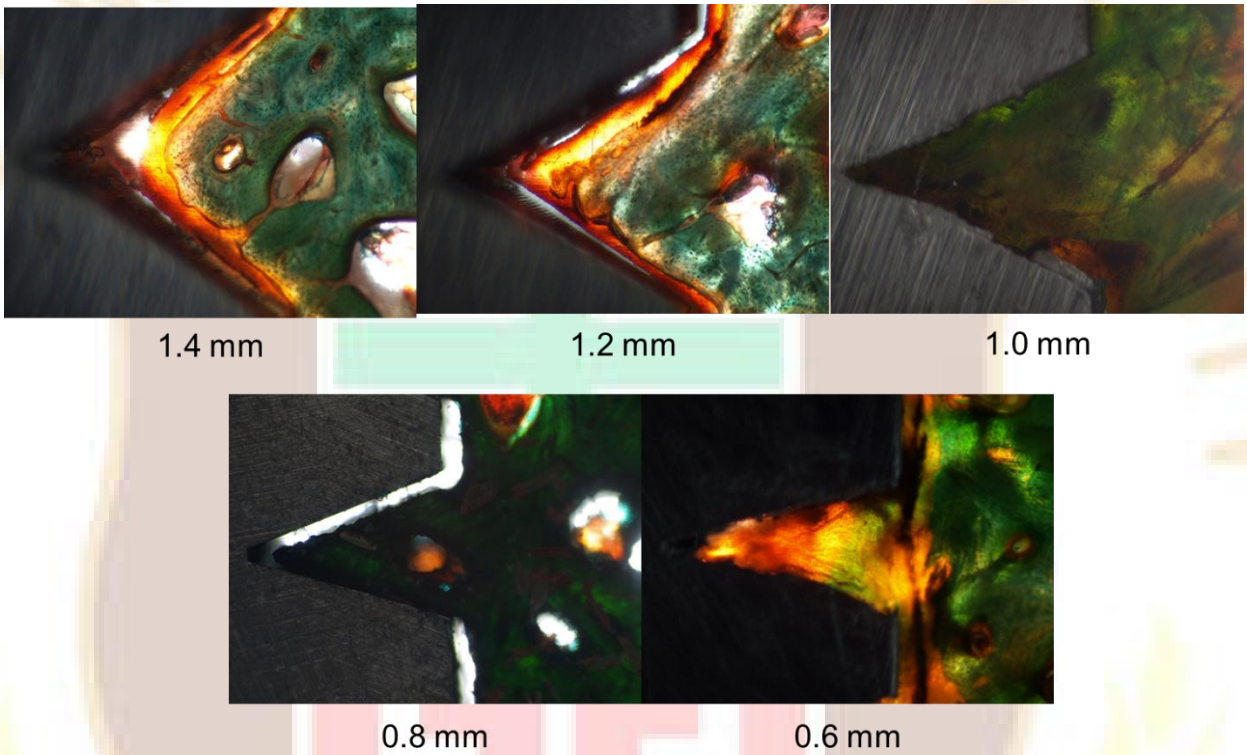


圖 3-8　16 週之梯型螺紋於 Masson Goldner 染色下 100 倍之影像

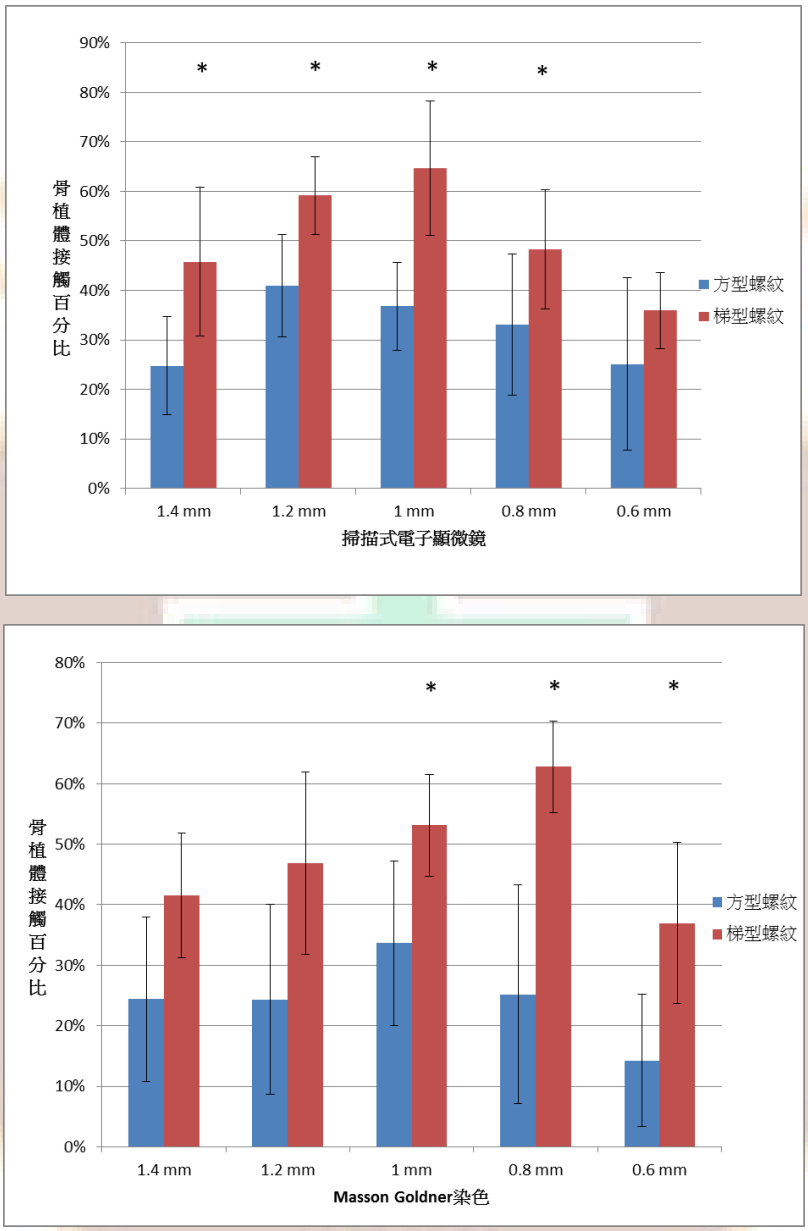


圖 3-9　8 週之方型螺紋及梯型螺紋植體於掃描式電子顯微鏡(上圖)及 Masson Goldner 染色(下圖)骨植體接觸百分比之結果

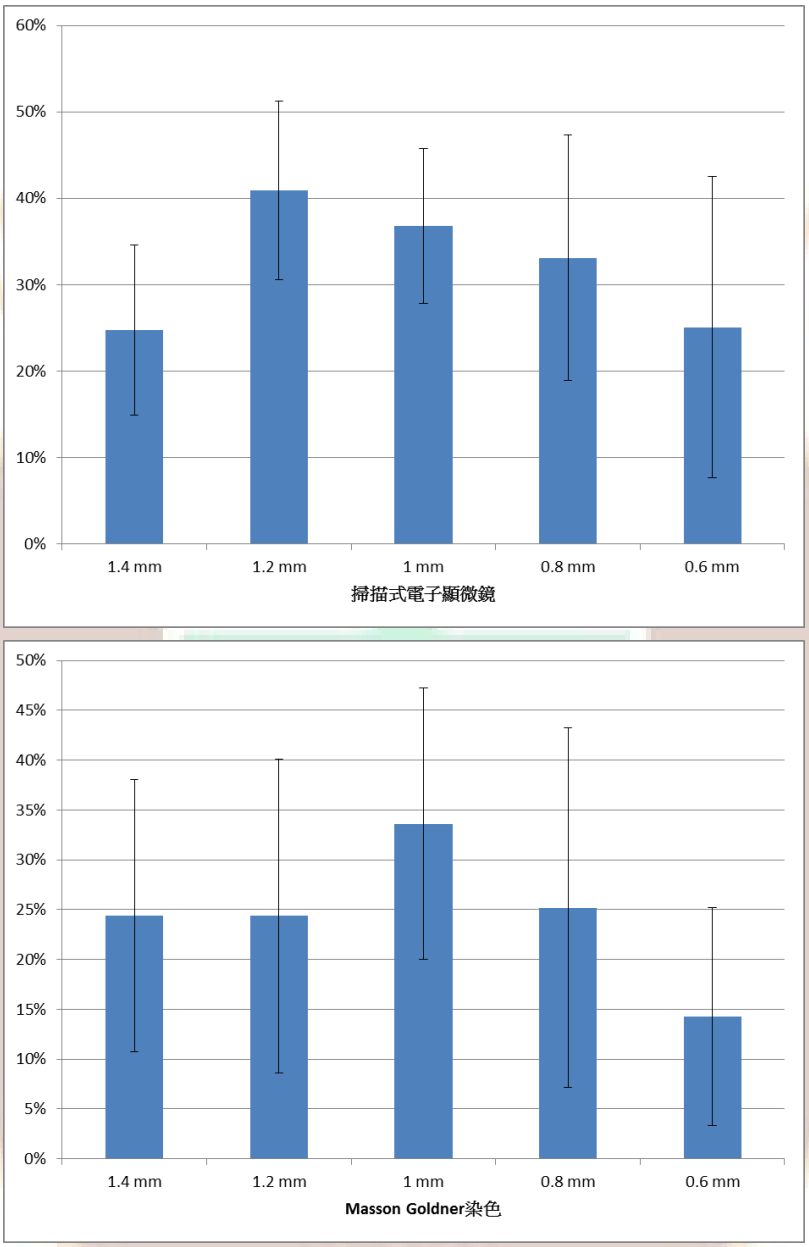


圖 3-10 方型螺紋於 8 週下，在掃描式電子顯微鏡(上圖)及 Masson Goldner 染色(下圖)之各螺紋間距間對骨植體接觸百分比之差異

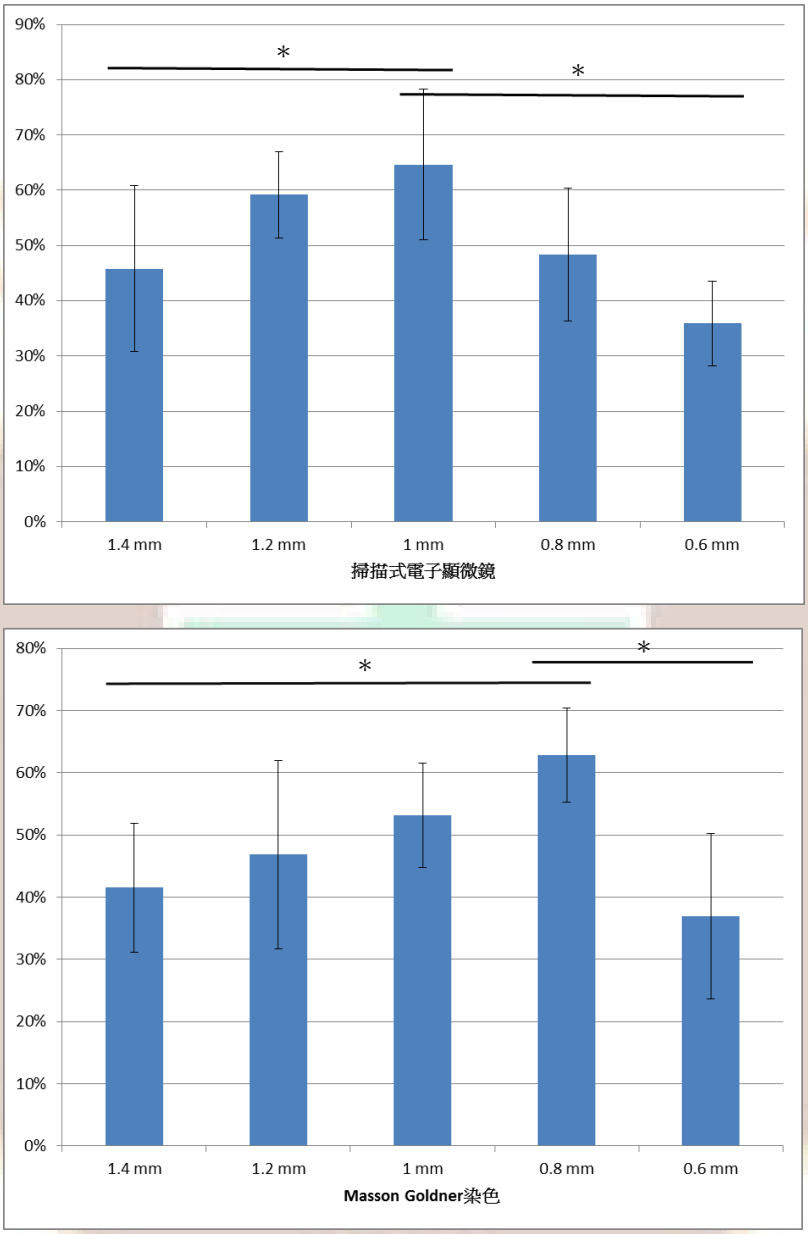


圖 3-11 梯型螺紋於 8 週下，在掃描式電子顯微鏡(上圖)及 Masson Goldner 染色(下圖)之各螺紋間距間對骨植體接觸百分比之差異

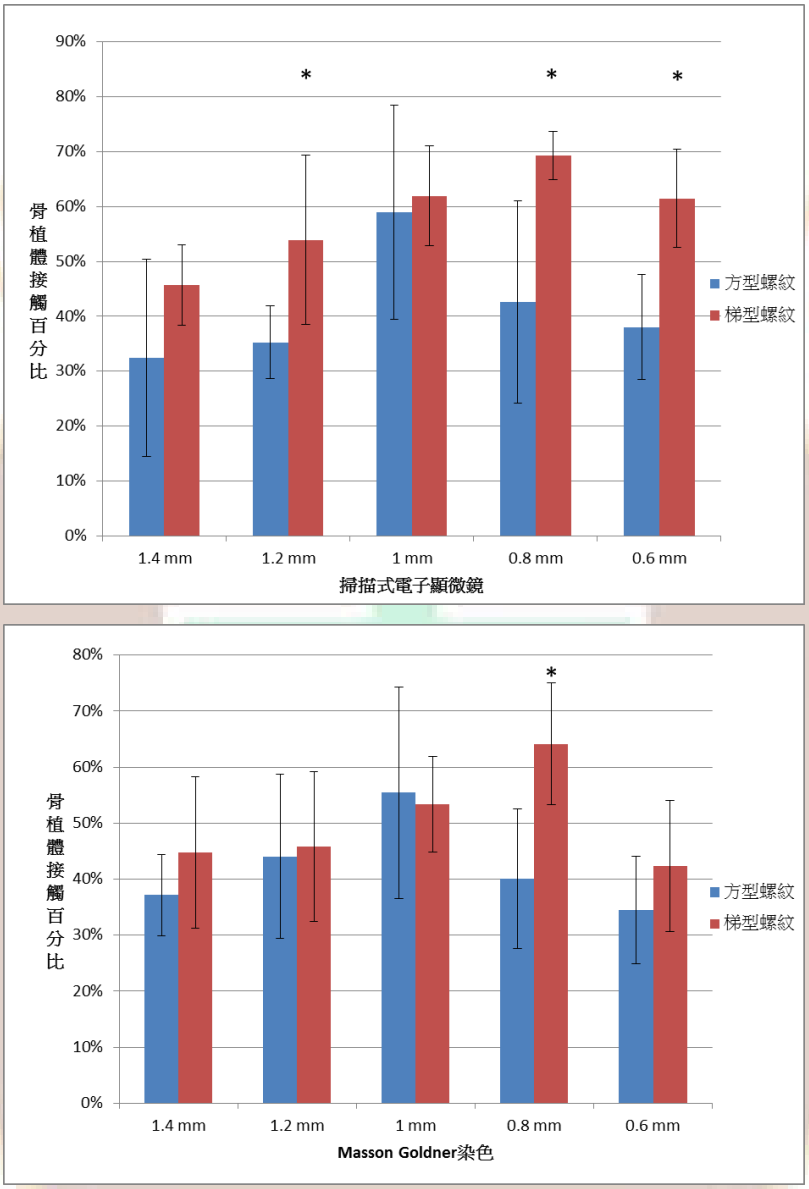


圖 3-12　16 週之方型螺紋及梯型螺紋植體於掃描式電子顯微鏡(上圖)及 Masson Goldner 染色(下圖)之骨植體接觸百分比之結果

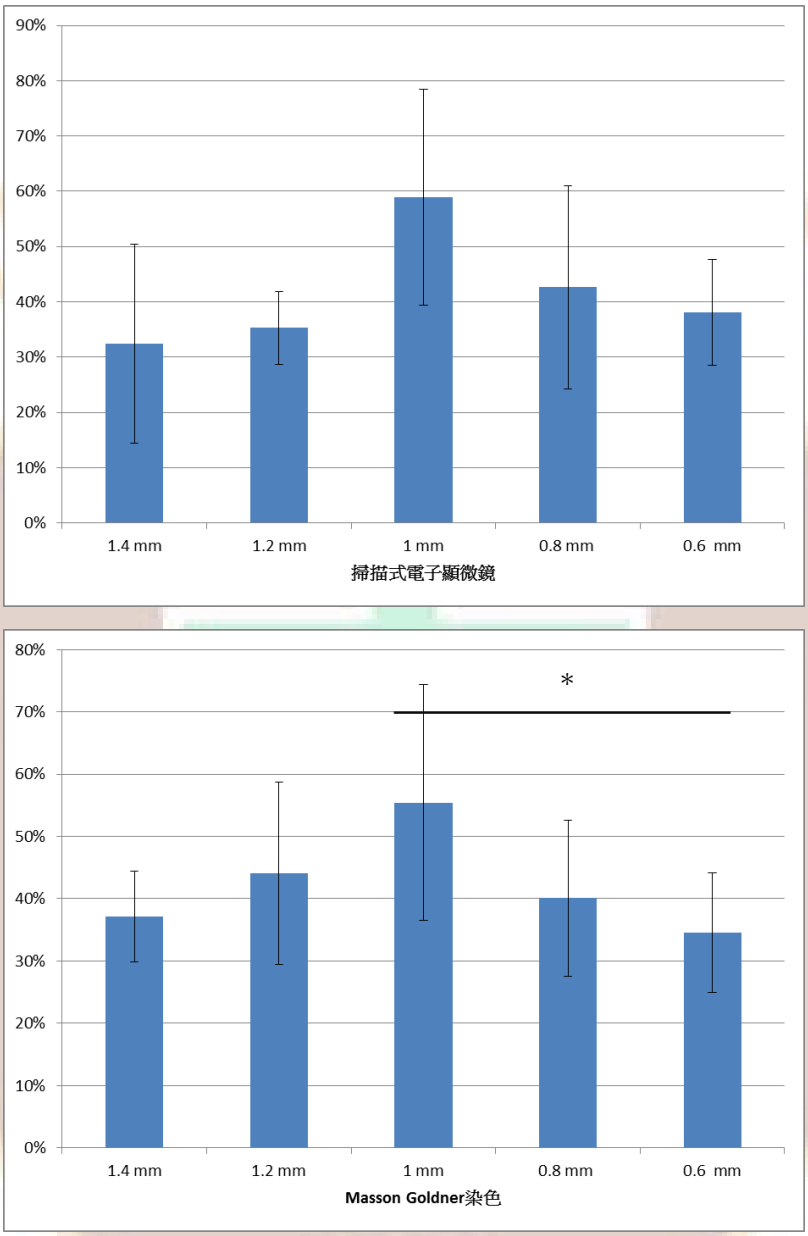


圖 3-13 方型螺紋於 16 週下，在掃描式電子顯微鏡(上圖)及 Masson Goldner 染色(下圖)之各螺紋間距間對骨植體接觸百分比之差異

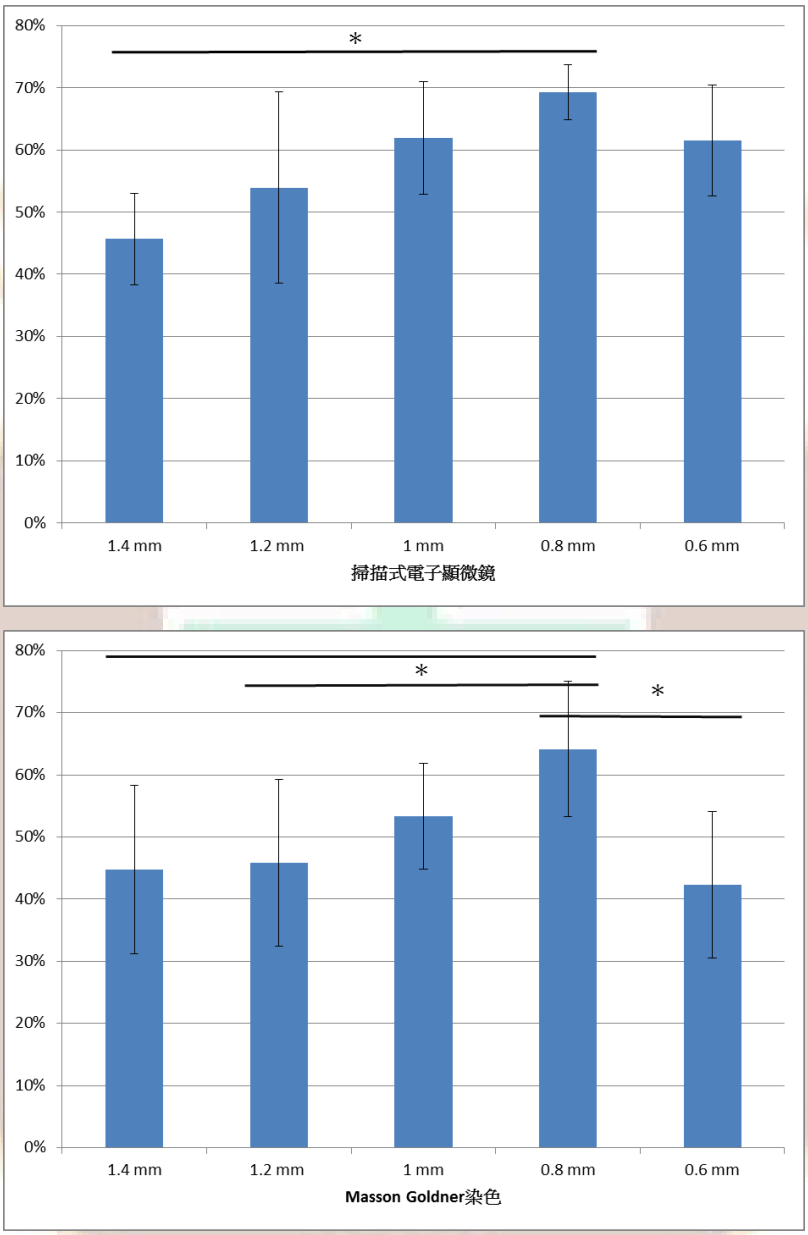


圖 3-14 梯型螺紋於 16 週下，在掃描式電子顯微鏡(上圖)及 Masson Goldner 染色(下圖)之各螺紋間距間對骨植體接觸百分比之差異

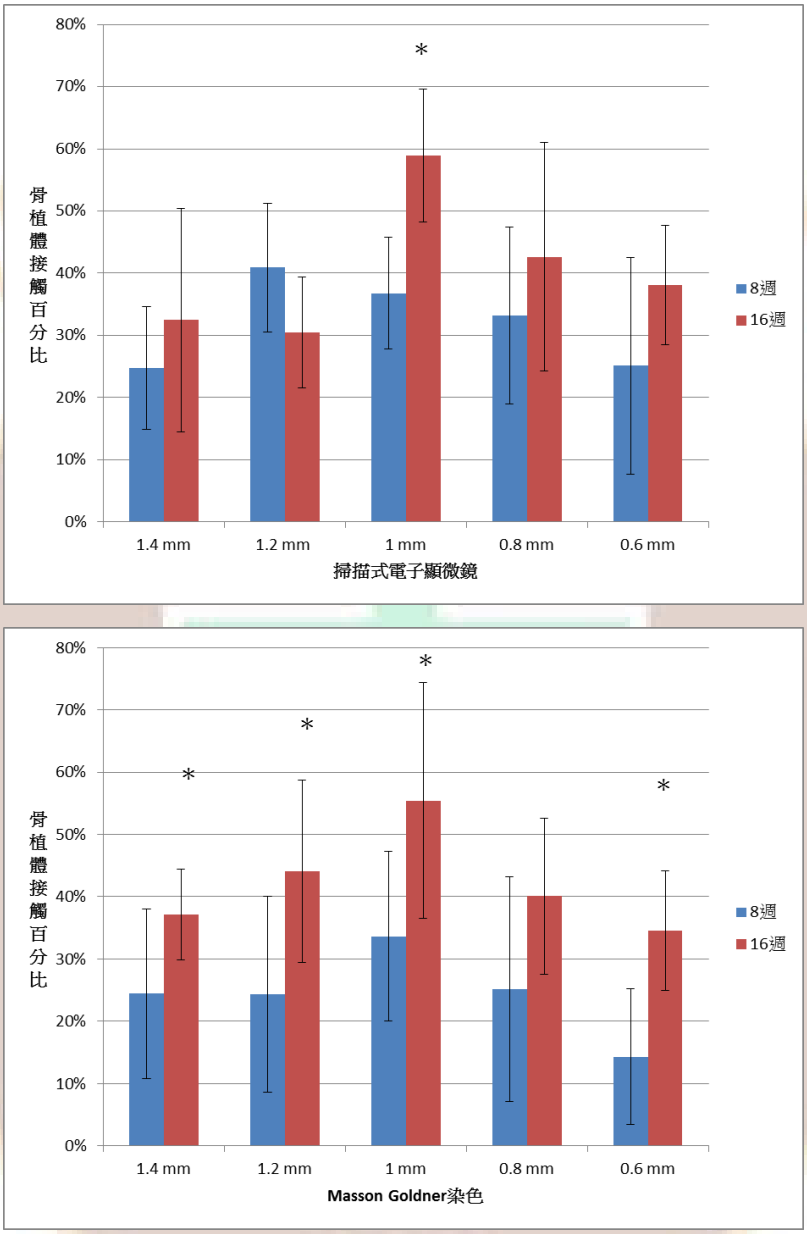


圖 3-15 方型螺紋分別在掃描式電子顯微鏡(上圖)及 Masson Goldner 染色(下圖)下，其 8 週及 16 週骨植體接觸百分比之差異

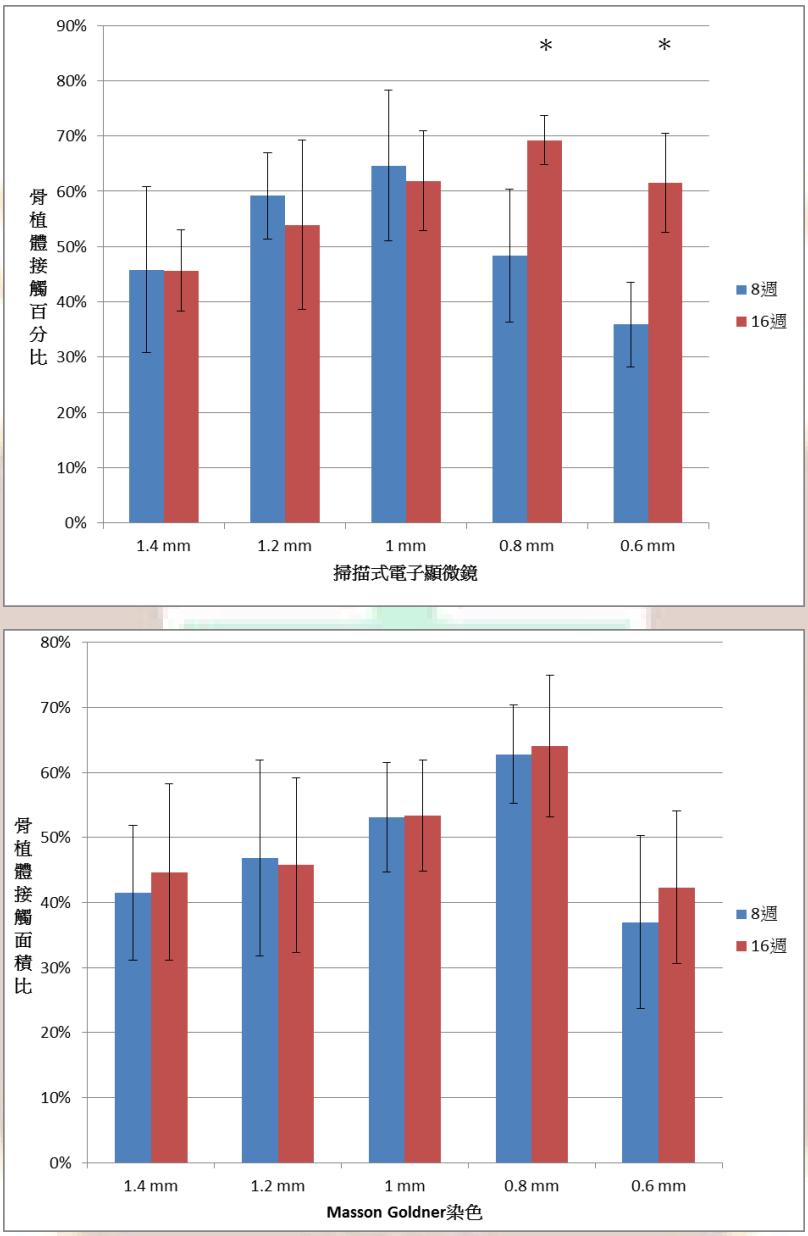


圖 3-16 梯型螺紋分別在掃描式電子顯微鏡(上圖)及 Masson Goldner 染色(下圖)下，其 8 週及 16 週骨植體接觸百分比之差異

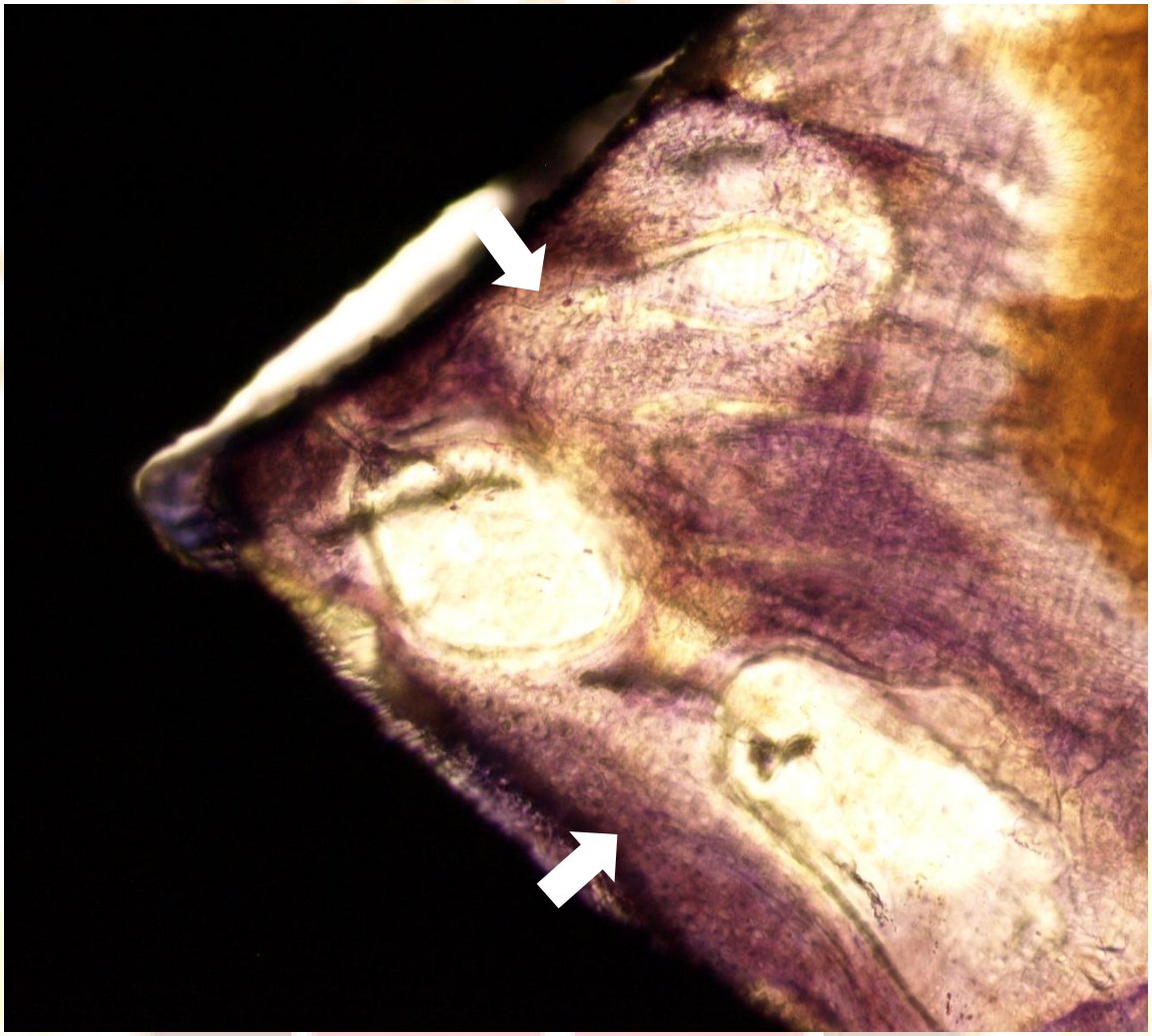


圖 3-17　8 週之梯型螺紋，經 BMP-2 標定。在骨植體交接處，BMP-2 呈現層狀排列(箭頭處)。而螺紋間處則呈現混亂之排列(200X)。

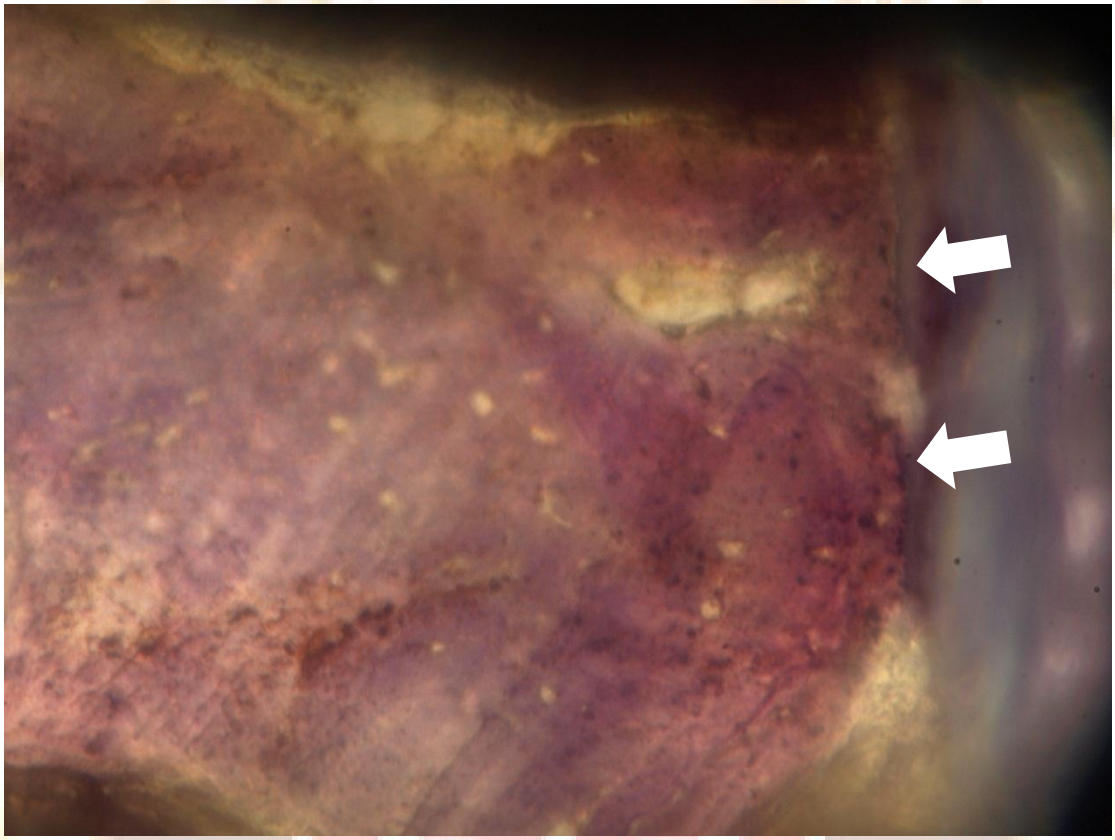


圖 3-18　8 週之方型螺紋，經 BMP-2 標定。骨組織排列無規則，BMP-2 表現較弱(箭頭處)(500X)。

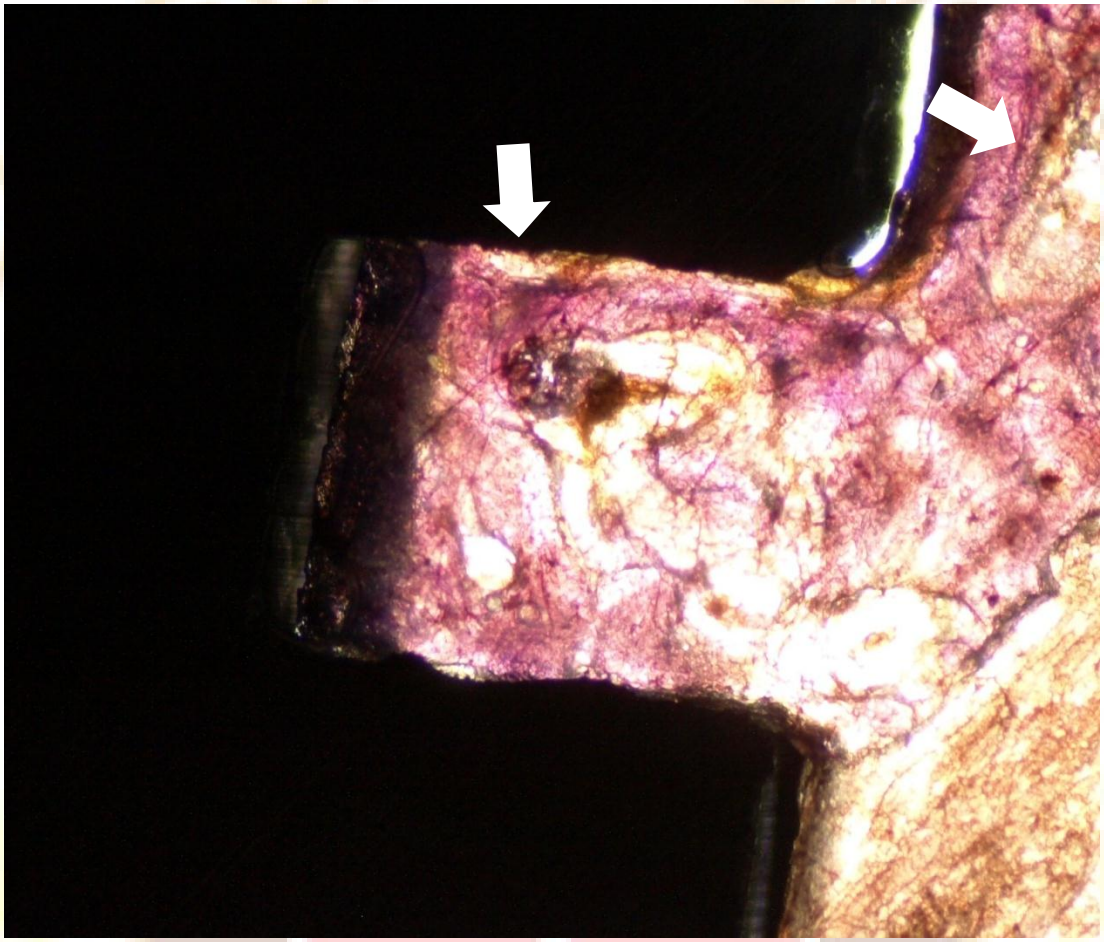


圖 3-19　8週之方型螺紋,經OC標定。OC在靠近螺紋外緣表現較多，靠近植體表面處，表現較少(箭頭處)(200X)。

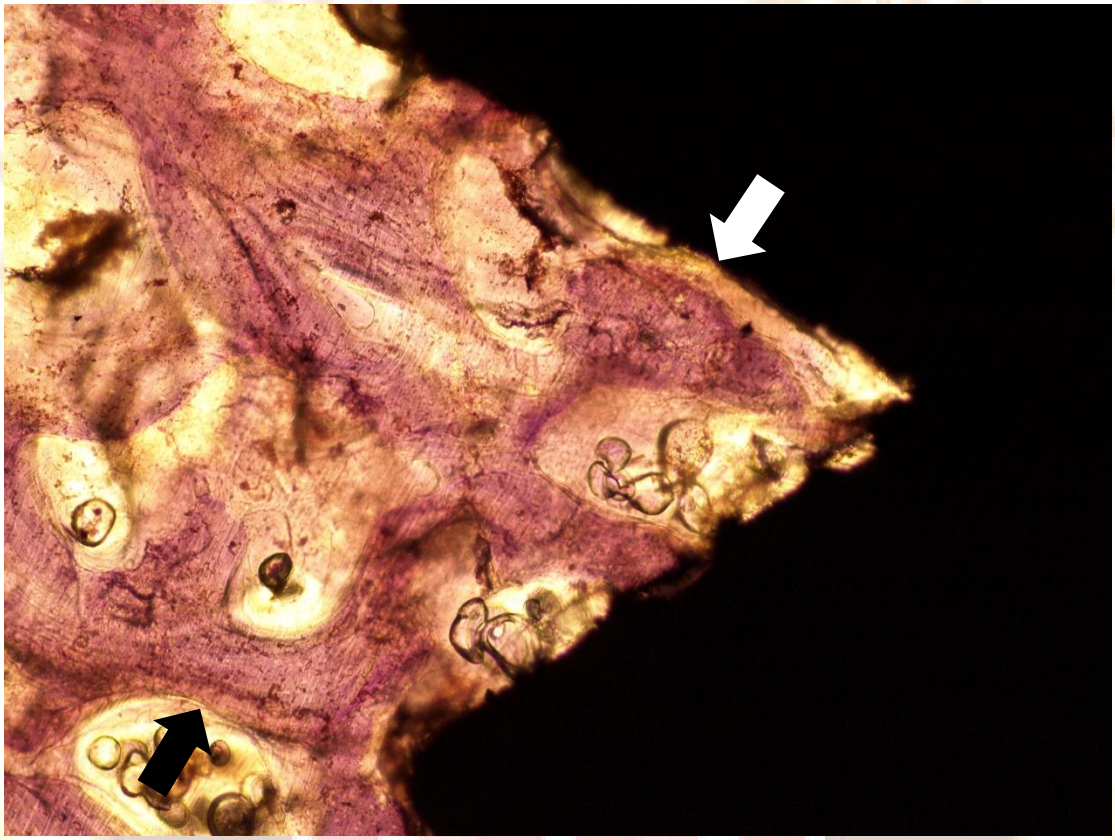


圖 3-20　8 週之梯型螺紋，經 OC 標定。OC 分布均勻，且呈現規則之排列(箭頭處)(200X)

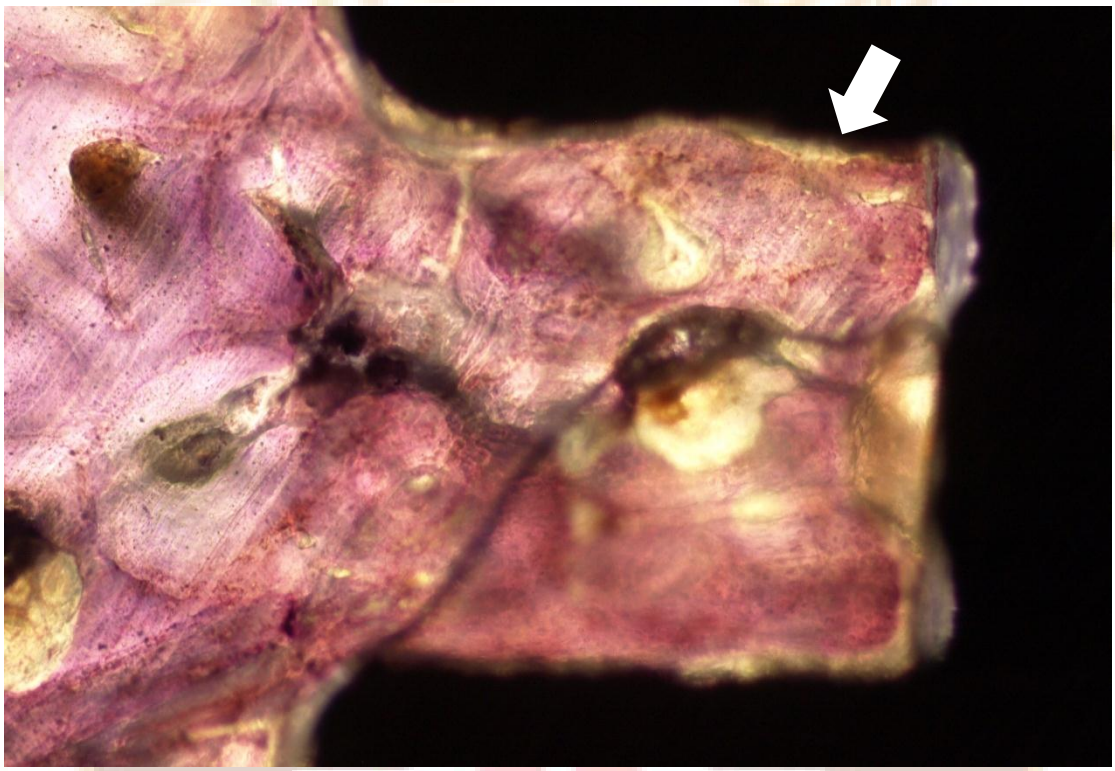


圖 3-21 16 週之方型螺紋，經 BMP-2 標定。出現較多層狀骨，而梭織骨減少(箭頭處)(200X)。

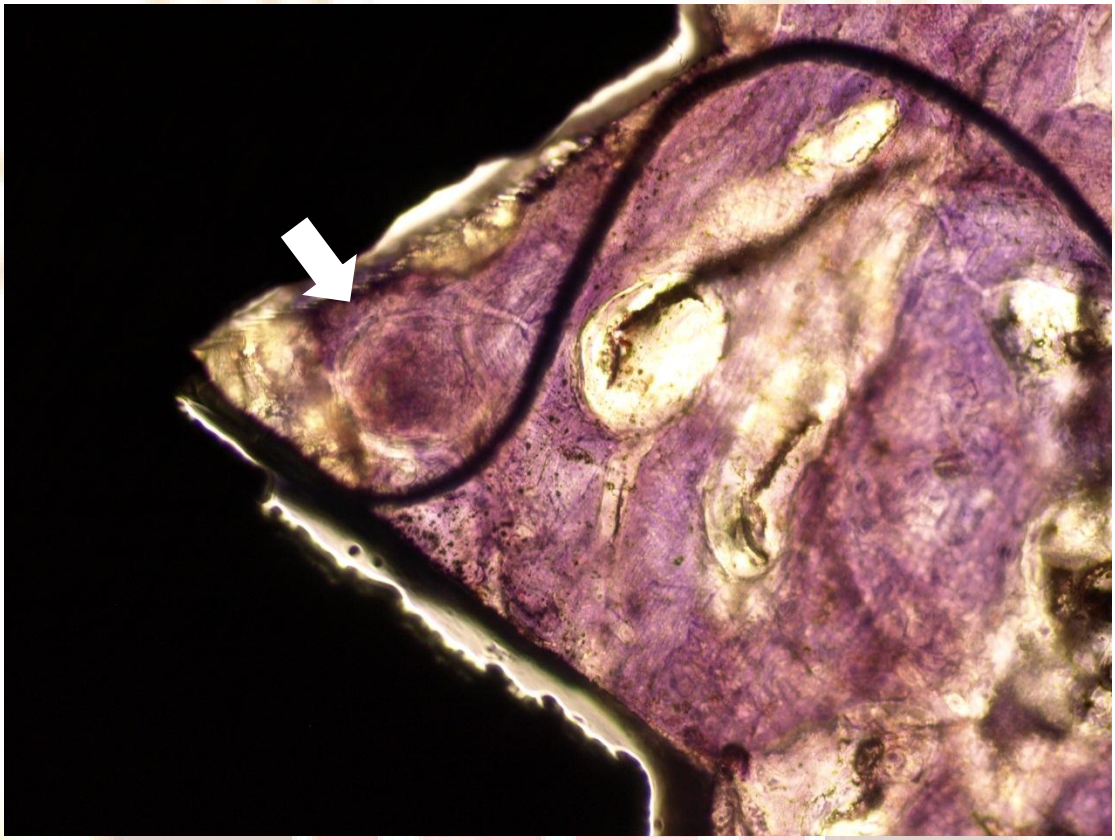


圖 3-22 16 週之梯型螺紋，經 BMP-2 標定。出現較多層狀骨，而梭織骨減少(箭頭處)(200X)。

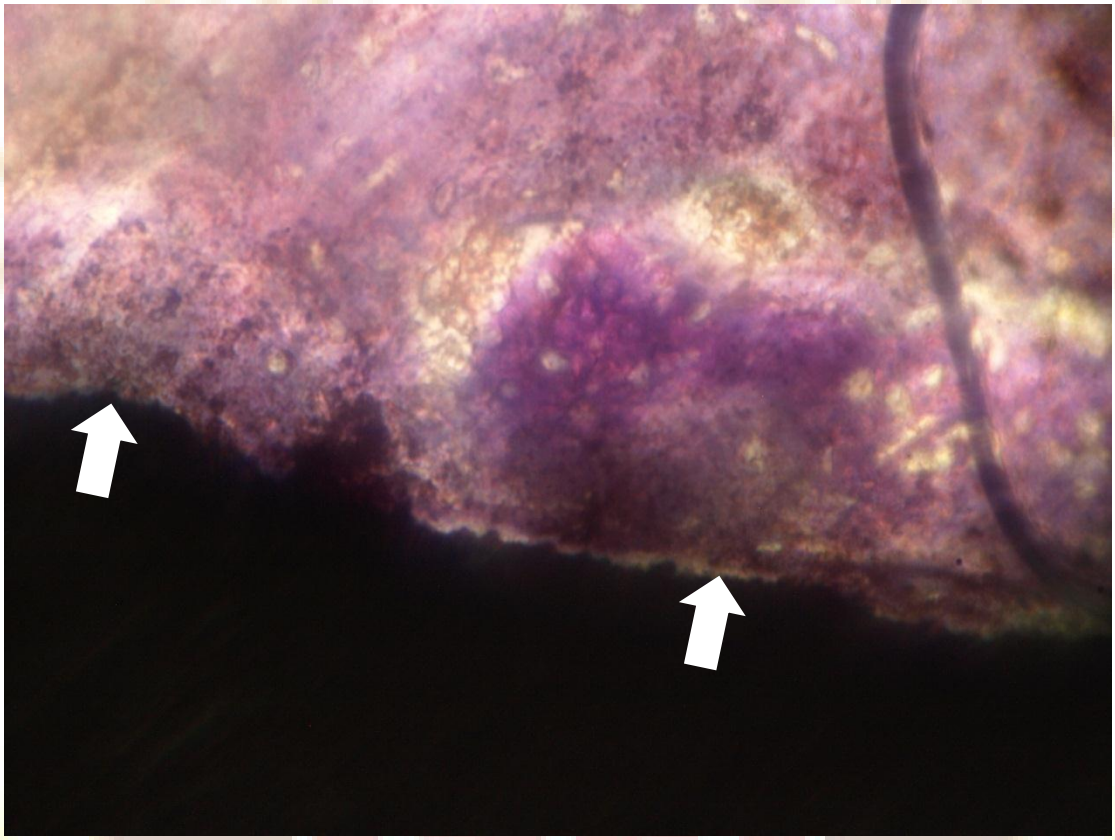
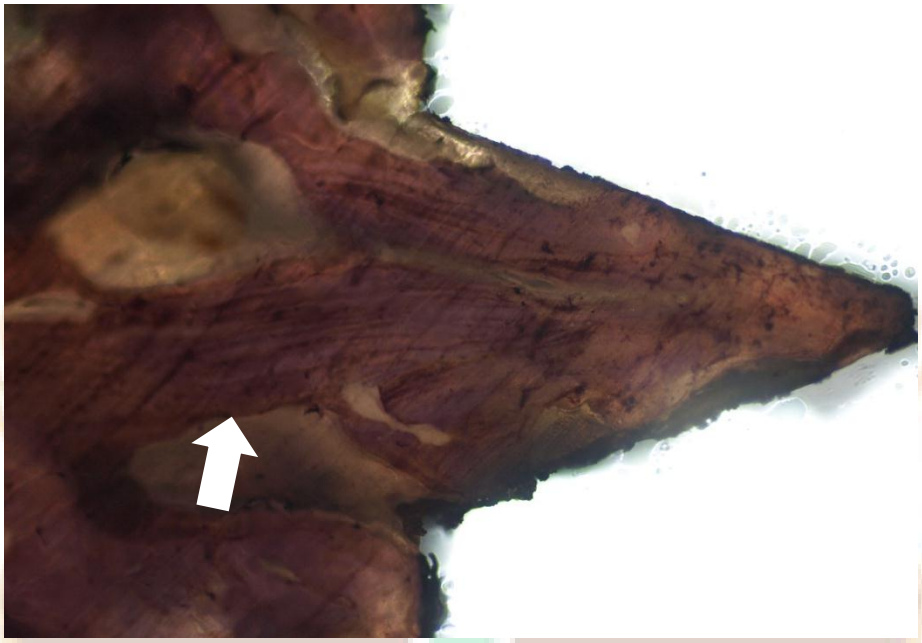


圖 3-23 16 週之方型螺紋，經 OC 標定。在植體表面，可看到 OC 表現(500X)。



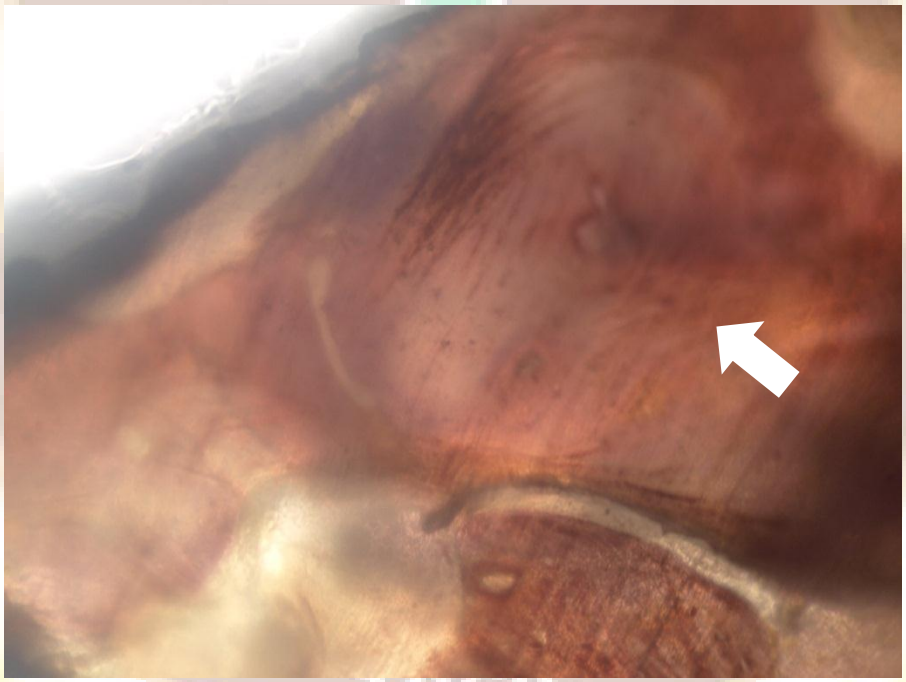


圖 3-24 16 週之梯型螺紋，經 OC 標定。可看到成層狀排列之 OC(上圖箭頭處)(100X)，觀察到哈維式小管，為一骨元(下圖箭頭處)(500X)。

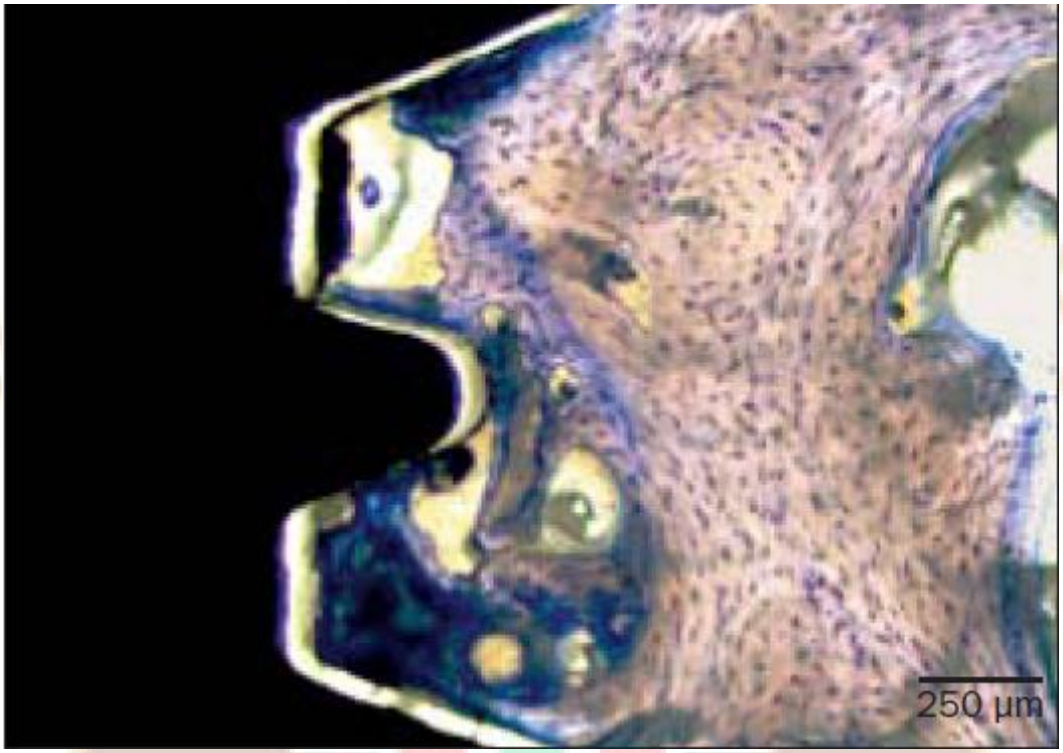


圖 4-1　4 週切削植體之組織切片，螺紋間距部分仍為梭織骨，在螺紋邊緣處為板狀骨。(Adapted from Bonfante EA., Granato R., Marin C. Early bone healing and biomechanical fixation of dual acid-etched and As-machined implants with healing chambers: An experimental study in dogs. Int J Oral Maxillofac Implants. 2011 Jan-Feb;26(1):75-82.)

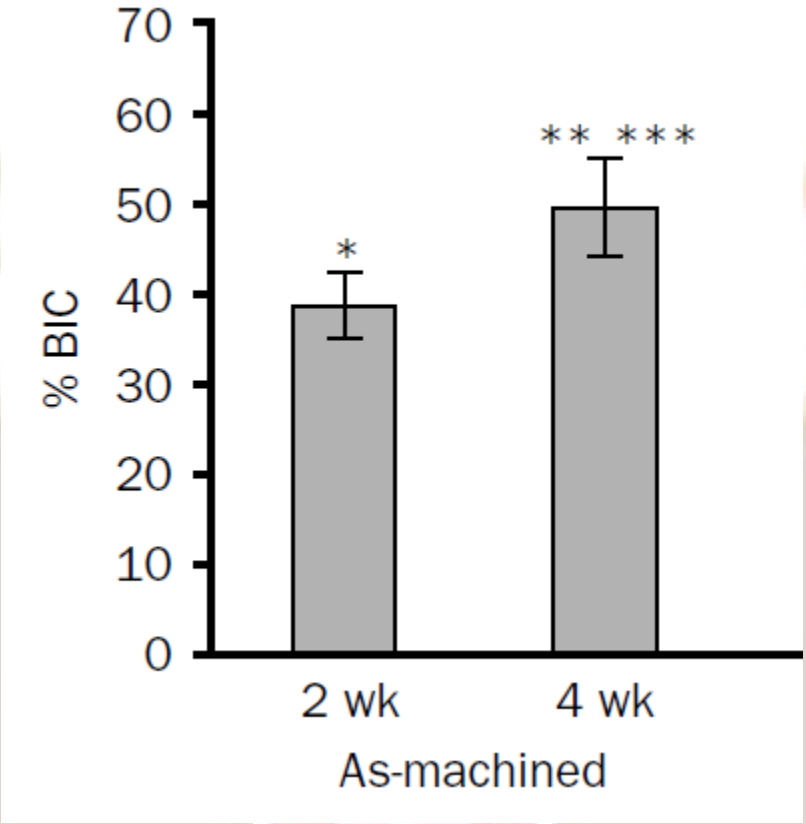


圖 4-2 切削植體於狗之動物實驗，2 週及 4 週骨植體接觸百分比。(Adapted from Bonfante EA., Granato R., Marin C. Early bone healing and biomechanical fixation of dual acid-etched and As-machined implants with healing chambers: An experimental study in dogs. Int J Oral Maxillofac Implants. 2011 Jan-Feb;26(1):75-82.)

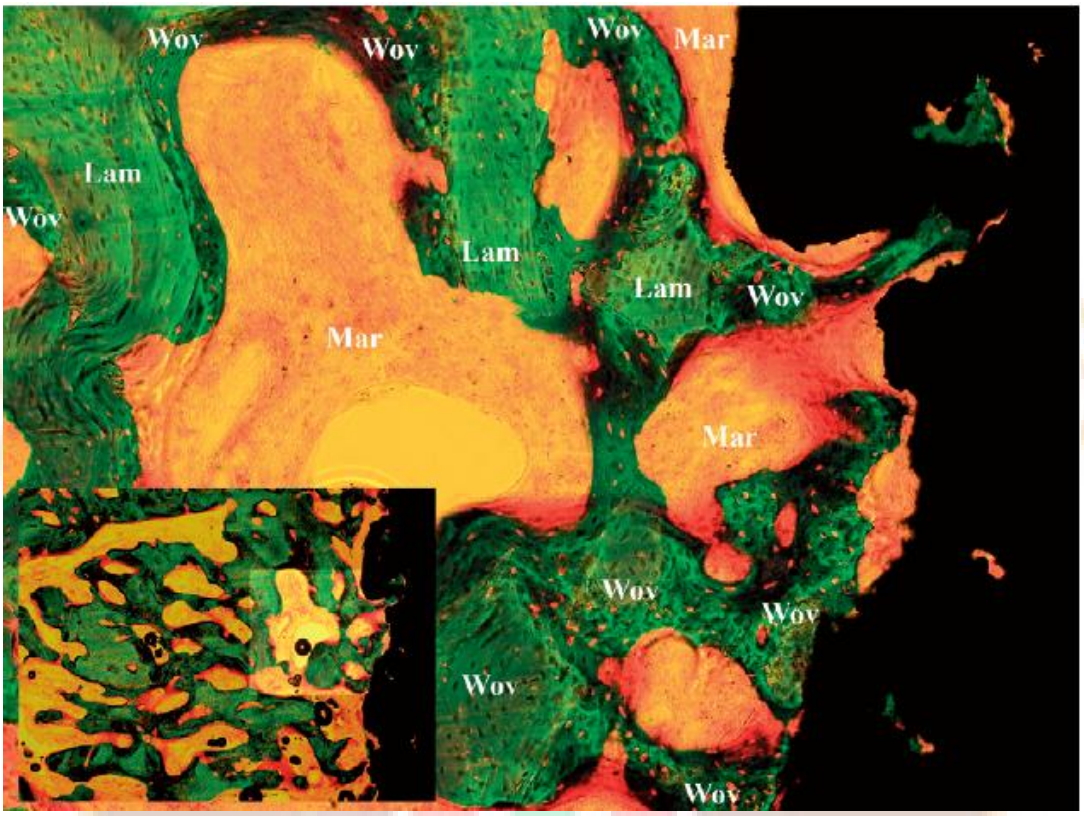


圖 4-3 植體(黑色)與骨(綠色)接觸面會先形成梭織骨(Wov)，之後會漸成為成平行排列之層狀骨(Lam)(Adapted from Baas J, Lamberg A, Jensen TB, Elmengaard B, Søballe K.. The bovine bone protein lyophilisate Colloss improves fixation of allografted implants—an experimental study in dogs. Acta Orthopaedica 2006; 77 (5): 791－798)

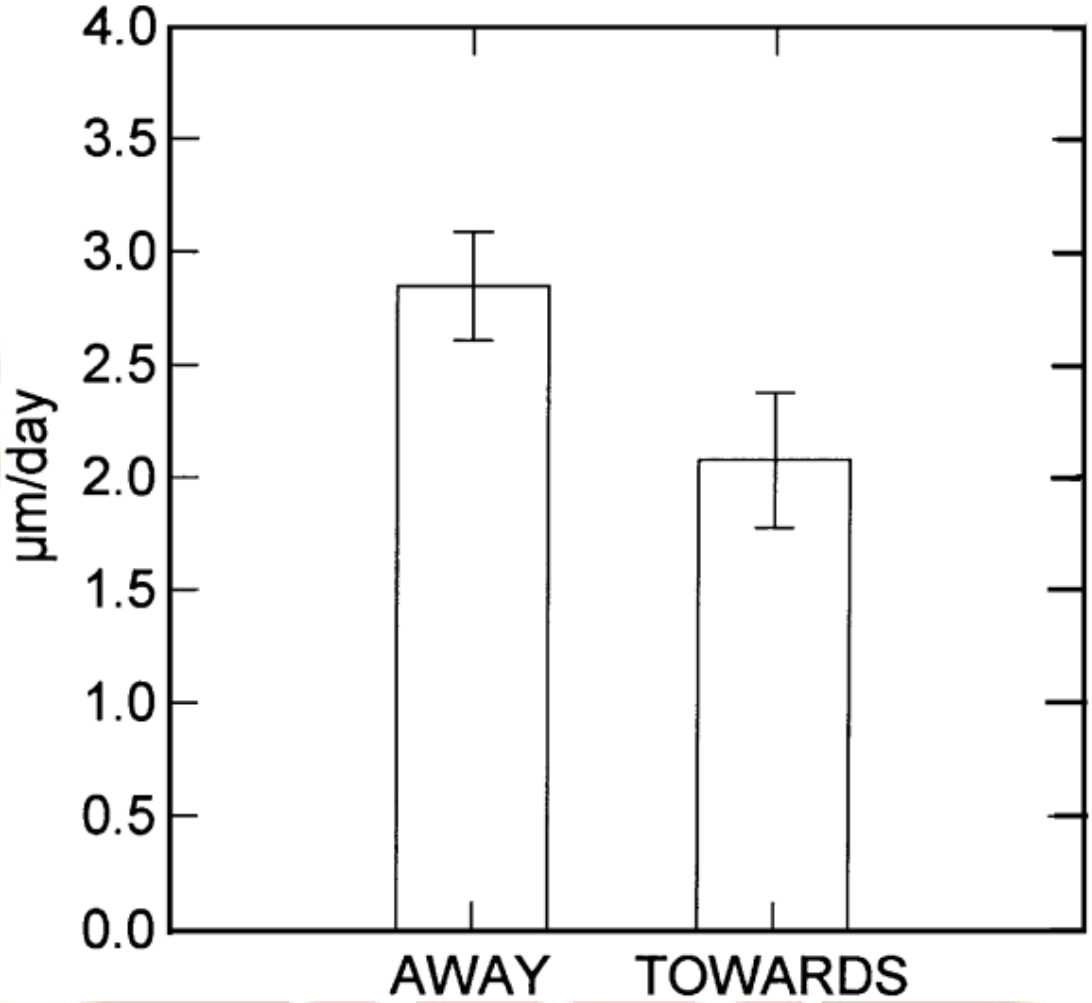


圖 4-4 植體上之骨組織生長方向可分為遠離及沿著植體，其速率為遠離植體方向較沿著植體方向快。(Adapted from Puleo D.A.,Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. Biomaterials. 1999; 20: 2311-21)

臺北醫學大學動物實驗管理小組審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
Taipei Medical University

動物實驗申請表暨同意書編號：LAC-99-0007

計畫申請人：李勝揚　職　稱：教授

單　位：牙醫學系　飼養/應用地點：台大獸醫系二館九樓動物中心(豬舍)

計畫名稱：

生醫陶瓷植體研發計畫

本計畫之「動物實驗申請表」業經動物實驗管理小組□實質□形式審查通過。
本計畫預定飼養應用之動物如下：

動物種類	動物數量	計畫執行期間
蘭嶼豬	11 隻	100 年 9 月 1 日至 102 年 3 月 31 日

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee（IACUC）.

Protocol Title：

Development bio-ceramic dental implant (3 years project)

IACUC Approval No：LAC-99-0007

Period of Protocol：Valid From: 09/01/2011 To: 03/31/2013
（mm/dd/yyyy）

Principle Investigator（PI）：

動物實驗管理小組召集人　召集人 楊良友　日期 3/19/2010
IACUC Chairman　Date

◎◎標示欄位由管理小組填寫◎◎