

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

研發含奈米氟幾丁聚醣抗菌複合樹脂作為溝隙封填劑

Development of Antibacterial Composite Resin  
Containing Chitosan/Fluoride Nanoparticle as Pit and  
Fissure Sealant

賴俊成

Chun-Cheng Lai

指導教授：林俊彬 博士

Advisor: Chun-Pin Lin, DDS, Ph.D.

中華民國 109 年 6 月

June 2020



國立臺灣大學（碩）博士學位論文  
口試委員會審定書

研發含奈米氟幾丁聚醣抗菌複合樹脂作為溝隙封填劑

Development of Antibacterial Composite Resin Containing

Chitosan/Fluoride Nanoparticle as Pit and Fissure Sealant

本論文係牙醫學系、所完成之碩士學位論文，於民國 109 年 05 月 30 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：

林俊彬

(簽名)

(指導教授)

陳文斌

章銘

謝明政

王國慶

陳淑慧

系主任、所長

(簽名)

(是否須簽章依各院系所規定)

## 誌謝



我非常感謝研究所這三年來幫助過我的老師以及同學們，沒有你們的幫忙，我不可能學會這麼多知識與技巧，也不可能完成這篇論文。

首先我要感謝的是林俊彬院長，他是一個很幽默又很謹慎的教授，讓我看到了什麼叫做「大膽假設，小心求證」的精神。他不曾在我實驗碰到挫折的時候給予我責難，而是想辦法幫助我，鼓勵我講出問題並在會議的時候與我討論，並且在耗材的購買上給予我非常多的支持，全然的相信學生，我非常感動。另外是王姻麟助理教授，他是一個心靈手巧的老師。他不只在臨床的學習上給我許多幫助，也在研究上與我討論解決實驗問題的方法。

在四樓共同實驗室 A 的這一年，我最感謝的就是柏雅學姊，她非常溫暖又樂於助人，在我對實驗一籌莫展之際，手把手的教導我培養細胞與細菌，與各種繁複又困難的細胞與細菌試驗，讓我進步非常多。除此之外，也要感謝耕源學長教導我機械性質方面的測試與樣品的製作；肇禮學長與俊良學長在實驗上的幫忙，以及努力與我模擬口試的時候會被問到的問題。最後是 325 和 329 室可愛的助理和學生們，胤德、柏翰和冠廷，每次我有問題的時候總是義不容辭地幫忙及教我使用儀器，非常感謝。當然也要感謝兒童牙科的老師和助理們這三年來的幫助。謝謝郭敏光醫師、王姻麟醫師、張曉華醫師、黃桂芬醫師、王詩凱醫師，總是不厭其煩的耐心指導，讓我能對於自己的臨床技巧更有信心。也要謝謝已經畢業的學長姊們，以潔、宛君、郁仁、頤潔，總是在我碰到臨床問題的時候與我討論，並且加油打氣。也要感謝我親愛的學弟妹們，依祈、子揚、紓君、姿蓉，你們四個人真的非常熱情又獨立，總是幫忙我許多臨床以外的行政事務，在我忙碌的時候還幫我看診。最後是感謝我的家人，謝謝你們在我讀研究所的這三年給予我莫大的支持，總是與我分享生活中的酸甜苦辣。

要感謝的人太多了，無法一一提到真是深感抱歉。三年的時間很快就過去了，期許在研究所畢業後，自己也能成為一個有能力幫助別人，且個性溫暖的人。

## 中文摘要

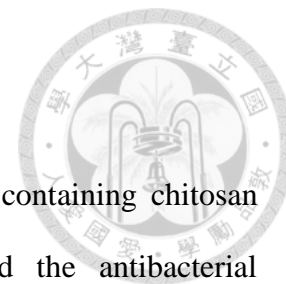


此研究乃利用離子凝膠法結合氟化鈉與幾丁聚醣以合成奈米氟幾丁聚醣，並加入樹脂基質中，形成一種既能抗菌又能釋放氟離子的溝隙封填劑。

本研究包括六個部分，第一個部分製備出奈米氟幾丁聚醣和奈米級矽烷化二氧化矽的樣品，與雙酚 A-甲基丙烯酸縮水甘油酯、三乙二醇二甲基丙烯酸酯、樟腦醃、對二甲胺基苯甲酸乙酯完成混合，製成奈米氟幾丁聚醣樹脂。第二個部分是以傅立葉紅外線光譜儀偵測加氟前後幾丁聚醣的結構變化和粒徑大小，發現奈米氟幾丁聚醣的結構中除了有  $1567\text{cm}^{-1}$  和  $1417\text{cm}^{-1}$  的特徵鋒，還多了  $738\text{cm}^{-1}$ ，顯示三氟甲基形成的可能性，且其粒徑大小為  $629 \pm 55\text{nm}$ 。第三部分為利用吸光值和菌落形成單位比較 0%、2%、4% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的抗菌能力，結果 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的菌落形成單位為控制組的 10%，4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的菌落形成單位為控制組的 25%，兩者的抗菌效果無顯著差異，但相較於 Clinpro™ 溝隙封填劑有更明顯的抗菌效果。第四部份為觀察不同含量的奈米氟幾丁聚醣萃取液的細胞存活率、細胞毒性的高低，發現 4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂萃取液有影響細胞複製的能力，故最後選擇 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑比較機械性質。第五個部分是比較奈米氟幾丁聚醣樹脂與市售產品之間的機械性質，2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的聚合深度、表面抗壓強度、徑向抗拉/壓強度皆高於 Clinpro™ 溝隙封填劑。抗彎強度方面沒有差異性，流動性方面較差。最後是進行氟離子釋放與再吸收的實驗，發現 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂有與市售產品同樣優良的氟離子釋放與再吸收能力。藉由以上的研究結果發現，2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂具有抗菌能力、生物相容性、良好的機械性質，能釋放與再吸收氟離子，具有成為溝隙封填劑的潛力。

關鍵字: 溝隙封填劑、奈米氟幾丁聚醣、抗菌特性、生物相容性、氟離子釋放、氟離子再吸收

## 英文摘要



The purpose of this study was to develop composite resin containing chitosan /fluoride nanoparticle (CF) as pit and fissure sealant. It had the antibacterial characteristics and the ability of fluoride release and recharge.

There are six parts in this study. First, to prepare composite resin containing CF and silanized silica nanoparticle, bisphenol A glycerolate dimethacrylate, triethylene glycol dimethacrylate, camphorquinone and ethyl 4-dimethylaminobenzoate were mixed with the filler as pit and fissure sealant. Second, we used fourier-transform infrared spectroscopy and particle size distribution analyzer to observe the structure and hydrodynamic radius of CF. We found that besides the characteristic peaks,  $1567\text{cm}^{-1}$  and  $1417\text{cm}^{-1}$ , there was an additional peak,  $738\text{cm}^{-1}$ , suspected to be the  $\text{CF}_3$  group. And the hydrodynamic radius was  $629 \pm 55\text{ nm}$ . Third, the antibacterial activity of resin containing 0%, 2%, 4% CF were compared with Clinpro<sup>TM</sup> fissure sealant through the measurement of optical density and colony forming units (CFUs). The CFU ratio of composite resin containing 2% CF was 10% compared to the control group, and composite resin containing 4% CF was 25%, which had no significant difference. But both of them had obviously antibacterial activity compared to Clinpro<sup>TM</sup> fissure sealant. In the fourth part, we observed the cell viability and toxicity of Clinpro<sup>TM</sup> fissure sealant and resin containing different concentration of CF. We found that the extract of composite resin containing 4% CF could result in the reduction of cell proliferation. Therefore, we choose composite resin containing 2% CF to compare the mechanical properties with Clinpro<sup>TM</sup> fissure sealant. In the fifth part, we found the value of curing depth, surface hardness, and diametral tensile strength of composite resin containing 2% CF were higher than Clinpro<sup>TM</sup> fissure sealant, but there was no difference in the flexural strength and the flowability was comparatively lower. Last, the fluoride release

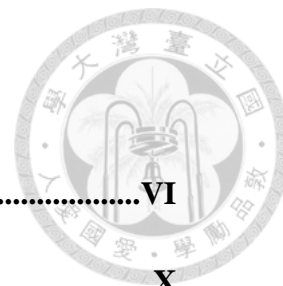
and recharge of composite resin containing 2% CF and Clinpro™ fissure sealant were tested. And we found the ability of fluoride release and recharge of composite resin containing 2% CF was as good as Clinpro™ fissure sealant.



From the results above, composite resin containing 2% CF could be a pit and fissure sealant, which had the antibacterial activity, biocompatibility, good mechanical strength, and the ability of fluoride release and recharge.

**Key words:** pit and fissure sealant, chitosan/fluoride nanoparticle, antibacterial activity, biocompatibility, fluoride release, fluoride recharge

# 目次



目次 .....	VI
圖目錄 .....	X
表目錄 .....	XI
第一章 研究動機與重要性 .....	1
第二章 文獻分析 .....	3
2.1 咬合面齲齒與溝隙封填劑的使用 .....	3
2.2 氟化物的三大抗齲作用 .....	7
2.3 幾丁聚醣的抗菌能力 .....	10
第三章 具體目標 .....	16
第四章 實驗材料與方法 .....	17
4.1 實驗架構 .....	17
4.2 實驗材料與儀器 .....	18
4.2.1 實驗材料 .....	18
4.2.2 實驗儀器 .....	20
4.3 實驗方法 .....	22
4.3.1 奈米氟幾丁聚醣、奈米級矽烷化二氧化矽及奈米氟幾丁聚醣樹脂的 製備 .....	22
4.3.2 奈米氟幾丁聚醣的結構與粒徑分析 .....	23
4.3.3 奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌特性 .....	25
4.3.4 奈米氟幾丁聚醣樹脂的生物相容性 .....	32



4.3.5	2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的機械性質分析	41
4.3.6	2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的氟釋放與再吸收分析 .....	44
4.3.7	統計分析 .....	47
<b>第五章 結果分析 .....</b>		<b>48</b>
5.1	奈米氟幾丁聚醣的結構與粒徑 .....	48
5.1.1	幾丁聚醣的傅立葉紅外線光譜轉化圖(圖 1) .....	48
5.1.2	奈米氟幾丁聚醣的傅立葉紅外線光譜轉化圖(圖 1) .....	48
5.1.3	奈米氟幾丁聚醣的流體動力學半徑(hydrodynamic radius) (圖 2)	48
5.2	奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌特性 .....	49
5.2.1	轉醣鏈球菌的生長曲線-吸光值與菌液濃度的關係(表 2) .....	49
5.2.2	轉醣鏈球菌的生長曲線-菌落形成單位與菌液濃度的關係(表 3)	49
5.2.3	不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌效果與吸光值的關係(圖 3 表 4)	50
5.2.4	不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌效果與菌落形成單位關係(表 5)	51
5.2.5	不同含量奈米氟幾丁聚醣樹脂抗菌效果於掃描電子顯微鏡下呈現(圖 4)	52
5.3	奈米氟幾丁聚醣樹脂的生物相容性 .....	52
5.3.1	不同含量奈米氟幾丁聚醣樹脂萃取液對於纖維母細胞的細胞存活率(表 6 圖 5 圖 6) .....	52





5.3.2 不同含量奈米氟幾丁聚醣樹脂萃取液對於纖維母細胞的細胞毒性 (表 7)	53
5.3.3 纖維母細胞於不同含量奈米氟幾丁聚醣樹脂萃取液稀釋 10 倍後培 養下的型態(圖 7)	53
5.4 奈米氟幾丁聚醣樹脂的機械性質	54
5.4.1 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑在聚合深度方面 比較(表 8)	54
5.4.2 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑在表面硬度方面 的比較(表 8)	55
5.4.3 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑在徑向抗張強度 方面的比較(表 8)	55
5.4.4 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑在抗彎強度方面 比較(表 8)	56
5.4.5 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑在流動性方面比 較(表 8)	57
5.5 奈米氟幾丁聚醣樹脂的氟釋放與再吸收	57
5.5.1 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑氟離子釋放方面 的比較(圖 8 圖 9)	57
5.5.2 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑氟離子再吸收方 面的比較(表 9)	58
<b>第六章 討論</b>	<b>60</b>
<b>第七章 結論</b>	<b>68</b>
<b>第八章 檢討與未來研究方向</b>	<b>70</b>

第九章 參考文獻 .....	71
附錄-圖 .....	77
附錄-表 .....	86



## 圖目錄



圖 1 幾丁聚醣與奈米氟幾丁聚醣的傅立葉紅外線光譜轉化圖 .....	77
圖 2 奈米氟幾丁聚醣的粒徑分析 .....	78
圖 3 不同含量的轉醣鏈球菌菌液與吸光值的折線圖：阿爾瑪藍細胞增殖及毒性 檢測試驗(Alamar Blue assay) .....	79
圖 4 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌效果於掃描式電子顯微鏡下的呈現 .....	80
圖 5 纖維母細胞於不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑萃取 液中培養的型態(第一天) .....	81
圖 6 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑萃取液稀釋 10 倍後 培養細胞一、三、五天的細胞存活率吸光值(Absorbance=450nm) .....	82
圖 7 纖維母細胞於 10 倍稀釋之不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙 封填劑萃取液中培養的型態(第三天) .....	83
圖 8 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑在氟釋放方面的比較	84
圖 9 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑在累積氟釋放方面比較	85

## 表目錄




表 1 奈米氟幾丁聚醣樹脂的構成分析.....	86
表 2 轉醣鏈球菌的生長時間與吸光值之間的關係.....	87
表 3 固態培養基上不同時間點的單顆菌落數(個).....	88
表 4 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌效果與吸光值的關係.....	89
表 5 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌效果與菌落形成單位的關係.....	90
表 6 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑萃取原液於培養細胞一天後的吸光值(Absorbance=450nm) .....	91
表 7 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑萃取液稀釋 10 倍後的細胞毒性(Absorbance=490nm) .....	92
表 8 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑在機械性質方面的比較	93
表 9 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑於氟離子再吸收的比較	94

# 第一章 研究動機與重要性



齲齒的預防與治療是在口腔衛生教育、社區醫療以及流行病學上不可忽視的一個重要議題，而牙齒咬合面上的窩溝因其結構複雜，易堆積食物殘渣而容易受致齲菌及其代謝物的侵襲，進而造成齲齒。因此在齲齒產生之前，溝隙封填劑的施予對於咬合面齲齒的預防變得極為重要。溝隙封填劑的使用原理即提供一個物理性屏障於牙齒咬合面上，避免細菌的進駐與食物殘渣的陷入，齲齒就無法產生。樹脂類的溝隙封填劑因在牙齒上的存留率以及側壁貼附性較好[1]，而廣泛用於齲齒的預防上，市面上大部分的樹脂類溝隙封填劑之單體成分皆為雙酚 A-甲基丙烯酸縮水甘油酯(bisphenol A glycerolate dimethacrylate, Bis-GMA)和三乙二醇二甲基丙烯酸酯(triethylene glycol dimethacrylate, TEGDMA)，起始劑的部分為樟腦醌(camphorquinone, CQ)和對二甲胺基苯甲酸乙酯(ethyl 4-dimethylaminobenzoate, EDMAB)，這些樹脂基質在酸蝕過的牙齒表面上，形成樹脂懸垂物(resin tag)和混合層(hybrid layer)，與牙齒表面有很好的黏連[2]。雖然樹脂類溝隙封填劑在臨床上似乎有很好的表現，但在口外實驗進行溫度循環(thermal cycling test)測試卻發現許多邊緣滲漏的形成[3]，這些交界破損處可能會造成致齲菌的黏附，並且產生填補物下方的二次齲齒(secondary caries)。

因此在溝隙封填劑內加入抗菌物質被認為能減少填補物下方的菌量，進而減少因邊緣滲漏所產生的齲齒。事實上，有研究顯示[4]單純不加抗菌物質，並以二甲基丙烯酸甲酯(dimethacrylate)當作基質的溝隙封填劑已有部分的抗菌效果，但科學家們為了增強抗菌效果，最常在溝隙封填劑中加入氟化物，期待使溝隙封填劑具有抑制去礦化、加速再礦化以及抗菌的能力。Lussi[5]在 2012 年的回顧性文章中分析了氟化物的三大作用，對於抑制去礦化以及加速再礦化都給予了正面的評價，但是對於抗菌的作用卻給予了保留的態度，主要是針對 Li 和 Bowden[6]在 1994 年的研究中所提出的「氟離子與氫氟酸形成使細菌死亡的假說模型」，其假說認為



氟離子在口內會形成微量的氫氟酸，累積於細菌細胞內造成酸化，細菌因而死亡。但受到質疑的是氫氟酸的解離常數(Acid dissociation constant, pKa) 為 3.14，在酸鹼值為 5 的情況下，只有 1% 的氟離子轉變為氫氟酸，其他都是氟離子，是否能抗菌的說法受到挑戰。比較被接受的是氟離子能抑制細菌糖解作用中的烯醇化酶(enolase)使乳酸無法產生[7]，間接造成牙齒較不易被酸蝕破壞，並不是直接造成細菌的死亡。為了加強抗菌效果，也有其他研究在溝隙封填劑中加入二氯苯氧氯酚(triclosan)[8]、氯己定(chlorhexidine)[9]試圖減少填補物下的菌量，但都為人造抗菌劑，而非天然的抗菌物質。

幾丁聚醣的生物活性(bioactivity)及生物相容性(biocompatibility)好，本身又具有抗菌效果，因此已廣泛用於牙膏或漱口水當中當作抗菌物質。幾丁聚醣的結構為(1-4)-2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan，是由幾丁質去乙酰化而來。當去乙酰化程度大於 50% 的時候，即可溶於酸性水溶液當中，其結構中的胺基質子化成銨基，變成帶正電粒子，與細菌表面帶負電的肽聚醣結合，造成細菌破損而死亡。幾丁聚醣加入溝隙封填劑當作抗菌粒子的研究已不少見[10, 11]，但目前還沒有研究討論是否能將氟離子與幾丁聚醣結合改質，加入溝隙封填劑中形成一種既能釋放氟離子，又能有效抗菌的溝隙封填劑。

因此本研究參考 2019 年 Niousha[12]所發表的文章，將幾丁聚醣溶於醋酸溶液中，並加入三聚磷酸鈉利用離子凝膠法(ionic gelation method)結合氟化鈉與幾丁聚醣，以形成奈米氟幾丁聚醣。再加入於樹脂基質中偵測其抗菌效果、生物相容性、機械強度與氟離子釋放與再吸收的能力，此為本篇研究的目的。

## 第二章 文獻分析



此篇研究主要為研發一種奈米氟幾丁聚醣樹脂作為溝隙封填劑，其具有抗菌能力、良好的生物相容性及一定的氟離子釋放與再吸收的能力。因此文獻分析主要探討了三個部分，第一部分是咬合面齲齒與溝隙封填劑的使用，第二部分為介紹氟化物的三大抗齲作用，第三部分為幾丁聚醣的抗菌能力。

### 2.1 咬合面齲齒與溝隙封填劑的使用

咬合面齲齒大概佔所有齲齒的 52.7%~66.3%，然而咬合面卻只佔所有齒面面積的 13%[13, 14]。在各種牙齒的咬合面外型中，大白齒具有最複雜的咬合面型態，因此容易堆積食物和藏匿細菌，我們也很難用牙刷或其他工具有效的清潔和除菌。

窩溝的型態根據 Nagano[15]在 1961 年的分類分成五種，分別是 V 型、U 型、I (Y1)型、IK (Y2)型和倒 Y (inverted Y)型。早期在 1921 年 Hyatt[16]曾經有想過既然窩溝那麼容易藏匿細菌和堆積食物，那麼透過預防性的把窩溝打開(prophylactic odontomy)或是去除窩溝(fissure eradication)應該就能避免齲齒的產生，但結果顯示成效不大。因為物理性去除的成效不大，Klein[17]和 Ast[18]分別在 1942 年和 1950 年提出用化學性的方法例如添加銀氨溶液(ammoniacal silver nitrate)或是氯化鋅(zinc chloride)及亞鐵氰酸鹽(ferrocyanide)來去除窩溝上的細菌，藉以降低齲齒的發生率，結果仍然成效不佳。目前認為放置溝隙封填劑於牙齒咬合面上是最有效用來預防窩溝齲齒的方法，因為相較於其他可能預防窩溝齲齒的方法而言，其花費較少且減少齲齒的有效程度最佳，所以奠定了其用來預防窩溝齲齒的角色。目前在市面上最常用來填補窩溝的是樹脂型的溝隙封填劑，因為它比較不容易脫落以及抗磨耗能力較強，但是樹脂型溝隙封填劑因為具有疏水性所以在臨床操作的時候容易受到口水的污染而無法有效留存在窩溝中。反之，玻璃離子樹脂型的溝隙封填劑因為能夠有效釋放氟離子來抗菌，黏稠度低及能有效鍵結於牙釉質上，而




成為在無法有效隔離口水時的第一首選。

為了能夠有效留存溝隙封填劑來預防窩溝齲齒，一個好的溝隙封填劑必須能夠最大程度的滲入窩溝中，且於窩溝側壁有良好的貼附性(lateral wall adaptation)。在臨床操作的時候，若將施予的溝隙封填劑延伸到咬頭斜面上，就能夠提供更有效的鍵結[19]。決定溝隙封填劑是否能够有效深入窩溝中的因素包括窩縫的外型及複雜程度、是否有食物殘餘於窩縫中、操作技巧的好壞以及所選擇的材料特性。摒除操作技術的好壞以及是否有把食物殘餘清除乾淨的主觀因素後，客觀因素如窩溝的外型複雜程度以及所選擇的材料特性是我們特別關心的部分。

Nikita[20]於 2018 年發表的研究中將 45 顆因矯正或牙周問題拔除的第三大白齒根據施予不同的溝隙封填劑分成三組，分別是有添加矽酸鹽粒子的含氟溝隙封填劑(Delton® FS sealant)、無添加矽酸鹽粒子的含氟溝隙封填劑(Clinpro™)、玻璃離子樹脂型溝隙封填劑(Fuji VII glass ionomer)；並觀察不同的窩溝外型複雜程度(U、V、I、IK)此兩項因素是否能夠影響溝隙封填劑的穿透程度和側壁的貼附程度。結果顯示在四種不同的窩溝外型中，U 型所佔比例最高(33.3%)，其次是 V 型與 I 型(各 28.9%)，最少的是 IK 型(8.9%)。測量材料在不同窩溝外型的穿透程度(penetrability)發現 U 型最高(93.89%)，其次為 V 型(78.62%)，最後是 IK 型(74.34%)，最後是 I 型(65.91%)。因為 U 型和 V 型的窩溝相對於 I 型和 IK 型的窩縫寬且淺，所以材料的穿透程度較高，也較容易達到較好的留存比例(retention rate)。在三種不同的溝隙封填材料中，玻璃離子樹脂型溝隙封填劑的穿透度最高(85.82%)，其次為無添加矽酸鹽粒子的含氟溝隙封填劑(78.26%)，最後是添加矽酸鹽粒子的含氟溝隙封填劑(74.89%)。玻璃離子樹脂因良好的流動性因此穿透度高，但含氟溝隙封填劑因添加了矽酸鹽粒子而使表面張力和黏稠度增加，使穿透度降低。

事實上，若比較溝隙封填劑的穿透程度和與側壁的貼附程度對於其留存比例的影響來說，與窩溝側壁有良好的貼附程度顯然更加重要。對於 U 型和 V 型的窩






溝來說，不管用什麼材料幾乎都能有效到達窩溝底部，因為有物理性的良好固持，所以溝隙封填劑的留存率高。但是對於深且窄的 I 型和 IK 型窩溝來說，幾乎是沒有材料能夠直接穿透滲入底部。所以可想而知的是，一定有一些微生物留存在沒有溝隙封填劑填滿的窩溝底部。

目前對於齲齒發生的概念已經有了改變，齲齒既非由特定細菌所產生的疾病，也不是因為細菌量過高而產生，而是因為存在於我們口腔內的原始生物膜發生了致齲性的生態變化[21]，例如常吃甜食或是唾液分泌量太少。所以如果溝隙封填劑能夠與窩縫側壁有良好的化學鍵結，那麼即使溝隙封填劑無法流到窩溝底部，那麼底部殘留的細菌也會因為缺乏外界的營養而死亡，使齲齒失去活性。當然，如果能夠有效流入窩溝底部有助於提升留存率，但在臨床可接受的穿透最大深度 (clinically maximum depth) 下，有良好的密封性 (sealing ability)，並減少聚合收縮所導致的邊緣滲漏更為重要，而非無限制的提升溝隙封填劑的流動性使它能夠流到每個窩溝的底部 (complete penetration)。樹脂型溝隙封填劑相對於玻璃離子體型封填劑而言有更好的側壁貼附性，因此更適合用來當作永久溝隙封填劑。

有良好的密封性其實就是在材料與側壁結合的交界面不要產生微滲漏 (microleakage) 並且要增加黏著的強度。關於影響是否會產生微滲漏的因素包括材料聚合收縮的程度 (material shrinkage)，是否有唾液或食物殘渣影響鍵結強度，以及從牙科高速手機滲出的潤滑油可能會使黏著力降低。所以良好的窩溝封填必須選擇聚合收縮量較少，填料含量較多的溝隙封填劑，且在封填前必須有效清除齒面汙穢。

關於如何增加黏著的強度，除了在進行窩溝封填前一定會先用浮石粉打磨牙齒表面以清除唾液和食物殘渣外，關於窩溝的表面處理方式也有許多種，像是利用氧化鋁粒子進行噴砂，或是用磷酸進行酸蝕，但是結論並不一致。

James[22]在 2007 年發表的研究中利用五種不同的溝隙封填材料、兩種不同的



表面處理方式(pumice prophylaxis、air abrasion)、四種不同的窩溝型態(U、V、Y1、Y2)比較此三種變項是否會影響溝隙封填劑的穿透度和減少微滲漏的發生。此五種溝隙封填材料分別為 AdmiraSeal(含有機改質生醫陶瓷 Ormocer 的溝隙封填劑)、Conseal f(含鋁-氟矽酸鹽粒子的溝隙封填劑)、Triage(玻璃離子體溝隙封填劑)、Aegis(非結晶型磷酸鹽複合物溝隙封填劑)、Delton Opaque(無矽酸鹽粒子溝隙封填劑)。結果顯示溝隙封填劑的性質與窩溝的外型會影響溝隙封填劑的成功率，但是牙齒齒面的表面處理不影響溝隙封填劑的密封性以及對於窩溝的穿透性。在這五種溝隙封填劑中顯示 Aegis 不管其表面處理是透過酸蝕還是噴砂都具有最少的微滲漏，但其穿透率較低。而在溝隙封填劑的穿透率方面，有經過噴砂處理的 Delton opaque 和 Triage 有較好的穿透率，可猜想其原因為玻璃離子體 Triage 具有高度流動性，而 Delton Opaque 因為沒有添加矽酸鹽粒子而使黏稠度下降。此研究也指出窩溝的外型會影響穿透率的高低，但是對於減少微滲漏則沒有影響。

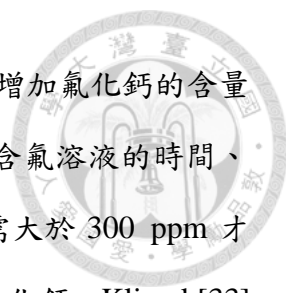
由此可知，對於溝隙封填劑研究的方向，不會著重於分析個別窩溝外型的複雜度與提高溝隙封填劑的流動性來使穿透度升高，而是著重於提升機械強度，增加填料含量，減少聚合收縮以避免微滲漏。未來也能研發出親水性的高分子聚合物[23-26]當作溝隙封填劑的材料，就能增加溝隙封填劑的側壁貼附性使窩溝底部的細菌因得不到養分而自然凋亡。



## 2.2 氟化物的三大抗齲作用

首先是氟離子抑制去礦化之作用：牙釉質是一種低鈣高碳酸鹽類 (calcium-deficient, carbonate-rich) 的氫氧磷灰石 (hydroxyapatite)。在口內酸鹼值穩定的狀態下，牙齒周邊的唾液中有足夠的鈣離子、磷酸根離子、氫氧根離子和氟離子與齒面進行動態平衡來維持齒質的完整性。細菌代謝醣類會產生有機酸，當有機酸解離時會產生大量的氫離子，口內增加的氫離子會與氫氧根離子中和，造成氫氧根離子含量減少，口內酸鹼值下降。除此之外，口內增加的氫離子會使磷酸根離子質子化變成磷酸氫根離子，甚至是磷酸二氫根離子[27]。口內下降的磷酸根離子和氫氧根離子會使氫氧磷灰石分解出鈣離子以維持環境 pH 值的恆定性，所以就產生了齲齒。

已經有大量的研究[28, 29]指出氟離子能夠嵌入牙釉質中使齒質強壯，使牙齒不因有機酸的產生而破壞。但是有研究指出懸浮在牙齒周邊的氟離子才是減少齒質破壞的關鍵，而非嵌入牙齒內的含氟氫氧磷灰石。在 1988 年的時候 Ogaard[30]比較了鯊魚的牙齒和人類牙齒在受到有機酸侵蝕時產生齲齒的嚴重程度，鯊魚的牙齒其牙釉質 99% 的羥基都被氟離子取代，氫氧磷灰石中的氟離子濃度很高 (32000 ppm)，而人類牙齒的牙釉質只有 5% 的羥基被氟離子取代，因此強度相對較弱。結果在致齲模型當中發現，不管是鯊魚還是人類的牙齒都會產生齲齒，且若受試者之前有每天 0.2 % 的氟化鈉漱口時，其牙釉質中礦物質的流失明顯少於鯊魚的牙齒。此項研究即顯示在牙齒周邊的氟離子才是減少齒質破壞的關鍵，而非嵌入牙齒內的含氟氫氧磷灰石。懸浮在牙齒周邊的氟離子是以氟化鈣 ( $\text{CaF}_2$ ) 的形式存在，當口內環境呈現酸性時 (酸鹼值小於 5.5)，氟化鈣沉澱物會與氫氧化鉀 (KOH) 一起解離後釋放出來，而不影響氟化氫氧磷灰石的完整性，因此在牙齒周邊的氟化鈣又叫做氫氧化鉀可溶性氟化物 (KOH-soluble fluoride)[31]。氟化鈣的存在對於預防齲齒不可或缺，那麼如何才能增加牙齒周邊氟化鈣的含量呢？

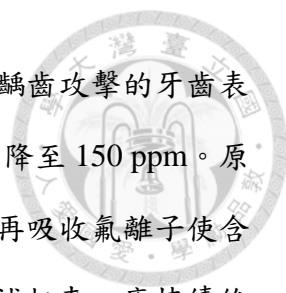


Saxegaard 和 Rolla[32]在 1988 年的系統性回顧中提出若要增加氟化鈣的含量必須降低含氟溶液的酸鹼值、增加氟化物的濃度、增加暴露於含氟溶液的時間、酸蝕牙釉質以提供較多的鈣離子來源。在中性環境中，氟濃度需大於 300 ppm 才能形成氟化鈣；在酸性環境中，氟濃度僅需 100 ppm 即可形成氟化鈣。Klimek[33]在 1998 年發表的研究中也顯示酸性(PH=5.5)的氟化胺(amine-fluoride)牙膏相對於中性氟化納牙膏在四個禮拜的施予後能產生更多的氟化鈣。牙齒周邊的氟化鈣外包裹著磷酸氫鹽、蛋白質以及其他物質所形成的保護層，當口內環境呈現酸性時，磷酸氫鹽的量會減少，使得氟化鈣內的氟離子釋放出來，減少牙齒的去礦化並增加再礦化。

因此，我們不能期待當牙齒受到細菌代謝的有機酸攻擊時，嵌入氫氧磷灰石內的氟離子會釋放出來保護牙齒，而是沉積於牙齒周邊的氟化鈣層會第一時間與酸性環境接觸，釋放氟離子；同時，在酸性環境中，也因為唾液、菌液以及牙釉質中的鈣離子更容易解離而沉積更多的氟化鈣來保護牙釉質。

氟離子促進再礦化之作用:氟離子有促進再礦化的能力。當口內細菌代謝醣類產生有機酸時，會使口中環境的酸鹼值降低，此時需要更多的氫氧根離子、磷酸根離子和氟離子來維持口中的酸鹼值為中性。因此，牙齒的齒質會在氟化鈣解離代償完後受到破壞。受到破壞的牙釉質為低鈣高碳酸鹽類的氫氧磷灰石，而碳酸鹽類含量較少，結構較穩定的含氟氫氧磷灰石(fluorhydroxyapatite, FHAP)和含氟磷灰石(fluorapatite, FHP)則需要口內酸鹼值小於 4.7 時才會受到破壞[5]。反之當口內酸鹼值增加時，含氟氫氧磷灰石會率先形成。因此，我們可以觀察到當口內環境酸化時，牙齒的礦化組成會發生改變，低鈣高碳酸鹽類的氫氧磷灰石會減少，高鈣低碳酸鹽類的含氟氫氧磷灰石會增加；受到齲齒細菌攻擊過後去礦化又再礦化的牙齒反而更加堅硬，所以氟離子有促進再礦化的能力。

一般來說，健康的牙釉質大約只有嵌入 2% 的氟，因此在牙釉質的深處其氟含量只有 100 ppm。Weatherrell[34]在 1977 年的研究中提出齲齒的氟含量模型，在受



到齲齒攻擊的牙齒表面其氟含量急劇提升至 1100 ppm，未受到齲齒攻擊的牙齒表面其氟含量卻只有 450 ppm，隨著越接近齲齒的中心，氟含量下降至 150 ppm。原因是齲齒脫鈣再礦化後的表面(white-spot lesion)孔洞較多，容易再吸收氟離子使含氟量增加，所以現在對於齲齒的脫鈣表面不宜去除，也不要填補起來，應持續維持口腔清潔。

氟離子抑制細菌生長的可能性: Li 和 Bowden[6]在 1994 年的研究中指出當口內環境的酸鹼值下降時，氟離子會轉換成氫氟酸運送進細菌中，在細菌的細胞質內會再解離成氫離子和氟離子，造成細胞內氟離子的濃度上升，同時也會因為氫離子濃度上升造成細胞內酸化。過度酸化會影響細胞的葡萄糖運輸，使細菌死亡。雖然此發現可以在簡單細胞模型中被觀察到，但是因為口內的氟離子濃度太低，很難說氟離子在口內也會有類似的細菌抑制反應；另外一個被質疑的理由是氫氟酸的解離常數為 3.14，意思是在這個酸鹼值下，口內有一半的氟離子會轉變為氫氟酸，而在酸鹼值為 5 的時候，只有 1%的氟離子轉變為氫氟酸，其他都是氟離子，而因為口內的唾液有緩衝作用，酸鹼值低於 5 的情況存在時間不長，因此是否會影響細菌的葡萄糖代謝反應很難說。

Van Der Mei[35]在 2008 年的研究中發現若在牙齒表面以含氟化合物作預先處理，細菌的黏著力和貼附能力會下降，但關於此說法有些學者並不認同。有一點值得注意的是，若細菌長期暴露在含氟環境中，對於氟離子的抵抗能力會增強，但也代表口內的產酸或耐酸細菌數量減少，口內的菌叢組成較不具有致齲性[36]。

大體上來說，到目前為止，對於氟離子是否能抗菌的說法並不一致，但對於氟離子能抑制去礦化，促進再礦化的說法是受到認同的。



### 2.3 幾丁聚醣的抗菌能力

幾丁聚醣是由幾丁質在熱強鹼的環境下去乙醯基後而產生的物質。幾丁質的結構為  $\beta$ -1,4-linked N-acetyl-D-glucosamine，而幾丁聚醣的結構為 (1-4)-2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan。這兩種物質結構上的差異主要來自於葡萄糖胺 (glucosamine units) 上的胺基是否有接上乙醯基。當幾丁質透過熱強鹼浸泡、微生物代謝或酵素降解的方式去除了乙醯基，就會形成幾丁聚醣，抗菌能力增加，但機械強度降低，因此幾丁聚醣的去乙醯化程度 (degree of deacetylation, DD%) 常被認為是影響幾丁聚醣抗菌能力強弱的因素之一[37]。當幾丁聚醣去乙醯化程度的程度大於 50% 的時候，即可溶於酸性水溶液當中，胺基質子化成銨基，變成帶電粒子，進而增加其抗菌能力。

目前關於幾丁聚醣抗菌的假說包括以下四點：第一點為帶正電的幾丁聚醣會與細菌細胞膜表面帶負電的蛋白質結合，改變細胞通透性，使細胞膜裂解[38]。在 2015 年的一篇研究中，Li[39] 使用一種幾丁聚醣的衍生物 (O-quaternary ammonium N-acetylthiourea chitosan) 來觀察大腸桿菌在給予此種衍生物後，穿透式電子顯微鏡下的結構變化。發現給予幾丁聚醣衍生物前，其細胞膜完好沒有破損，所以看不到任何細胞內含物的溢出。但加了幾丁聚醣衍生物後，在穿透式電子顯微鏡下看到細胞膜變得不平整不規則，內含物溢出，且細胞外基質湧入細胞內造成細胞死亡。第二點為水解後的細胞結構碎片擴散進入細胞內部，與去氧核糖核酸 (DNA) 交互作用，進而影響了信使核糖核酸 (mRNA) 與蛋白質的生成[40]。第三點為幾丁聚醣會透過螯合與細菌生長有關的金屬離子或營養物，使細菌死亡[41]。第四點是幾丁聚醣可能會在細菌表面形成一層聚合物薄膜，阻擋支持細菌成長的營養物或氧氣進入菌內[40]。

幾丁聚醣的抗菌能力受到許多因素影響，包括環境 pH 值、幾丁聚醣的分子量大小、濃度、對抗的細菌種類、去乙醯化程度與幾丁聚醣的來源 (甲殼類或真菌類)，



以下會分別探討。

若環境中的酸鹼值低於 6，幾丁聚醣就會離子化成正電粒子，迅速與細菌表面帶負電的蛋白質、陰電性多醣體、脂肪酸、膽酸或磷脂質結合，造成細菌內含物的溢出。而若環境的酸鹼值大於 6，幾丁聚醣就會去離子化而沉澱。Fernandez-Saiz[42]在 2009 年的時候觀察在不同環境酸鹼值，6.2 和 7.4 下，chitosonium acetate 抗金黃色葡萄球菌的效果。發現在酸鹼值 6.2 下的抗菌效果較好，原因是此種聚合物的解離常數為 6.4，因此在酸鹼值 6.2 的環境中此種聚合物帶有正電荷的比例接近 75%，而在酸鹼值 7.4 的環境中卻只有 10%的聚合物帶有電性，抗菌效果較差。同樣的結果也在 2014 年 Kulikov[43]對於幾丁聚醣抗克雷伯氏肺炎菌的結果，以及 2004 年 Devliegher[44]觀察不同環境酸鹼值(4 或 6)對於天然幾丁聚醣抗白色念珠菌的研究中發現。齲齒罹患率越高的小朋友，通常因頻繁吃甜食造成口內的酸鹼值較低，剛好對於幾丁聚醣的抗菌效果有所幫助。

對於不同大小分子量幾丁聚醣的抗菌效果莫衷一是。幾丁聚醣的分子量大小根據 SIGMA-ALDRICH 公司的產品簡介，50 kDa - 190 kDa 為低分子量幾丁聚醣；190 kDa - 310 kDa 為中分子量幾丁聚醣；310 kDa - 370 kDa 為高分子量幾丁聚醣，還有一些是短鏈狀的寡幾丁聚醣(oligochitosan)[45]。高分子量的幾丁聚醣因分子量太大而無法穿透細胞膜，會堆積在細胞膜上方，使營養物無法進入細菌內，改變細胞通透性變差，造成細菌裂解死亡。而低分子量的幾丁聚醣可穿透細胞膜與去氧核糖核酸結合，抑制信使核糖核酸的製造，細菌一樣會死亡。關於低分子量或是高分子量的細菌有較好的抗菌效果則必須考慮到細菌的種類。Ye[46]在 2008 年的研究中塑膠薄膜中加入低分子量或中分子量的幾丁聚醣抑制李斯特菌，結果發現低分子量的幾丁聚醣薄膜相對於中分子量的幾丁聚醣薄膜有更好的抗菌效果。但 Li[47]在 2010 年的研究中利用三種不同分子量大小(3、50、100kDa)的幾丁聚醣測試對於大腸桿菌的抗菌效果，發現 50kDa 的抗菌效果竟比 3kDa 的抗菌效果好。因此若想測試不同分子量大小的幾丁聚醣對於細菌的抗菌效果，不可一概推論，

仍須定量計算菌落形成單位或是測定吸光值才能得知，本研究選擇的是中分子量的幾丁聚醣(190 kDa - 310 kDa)。

關於幾丁聚醣濃度對於細菌的抗菌效果並不是越高越好。低濃度的幾丁聚醣與低分子量的幾丁聚醣一樣，被認為能穿透細胞膜造成細胞通透性增加，細胞裂解。然而，高濃度的幾丁聚醣會包裹住細菌表面，使細胞運輸受阻，除此之外，因質子化的幾丁聚醣帶有正電，會使得細菌表面帶有正電荷而互相排斥，使其無法聚集。Reesha[48]等學者在 2015 年製造出含有 0%、1%、3%、5% 幾丁聚醣的低分子量聚乙烯膜(low density polyethylene matrix, LDPE)，用來包裹吳郭魚使其保鮮，測量 7 天與 14 天後大腸桿菌的數目多寡藉以得知幾丁聚醣的有效抗菌濃度。結果顯示若沒有加入幾丁聚醣的聚乙烯膜，在包覆吳郭魚的第 7 天，大腸桿菌已大量增生而無法食用，而若含有 1% 和 3% 幾丁聚醣的聚乙烯膜能抗菌直達第 15 天仍能食用；其研究結果顯示 3% 幾丁聚醣聚乙烯膜相對於其他濃度的幾丁聚醣聚乙烯膜有更良好的物理特性和抗菌效果。Xiaorong[49]在 2005 年發表的研究中以不同含量的交聯劑和幾丁聚醣用來評估對於棉織物的抗菌效果，結果顯示幾丁聚醣用於棉織物的抗菌效果其濃度最好介於 0.5~0.75% 之間，超過 1% 的抗菌效果即變差，且分子量最好介於 1.5~5kDa。以上兩個研究都別指出了幾丁聚醣的抗菌效果並不是濃度越高，效果越好。但也有學者做出不同的研究結果，認為高濃度的幾丁聚醣才有抗菌效果。Liu[50]在 2004 年的研究中利用不同分子量大小(55000-155000Da)、不同含量(20、50、100、200、500、1000 ppm)的幾丁聚醣用來評估幾丁聚醣的濃度與分子量對於大腸桿菌的抗菌效果；結果顯示分子量大小不影響抗菌效果，但 200 ppm 以上的幾丁聚醣才能達到抗菌的能力，因其會使細菌凝聚後進而除去它們。低濃度如 20 ppm 的幾丁聚醣反而無法抗菌，因細菌仍然無法聚集而四處分散，大量複製。筆者認為以上研究的不同觀點主要在於不同含量幾丁聚醣的抗菌效果是否有天花板效應(ceiling effect)的存在以及幾丁聚醣的濃度大概多低就沒有了抗菌效果，對於不同的細菌又有不同的有效濃度範圍。確實還






需要更多的研究。

關於幾丁聚醣用來抑制格蘭氏陽性菌還是格蘭氏陰性菌比較有效的研究結果都不太一樣。有些研究顯示幾丁聚醣對於格蘭氏陽性菌的效果比較好也是因為靜電(electrostatic)交互作用，格蘭氏陽性菌細胞壁上有很厚的肽聚醣層(peptidoglycan layer)，富含磷壁酸(teichoic acid)，磷壁酸骨架上有許多磷酸基(phosphate group)，帶有強烈的負電，因此能夠與帶正電的幾丁聚醣緊密結合，造成細胞通透性增加，細菌死亡。Chung[51]學者在 2004 年所做的研究卻發現幾丁聚醣對於格蘭氏陰性菌的抗菌效果優於格蘭氏陽性菌。本次研究所使用的菌種為轉醣鏈球菌，屬於格蘭氏陽性菌。


目前對於去乙醯化程度越高，幾丁聚醣的抗菌效果越好的說法，學術界的研究結果大部分都支持。去乙醯化程度越高，胺基的形成量愈多，越能與細菌表面接觸結合造成細菌裂解，使細菌死亡。Byun[52]於 2013 年的研究中提出去乙醯化程度越高的幾丁聚醣(g-chitosan, DD=81.56%)相對於去乙醯化程度越低的幾丁聚醣(e-chitosan, DD=62.71%)有更好的抗菌效果。關於幾丁聚醣的來源也有學者比較其抗菌作用的強弱，主要是針對幾丁聚醣是來自於甲殼類如螃蟹、小龍蝦、魷魚或是真菌類如香菇柄(shiitake stipes)。Jeihanipour[53]在 2007 年所做的研究中比較了真菌類幾丁聚醣與甲殼類幾丁聚醣對於大腸桿菌、克雷伯氏菌以及金黃色葡萄球菌的抗菌效果，結果發現真菌類幾丁聚醣的抗菌效果弱於甲殼類幾丁聚醣，對於格蘭氏陽性菌的抗菌效果優於格蘭氏陰性菌。但 Chien[54]在 2015 年所做的研究中卻認為來自於香菇柄的幾丁聚醣相較於來自於螃蟹的幾丁聚醣有更好的抗菌效果，即使經過純化之後兩者的抗菌能力都增加，但來自於香菇柄的幾丁聚醣的抗菌效果仍高於來自螃蟹的幾丁聚醣。關於幾丁聚醣用來抗菌是要取自真菌類還是甲殼類的問題還是得同時考慮到所抑制的細菌種類、幾丁聚醣的分子量大小以及去乙醯化程度高低所造成的影響，需多方面思考才能決定。

幾丁聚醣用於牙科材料的範疇很廣，因其具有生物活性，可以對生物的有利



或不利影響。也具有抗菌效果、生物相容性，且能與許多物質接枝混合，使幾丁聚醣有更好的抗菌效果。關於幾丁聚醣在牙科的應用於 2017 年的一篇回顧性文章 [55] 中提到能形成載體並攜帶藥物如甲硝唑(Metronidazole)、氯己定、耐絲菌素(nystatin)，局部施予於牙周組織抗菌和治療口腔粘膜炎，或當作載體攜帶釉蛋白(amelogenin)修復牙釉質結構；可以與氫氧磷灰石、磷酸鈣(tricalcium phosphate)結合以增加強度，做為引導組織再生(guided tissue regeneration, GTR)或引導骨再生(guided bone regeneration, GBR)的再生膜，形成組織再生所需的支架，或是在牙本質牙髓組織再生的機制中當做牙髓幹細胞攀附的支架；可以加到牙膏中預防酸蝕，因為在酸性環境下帶有正電荷，所以能結合到帶有負電荷的牙釉質表面以及唾液薄膜(salivary pellicle)上，形成保護層避免齒質損壞；人工牙根方面也將幾丁聚醣當做塗層用於重大或特殊疾病的患者，減少植體周圍炎的發生率，並能夠改變植體的彈性係數，避免植體與齒槽骨表面接觸區的應力集中；最後就是能加到各種牙科填補材像是玻璃離子體中增加抗彎強度，或是牙科用樹脂中提供抗菌的效果。

Mahapoka[10]於 2012 年將 1、1.5、2、2.5%的幾丁聚醣加入到雙酚 A-甲基丙烯酸縮水甘油酯(Bis-GMA)和聚四亞甲基醚二醇三乙二醇二甲基丙烯酸酯(TEGDMA)當中，比較含不同含量的幾丁聚醣樹脂其抑制轉糖鏈球菌效果和機械性質，抗菌實驗為測量抑菌圈和計算菌落形成單位，機械性質方面為測量聚合深度、維克式硬度試驗以及利用傅立葉紅外線光譜儀觀察樹脂轉化率，結果發現至少要 2%幾丁聚醣才有明顯的抗菌效果，以抑菌圈大小來說 2%的幾丁聚醣有 10mm，但小於 2%的幾丁聚醣與控制組的抑菌效果一樣，只有 5mm，也就是原來試片大小；以菌落形成單位來說，2%或以上的幾丁聚醣至少有 72.2%細菌減少量，少於 2%的幾丁聚醣只有 31.2~39.2%的細菌減少量，而控制組的細菌減少量為 13.7%。類似的研究結果也出現於 Rajabnia[11]在 2016 年發表的研究中，其比較含 1、2、3、4、5%的幾丁聚醣樹脂在 3、6、9、24、48 小時和 1、3 個月抑制轉糖鏈球菌的效果，



結果發現在抑菌 3 小時後，2% 以上的幾丁聚醣樹脂已有明顯的抗菌效果，4% 以上的抗菌效果更優於 2% 和 3% 含幾丁聚醣樹脂，因此我們知道若要在牙科用樹脂中加入幾丁聚醣，至少要 2%。關於分子量大小方面，Kim[56]在 2013 年比較含不同分子量的幾丁聚醣樹脂其對轉糖鏈球菌之抗菌能力，偵測抗菌能力的方式為測量吸光值和計算菌落形成單位，結果發現分子量大小不影響抑制轉糖鏈球菌的能力，但是在菌落形成單位上，雖然沒有統計上顯著差異，但中分子量的幾丁聚醣相較於低與高分子量的幾丁聚醣有最少的菌落形成單位。

為了增強幾丁聚醣的抗菌效果或其功能性，許多學者將幾丁聚醣改質。Gomez-Estaca[57]在 2010 年利用丁香精油結合明膠-幾丁聚醣薄膜比較純明膠-幾丁聚醣薄膜對於冷凍魚肉的抗菌保鮮效果，結果顯示丁香精油結合明膠-幾丁聚醣除了能夠抗菌還能夠減少肉類敗壞所產生的氮氣，因此對於食物的保存期限有延長的效果。幾丁聚醣的結構中富含許多羥基和胺基，因此能夠與許多金屬離子形成複合物增加抗菌效果。Sanpui[58]在 2008 年利用奈米銀粒子結合幾丁聚醣後發現只要 2.15% 的含奈米銀粒子-幾丁聚醣就能有效抑制大腸桿菌。Li 等學者利用奈米銀粒子與氧化鋅與幾丁聚醣結合測試抗菌效果，奈米銀粒子-氧化鋅幾丁聚醣相較於只加氧化鋅或奈米銀粒子的幾丁聚醣都有更好的抗菌效果。Yang[59]在 2015 年利用液態二氧化氯(aqueous chlorine dioxide)與幾丁聚醣結合，試圖冷凍儲存竹筍，他們的結果顯示 28mg/L 的二氧化氯-幾丁聚醣抑制酵素代謝造成的黃化，並且減少好氧細菌與酵母菌的增生。

本研究利用氟化鈉將幾丁聚醣改質加入到牙科樹脂中，研發一種能釋放氟離子又能抗菌的溝隙封填劑，改善傳統含氟溝隙封填劑無抗菌效果的部分。

### 第三章 具體目標



總體而言，本研究擬達成之具體目標為：

1. 製備奈米氟幾丁聚醣和奈米級矽烷化二氧化矽
2. 利用傅立葉紅外線光譜儀與動態光散射粒徑分析儀測知奈米氟幾丁聚醣的結構與粒徑
3. 藉由阿爾瑪藍細胞增殖及毒性檢測試驗與菌落形成單位的測量比較奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的抗菌能力
4. 利用 Cell Counting Kit-8 和乳酸脫氫酶試驗比較奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的生物相容性
5. 藉由 ISO 規範與美國牙科協會標準比較奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的機械性質
6. 利用離子層析儀比較奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑釋放與再吸收氟離子的能力

## 第四章 實驗材料與方法



研發奈米氟幾丁聚醣樹脂 (composite resin containing chitosan/fluoride nanoparticle, abbreviated as CF)，觀察其結構與粒徑、抗菌能力、生物相容性、機械特質和氟釋放與再吸收的能力；並與市售常見的 Clinpro™ 溝隙封填劑比較其性質，試圖研發一種既能抗菌又能有效釋放氟離子的溝隙封填劑。

### 4.1 實驗架構

本研究包括六個部分，第一個部分是先製備出奈米氟幾丁聚醣和奈米級矽烷化二氧化矽的樣品，並根據重量比與雙酚 A-甲基丙烯酸縮水甘油酯、三乙二醇二甲基丙烯酸酯、樟腦醌、對二甲胺基苯甲酸乙酯完成混合，製成奈米氟幾丁聚醣樹脂。第二個部分是以傅立葉紅外線光譜儀 (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR)偵測加氟前後幾丁聚醣的結構變化，並以動態光散射粒徑分析儀及 z 電位分析儀 (Dynamic Light Scattering/Zeta Potential Analyzer, DLS)分析奈米氟幾丁聚醣的粒徑大小。第三部分為培養轉糖鏈球菌 (streptococcus mutans, S.mutans) 以得知其生長曲線，並利用吸光值和菌落形成單位測試不同比例的奈米氟幾丁聚醣與市售產品是否有抗菌性，最後用掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM)觀察材料表面的細菌形態與數量。第四部份是培養出纖維母細胞 (fibroblast)，觀察不同含量的奈米氟幾丁聚醣萃取液的細胞存活率、細胞毒性的高低，並且在光學顯微鏡下觀察細胞密度與細胞形態。第五個部分是比較奈米氟幾丁聚醣樹脂與市售產品之間的機械性質，如聚合深度、表面硬度、徑向抗拉/壓強度、抗彎強度與流動性。第六個部份是進行氟釋放與氟再吸收的實驗。



## 4.2 實驗材料與儀器

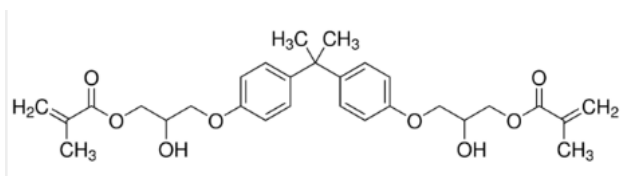
### 4.2.1 實驗材料

1. 雙酚 A-甲基丙烯酸縮水甘油酯 (Bisphenol A glycerolate dimethacrylate ,

Bis-GMA), 分子量 512.59

廠商：SIGMA-ALDRICH

CAS Number：1565-94-2

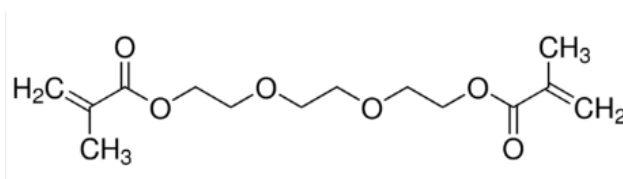


2. 聚四亞甲基醚二醇三乙二醇二甲基丙烯酸酯 (Triethylene glycol dimethacrylate ,

TEGDMA), 分子量 286.32

廠商：SIGMA-ALDRICH

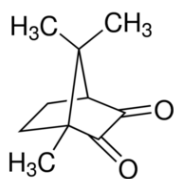
CAS Number：109-16-0



3. DL-樟腦醌 (DL-Camphorquinone, CQ), 分子量 166.22

廠商：SIGMA-ALDRICH

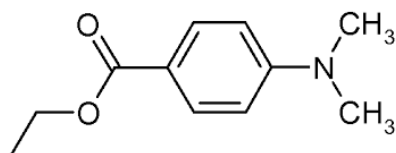
CAS Number：10373-78-1



4. 對二甲胺基苯甲酸乙酯 (Ethyl 4-dimethylaminobenzoate, EDMAB), 分子量 193.24

廠商：SIGMA-ALDRICH

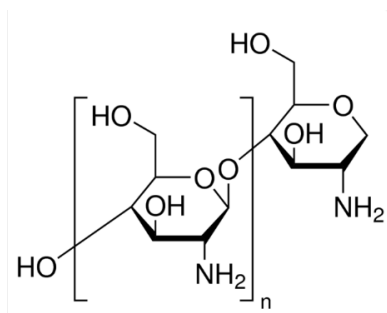
CAS Number：10287-53-3



5. 幾丁聚醣 (chitosan, medium molecular weight, 75~85% deacetylated)

廠商：SIGMA-ALDRICH

CAS Number：9012-76-4



6. 氟化鈉 (sodium fluoride), 分子量 41.99

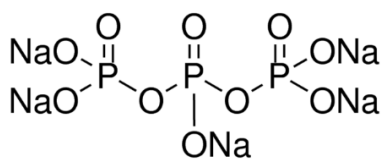
廠商：帝一化工

CAS Number：7681-94-4

7. 三聚磷酸鈉 (sodium tripolyphosphate), 分子量 367.86

廠商：帝一化工

CAS Number：7758-29-4



8. 奈米二氧化矽 (Nano Silica,  $\text{SiO}_2$ )

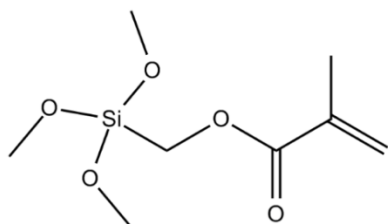
廠商：CHOKO CO., LTD.

CAS Number：14808-60-7

9. 3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基矽烷 ( $\gamma$ -Methacryloxypropyltrimethoxysilane, MPS)

廠商：XIAMETER

CAS Number：54586-78-6



#### 4.2.2 實驗儀器

1. 二極體光固化機 (LED curing light), Motion LED-320D, Taipei, Taiwan。
2. 傅立葉轉換紅外線光譜儀 (Fourier Transform Infrared Spectrometer), JASCO FT/IR-4200, Tokyo, Japan。
3. 微硬度計 (Micro Hardness Tester), HMV-2, Shimadzu, Kyoto, Japan。
4. 冷凍乾燥機 (Freeze Dryers), FDU-1200, EYELA, Tokyo, Japan。
5. 萬能試驗機 (Universal testing machine), Instron 5566, Canton, MA。



- 
6. 酵素免疫分析測讀儀(Enzyme-linked immunosorbent assay reader, ELISA reader) ,  
Biotek Synergy HT, Taipei , Taiwan 。
  7. 掃描式電子顯微鏡 ( Scanning electron microscope , SEM ) , Hitachi TM-3000  
tabletop SEM , Tokyo , Japan 。
  8. 觸控式全自動操作鍍金機 (Touch screen Full automatic Sputter Coater) , Q150R  
Plus - Rotary Pumped Coater , Quorum , Lewes , England
  9. 精密切割機 (Precision cutter) , IsoMet<sup>TM</sup> low speed precision cutter , Buehler ,  
Illinois , USA 。
  10. 多角度奈米粒徑儀 (Dynamic Light Scattering/Zeta Potential Analyzer , DLS) ,  
Zetasizer Ultra , Malvern
  11. 電磁加熱攪拌器 (Stirrers / Hot Plate) , Corning PC-620D , NY , USA
  12. 微量分析天秤 (Electron balance) , GH-200 , DOGGER , Taiwan
  13. 數位振盪器 (Digital rotator) , DSR2100P , Digisystem Laboratory Instruments Inc. ,  
Taipei , Taiwan
  14. 微量高速冷凍離心機 (Micro high speed refrigerated centrifuge) , Mikro-22R ,  
Hettich , Tuttlingen , Germany
  15. 桌上型離心機 (Compact Table Top Centrifuge) , KUBOTA 2420 , Tokyo , Japan
  16. 熱循環恆溫水浴槽 (Circulator Baths) , FIRSTEK B206 , FIRESTEK , Taipei ,  
Taiwan
  17. 倒立三眼生物顯微鏡 (Inverted microscope) , SAGE Vision IVM-1A , SAGE  
VISION CO., LTD , Taipei , Taiwan
  18. 二氧化碳培養箱直熱氣套式 (Celculture CO<sub>2</sub> Incubator) , ESCO , Taoyuan ,  
Taiwan

19. 微處理器控制系統 (Microprocessor control system) , Sentinel.Gold , ESCO ,  
Taoyuan , Taiwan

20. 桌上型恆溫振盪培養箱 (The Orbital Shaking incubator-Benchtop type) ,  
LM-400D , Yihder , Taipei , Taiwan



#### 4.3 實驗方法

##### 4.3.1 奈米氟幾丁聚醣、奈米級矽烷化二氧化矽及奈米氟幾丁聚醣樹脂的製備

###### A. 奈米氟幾丁聚醣的製備

1. 以 5 毫升的 98% 冰醋酸加到 500 毫升的去離子水中, 以酸鹼值測定計 (PH meter) 確定酸鹼值在 4 附近
2. 用微量分析天秤加入 5 克的幾丁聚醣, 在 60°C 下利用電磁加熱攪拌器攪拌 5 小時, 再轉至室溫下攪拌 12 小時
3. 加入 15 克的氟化鈉攪拌 0.5 小時
4. 加入 0.38 克的三聚磷酸鈉攪拌 0.5 小時
5. 在室溫下沉澱一天
6. 以桌上型離心機在 1000 rpm 下離心大約 5 次
7. 冰在 -20°C 的冰箱中大約一天
8. 以冷凍乾燥機乾燥一天後再研磨收集

###### B. 奈米級矽烷化二氧化矽的製備

1. 在燒杯中盛入 75ml , 75% 的酒精
2. 以冰醋酸調整酸鹼值到 3.5~4



3. 加入 0.75 克的 3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基矽烷
4. 慢慢加入 15 克的奈米二氧化矽，放到電磁加熱攪拌器上攪拌一天
5. 以桌上型離心機在 4000 rpm 下離心數次後放到 50°C 烘箱中烘一整天
6. 研鉢研磨後放入離心管中儲存

#### C. 奈米氟幾丁聚醣樹脂的製備(表 1)

1. 以重量比 70:30 的比例將「雙酚 A-甲基丙烯酸縮水甘油酯」和「聚四亞甲基醚二醇三乙二醇二甲基丙烯酸酯」配成一罐樹脂基質
2. 樹脂基質：佔總重量的 78.4%
3. 光起始劑組合：「DL-樟腦醃」和「對二甲胺基苯甲酸乙酯」各佔總重量的 0.8%，因此樹脂基質和光起始劑的總重量比為 80%
4. 填料組合：配製 0%、2%、4% 的填料組合。填料組合為「奈米氟幾丁聚醣」和「奈米級矽烷化二氧化矽」，填料的重量比都固定在 20%。因此 0% 的填料組合就是不加奈米氟幾丁聚醣，僅加入 20% 的奈米級矽烷化二氧化矽；2% 的填料組合就是 2% 奈米氟幾丁聚醣合併 18% 的奈米級矽烷化二氧化矽；4% 的填料組合就是 4% 奈米氟幾丁聚醣合併 16% 的奈米級矽烷化二氧化矽
5. 利用微量分析天秤，按照以上重量百分比在塑膠研鉢上攪拌完成樣品製作
6. 若需倒模時需放到電磁加熱攪拌器上加熱到 45°C 以暫時提高流動性，避免倒模的時候氣泡的陷入，影響樣品機械性質

#### 4.3.2 奈米氟幾丁聚醣的結構與粒徑分析

##### A. 幾丁聚醣與奈米氟幾丁聚醣的結構分析



1. 結構分析是利用傅立葉紅外線光譜儀利用減弱式全反射傅立葉紅外線光譜儀 (FTIR-ATR) 來定性偵測官能基團，操作條件如下：
  - 晶片：ZnSe
  - 掃描波長：4000~400  $\text{cm}^{-1}$
  - 解析度：4  $\text{cm}^{-1}$
  - 掃描次數：16
2. 實驗所使用的方法為 KBr 錠劑法，首先會先製作純 KBr 錠片，放入樣品槽中掃描當作背景值。再製作混和幾丁聚醣/奈米氟幾丁聚醣與 KBr 的錠片，放入養品槽中掃描，減去背景值即可得到不同樣品的傅立葉紅外線光譜圖。製作樣品錠片的方式如下：
3. 取約 1mg 幾丁聚醣/奈米氟幾丁聚醣放入瑪瑙研钵內磨成細粉末，才有好的透光度。
4. 放入 150~200mg KBr 與試料充分混合，研磨成粉末
5. 取出錠劑成型器，將一只鏡面板朝上，輕放入壓片器內筒中
6. 用刮刀將磨好之試料約 10~20mg 平均分散於內筒內之鏡面板上
7. 樣品平鋪適當，再置入押棒，下壓至粉末處並緩慢旋轉
8. 移出押棒，將另一只鏡面板朝下，輕放於試料
9. 將 O-ring 置入，將押棒由下壓入
10. 安裝整組壓片器於油壓機上，加壓至 7 噸 (ton)，然後維持 3 分鐘左右。洩去油壓機之壓力
11. 取下整組壓片器，卸下底座與 O-ring
12. 試料錠片可用刮刀輕輕將其推出。



13. 小心將錠劑取出輕放於錠劑架上，須完整覆蓋整個錠劑架。便可拿到儀器上去測定。

#### B. 奈米氟幾丁聚醣的粒徑分析

1. 粒徑測量則是使用多角度奈米粒徑儀，將新鮮純化的奈米氟幾丁聚醣以 5 倍體積的 1% 醋酸水溶液稀釋，反覆吸排分散
2. 粒徑測量使用四面光石英比色管
3. 儀器設定溫度為標準溫度 25°C
4. 光散射角以側相角 90°為主，雷射波長 633 nm
5. 分布分析模式選用非負線性回歸的 General Purpose
6. 平衡時間為 120 秒，進行三重複測試

#### 4.3.3 奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌特性


本實驗所使用的菌種為轉糖鏈球菌 (*Streptococcus mutans*, GS-5)，為格蘭氏陽性球菌。由國立台灣大學醫學檢驗暨生物技術學系所鄧麗珍教授提供。

##### A. 製作轉糖鏈球菌的固態培養基與液態培養基

1. 本研究製作的培養基基底為腦心浸萃培養基 (brain heart infusion broth, BHI) 加上 1% 的酵母菌萃取物 (yeast extract)。
2. 在錐形瓶和血清瓶中各裝 400ml 的蒸餾水
3. 在微量分析天秤上依照以下的重量加入腦心浸萃培養基、酵母菌萃取物和瓊脂精 (agarose)

400ml 固態培養基/400ml 液態培養基

BHI(37g/L)	14.8 g
1% yeast extract	4 g
Agarose	6 g (固態才要加，液態不用)

- 
4. 將鋁箔紙封住瓶口(注意不要封緊，才能在高溫高壓消毒的時候讓水氣跑進去滅菌)，鋁箔紙上貼上滅菌指示膠帶
  5. 將固態培養基溶液和液態培養基溶液放到高壓水氣滅菌機中滅菌 20 分鐘，壓力  $1.2\text{kg/cm}^2$ ，溫度約  $121^\circ\text{C}$ 。接下來冷卻 1.5 小時後，將鋁箔紙沿著瓶口封緊。取出液態培養基和固態培養基，液態培養基在室溫下冷卻即可。
  6. 在固態培養基微熱的時候，在每個 15 cm dish 上放上 20ml 的培養基，靜置凝固冷卻後，冰入  $4^\circ\text{C}$  的冰箱保存。

#### B. 解凍細菌與塗佈細菌兩次

1. 從  $-80^\circ\text{C}$  的冰箱中取出 GS-5 細菌的冷凍管在室溫下回溫 1.5 小時
2. 將接種環沾取菌液，以三區 Z 型塗抹的方式在固態培養基上塗上細菌
3. 接下來倒過來放，以 paraffin 膠帶將培養基邊緣壓密實
4. 放入厭氧箱，厭氧箱中需放一包厭氧包和一條厭氧指示帶，若呈現厭氧的環境，厭氧指示帶會從藍色變成明顯的白色
5. 將厭氧箱放入  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的環境中培養 48 小時
6. 待細菌菌落長出後，以接種環挖取固態培養基上的細菌
7. 同樣以三區 Z 型塗抹的方式在固態培養基上塗上細菌，塗抹兩盤後同樣倒過來放，以 paraffin 膠帶將邊緣壓密實，放到厭氧箱中在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的環境中培養 48 小時，再放入  $4^\circ\text{C}$  的冰箱中降低活性。

#### C. 冷凍保存在固態培養基上活化的細菌



1. 將 50ml 離心管、液態培養基和甘油 (glycerol)噴上酒精後，以噴槍瓦斯燈將液態培養基過火後，分裝培養基於離心管中
2. 拿取冷凍管，將蓋子打開後放入 850 $\mu$ l 的液態培養基，再以極慢速抽取 150 $\mu$ l 的甘油以預防倒吸，加入冷凍管內
3. 將固態培養基上活化的細菌「全數」刮下，在冷凍管內攪散 (須留一顆菌落在固態培養基上用來之後馴化細菌的實驗)
4. 把留單一菌落的固態培養基以 paraffin 膠帶封好後，重新放回 4°C 的冰箱
5. 將冷凍管過火後，放回 -80°C 的冰箱中保存

#### D. 固態培養基馴化與液態培養基馴化細菌

1. 先固態培養基馴化細菌，以接種環勾取單一菌落。
2. 以 1000 $\mu$ l 的微吸管取 4ml 的液態培養基到培養管中
3. 將單一菌落攪入。以 paraffin 膠帶將開口封住
4. 放入厭氧箱中，等待 12 小時後放入 4°C 的冰箱
5. 接下來液態培養基馴化細菌，將液態培養基過火後
6. 以 1000 $\mu$ l 的微吸管取 4950 $\mu$ l 的培養基注入培養管中
7. 以 200 $\mu$ l 的微吸管取 50 $\mu$ l 的菌液注入到細菌培養管中(等於稀釋 100 倍)
8. 放入厭氧箱後，在 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養 12 小時，再放到 4°C 的冰箱中保存
9. 液態培養基馴化細菌的步驟需重複 3~4 次

#### E. 轉糖鏈球菌的生長曲線-吸光值與菌量之間的關係



1. 此實驗需要三重複
2. 將馴化好的一管濃縮菌液取 50 $\mu$ l 放入 5ml 的液態培養基中，開始培養
3. 將此培養管的開口以 paraffin 膠帶密封好放到 37°C、5%CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養 0、2、4、6、8、10、12 小時。在每個時間點抽取純液態培養基當作背景值放入 96 孔盤中。並在各個時間點抽取 100 $\mu$ l 的菌液放到 96 孔盤中，以酵素免疫分析測讀儀偵測吸光值 (Absorbance=600nm)。
4. 記得取之前須先將培養管內的菌液利用震盪器震均勻
5. 將各個時間點偵測到的吸光值減掉背景吸光值即可得到真正的菌液吸光值
6. 因為有三重複，所以要將每個時間點測到的菌液吸光值平均並算出標準差
7. 畫出時間與菌液吸光值的折線圖

#### F. 轉糖鏈球菌的生長曲線-菌落形成單位與菌量之間的關係

1. 此實驗需要三重複
2. 將馴化好的一管濃縮菌液取 50 $\mu$ l 放入 5ml 的液態培養基中，開始培養。將此培養管的開口以 paraffin 膠帶密封好放到 37°C、5%CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養 0、2、4、6、8、10、12 小時。
3. 0 小時的菌液可直接抽取 100 $\mu$ l 塗盤 (取之前須先將培養管內的菌液利用震盪器震均勻)
4. 在第 2 小時之後的時間點，取 10 $\mu$ l 的菌液，加入 90 $\mu$ l 的液態培養基，配成 100 $\mu$ l 後，在 96 孔盤中進行序列性稀釋，再稀釋 5 次後，共稀釋到原來濃度的 10<sup>6</sup> 倍
5. 將稀釋到原來濃度 10<sup>6</sup> 倍的菌液取 100 $\mu$ l，滴到固態培養基上以玻璃三角彎棒塗盤，需塗到有點阻力才可停止






6. 塗完之後以酒精移除剩下的細菌，再用噴槍瓦斯燈滅菌，待其冷卻，即可再次塗盤
7. 將塗盤邊緣用 paraffin 膠帶封住後，放到厭氧箱中培養 48 小時再計算菌落形成單位
8. 菌落形成單位需落在每盤 30-300 個

G. 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂、Clinpro™ 溝隙封填劑的抗菌效果與吸光值的關係-阿爾瑪藍細胞增殖及毒性檢測試驗 (Alamar Blue assay)

1. 此實驗須三重複
2. 首先必須先製作抗菌實驗的錠片，以特定重量比將 0%、2%、4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂配製好後，將它加熱到 45°C 的時候，以調刀勾取材料放到直徑 6mm，高度 3mm 的鐵氟龍模具中
3. 鐵氟龍模具先放到載玻片上，載玻片與鐵氟龍模具都需要事先塗好凡士林，以幫助脫模。待材料勾到模具上後，以另一片抹上凡士林的載玻片壓到模具上以幫助表面平整，並擠出氣泡
4. 將奈米氟幾丁聚醣樹脂雙面照光各 20 秒，以確定完全聚合，然後進行脫模
5. 利用 P600、P800 的砂紙將錠片周圍的尖銳物磨掉以保持平整
6. 用環氧乙烷 (ethylene oxide) 進行瓦消，完成抗菌錠片
7. 將不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂抗菌錠片泡在含有 125  $\mu$ l 的液態培養基中密封，在 37°C，5%CO<sub>2</sub> 的桌上型恆溫震盪培養箱中以每分鐘 200rpm 的轉速橫放培養 12 小時，以獲得材料浸泡後的菌液
8. 本部分的實驗是以阿爾瑪藍細胞增殖及毒性檢測試驗活細菌。首先必須先偵測吸光值與菌液濃度的標準曲線。

- 
9. 在 96 孔盤中依序寫上  $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  的標記。因為之前的實驗以得知當細菌進入對數生長期高峰的時候為  $10^8$  個細菌。所以從  $10^8$  個細菌開始序列性稀釋。另外需要再放一個空白組 (單純液態培養基) 來測量背景值
  10. 因為每個孔盤需要與阿爾瑪藍試劑配成 100 $\mu$ l 的溶液，阿爾瑪藍試劑須佔總體積的 10%。因此序列性稀釋的方法為在  $10^8$  的那格孔盤中先加入 100 $\mu$ l 的濃縮菌液，在  $10^7$  到  $10^1$  的孔盤需加入 90 $\mu$ l 的液態培養基。稀釋到  $10^1$  那格孔盤時，須把 10 $\mu$ l 的菌液抽出
  11. 在  $10^8$  到  $10^1$  的孔盤中加入 10 $\mu$ l 的阿爾瑪藍試劑，在 37°C，5%CO<sub>2</sub> 的培養箱中避光反應 3 小時
  12. 以酵素免疫分析測讀儀設定波長為 530nm 的螢光激發，590nm 的螢光射出，來測量吸光值
  13. 畫出活細菌濃度與吸光值之間的檢量線
  14. 接下來拿一個新的 96 孔盤，在各個孔盤中加入不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片浸泡完的材料浸泡菌液 90 $\mu$ l，還有 10 $\mu$ l 的阿爾瑪藍試劑，在 37°C，5%CO<sub>2</sub> 的培養箱中避光反應 3 小時
  15. 以酵素免疫分析測讀儀設定波長為 530nm 的螢光激發，590nm 的螢光射出，來測量吸光值
  16. 藉由檢量線推算菌量
- H. 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂、Clinpro<sup>TM</sup> 溝隙封填劑的抗菌效果與菌落形成單位的關係
1. 此實驗須三重複，共 5 組。分別是控制組(濃縮菌液)、0% 奈米氟幾丁聚醣樹脂



- 菌液、2%奈米氟幾丁聚醣樹脂菌液、4%奈米氟幾丁聚醣樹脂菌液、Clinpro™  
溝隙封填劑錠片菌液
2. 將不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂抗菌錠片及 Clinpro™ 溝隙封填劑錠片泡在含有 125  $\mu$ l 的液態培養基中密封
  3. 在 37°C，5%CO<sub>2</sub> 的桌上型恆溫震盪培養箱中培養，以每分鐘 200rpm 的轉速橫放培養 12 小時，以獲得材料浸泡後的菌液
  4. 取 10 $\mu$ l 的菌液，加入 90 $\mu$ l 的液態培養基，配成 100 $\mu$ l 後，在 96 孔盤中進行序列性稀釋，再稀釋 5 次後，共稀釋到原來濃度的 10<sup>6</sup> 倍
  5. 將稀釋到原來濃度 10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> 倍的菌液各取 100 $\mu$ l，滴到固態培養基上以玻璃三角彎棒塗盤，需塗到有點阻力才可停止
  6. 塗完之後以酒精移除剩下的細菌，再用噴槍瓦斯燈滅菌，待其冷卻，即可再次塗盤
  7. 將塗盤邊緣用 paraffin 膠帶封住後，放到厭氧箱中培養 48 小時再計算菌落形成單位
  8. 菌落形成單位需落在每盤 30-300 個
- I. 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂、Clinpro™ 溝隙封填劑的抗菌效果於掃瞄式電子顯微鏡下的呈現
1. 將奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片、Clinpro™ 溝隙封填劑錠片放到 6 孔盤上。並直接在錠片上放上細菌原液，以蓋玻片壓上錠片確保菌液與錠片之間有最大的接觸面積，在 100%濕度的環境下培養一天。
  2. 將錠片放入新的微量離心管 (eppendorf) 中，每個微量離心管中加入 2%，200 $\mu$ l 的戊二醛水溶液(使用前一天配製)中固定，在 4°C 環境中保存代替在冰上固定



30 分鐘


3. 以二次水滌洗 5 分鐘，共 2 次。
4. 進行酒精序列性脫水步驟，以 50%、75%、90%、100%酒精各脫水 15 分鐘
5. 拿到 37°C的烘箱中烘兩天
6. 以導電膠帶將樣品貼於掃描式電子顯微鏡的載台上，一個載台貼 2~3 個樣品，之後將載台合併樣品放到觸控式全自動操作鍍金機內進行鍍金
7. 鍍金後利用掃描式電子顯微鏡在 2000 倍、5000 倍下觀察細菌的數量和樣貌

#### 4.3.4 奈米氟幾丁聚醣樹脂的生物相容性

本實驗所使用的細胞為第 20 代~27 代的纖維母細胞 (fibroblast)。

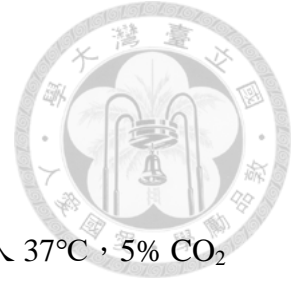
##### A. 製作培養纖維母細胞的液態培養基和細胞沖洗液

1. 將左旋麩醯胺(L-Glutamine，LG)兩管、丙酮酸鈉(Sodium pyruvate，SP)一管從 -20°C的冰箱中取出，放到 37°C的熱循環恆溫水浴槽中回溫
2. 非必需氨基酸溶液(MEM non-Essential amino acids solution，NEAA)直接從 4°C的冰箱中取出，不用回溫
3. 抗生素(penicillin/streptomycin，P/S)須在室溫下回溫，所以將其泡在裝滿水的燒杯中隔水回溫
4. 回溫過後須將以上藥品、胎牛血清(Fetal bovine serum，FBS)、DMEM 培養基(Dulbecco's modified eagle's medium，DMEM)、磷酸鹽緩衝生理鹽水(Phosphate buffered saline，PBS)、蒸餾水用酒精噴上後一起放到操作台內過火，以滅菌瓶口
5. 接下來要打開真空抽氣裝備，將電源插上後把管路取出，接到 0.22 $\mu$ m 的過濾瓶接口上，並把過濾瓶的蓋子先蓋上，以避免汙染

- 
6. 配製沖洗液: 若要配 500 ml 的 1% 抗生素、1 倍磷酸鹽緩衝生理鹽水的水溶液，所以只需要拿 50 ml 磷酸鹽緩衝生理鹽水的就可以了，因為原本的磷酸鹽緩衝生理鹽水為 10 倍。接下來加入 5ml 的抗生素以配製成 1% 的抗生素水溶液，以蒸餾水直接定量到總體積為 500ml
  7. 打開真空抽氣裝備，開始過濾抽吸，抽吸後將瓶口過火滅菌，冰入 4°C 的冰箱中保存
  8. 配製培養液: 若要配 500 ml 的 1% 左旋麩醯胺、1% 丙酮酸鈉、1 % 非必需氨基酸、10 % 胎牛血清的培養液，則須加入左旋麩醯胺、丙酮酸鈉、非必需氨基酸各 5ml，胎牛血清 50ml。再用 DMEM 培養基定量到 500ml。
  9. 打開真空抽氣裝備，開始過濾抽吸，抽吸後將瓶口過火滅菌，冰入 4°C 的冰箱中保存

#### B. 解凍與培養纖維母細胞

1. 將 10% FBS DMEM 從 4°C 的冰箱中取出，放到 37°C 的熱循環恆溫水浴槽中回溫。用酒精噴上瓶身，以噴槍瓦斯燈滅菌瓶口，並將 10% FBS DMEM 分裝到 50ml 的離心管中
2. 從液態氮筒中取出放入纖維母細胞的冷凍管，將冷凍管放到 37°C 的熱循環恆溫水浴槽中攪動，快速回溫 3 分鐘，避免冰晶刺傷細胞
3. 將回溫好的纖維母細胞冷凍管噴上酒精後，稍微以噴槍瓦斯燈滅菌瓶口
4. 在 15ml 離心管中加入 2ml 的 10% FBS DMEM
5. 以 1000 $\mu$ l 的微吸管將冷凍管中的細胞混勻，整個抽取出來後放入 2ml 的 10% FBS DMEM 中，將離心管瓶口過火後放入桌上型離心機內，以 1000rpm 的轉速離心 5 分鐘



6. 將上清液抽掉後加入 1ml 的 10% FBS DMEM 培養基回溶
7. 在 15 公分的培養盤上放入 15ml 的 10% FBS DMEM
8. 將回溶後的細胞打散後，栽種至 15 公分的培養盤中，再放入 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養 2 天，使細胞貼附盤面增生

#### C. 繼代纖維母細胞

1. 將 10% FBS DMEM、細胞沖洗液及 10 倍的胰蛋白酶 (trypsin) 回溫至 37°C
2. 將瓶口過火滅菌後，取細胞沖洗液將 10 倍的胰蛋白酶稀釋成 1 倍的濃度
3. 從培養箱中將貼附好細胞的培養盤取出，倒掉舊的 FBS DMEM
4. 以細胞沖洗液 2ml 沖洗盤面兩次後「吸乾」沖洗液
5. 加入 1 倍的胰蛋白酶 2ml，搖晃盤面使盤面充分浸潤胰蛋白酶
6. 放到 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中 5 分鐘，使細胞脫離盤面
7. 以倒立三眼生物顯微鏡觀察細胞是否懸浮在胰蛋白酶溶液中
8. 拿進操作台後，必須馬上用 3ml 的 10% FBS DMEM 回溶，消除胰蛋白酶對於細胞的影響
9. 以 1000μl 的微吸管吸取混合液沖洗盤面，使盤面上的細胞充分脫離
10. 將混合液裝入 15ml 的離心管內，過火瓶口後，放入桌上型離心機內，以 1000rpm 的轉速離心 5 分鐘
11. 將上清液體抽取丟棄，以 2~4ml 的 10% FBS DMEM 回溶細胞
12. 在 15 公分的培養盤上放入 15ml 的 10% FBS DMEM
13. 將細胞打入盤內，培養 2 天，使細胞貼附盤面增生




#### D. 冷凍纖維母細胞

1. 冷凍細胞的步驟與繼代細胞一致，不同的是最後在回溶的時候，加上的是細胞抗凍液，Cell Bank 1，而非細胞培養液回溶。盤面長滿細胞約略是一盤  $10^7$  個，而在冷凍細胞時希望細胞濃度為  $10^6$  個/ml
2. 用 10ml 的 Cell Bank 1 將細胞稀釋 10 倍，這樣細胞液體濃度就是  $10^6$  個/ml。
3. 從操作台上取出 20 個冷凍管寫上細胞的代數、數量、日期以及姓名，並將冷凍管瓶口過火滅菌。
4. 將漸凍盒以酒精消毒後放入操作台內
5. 將離心管內的細胞液用微吸管混勻後，每個冷凍管內放入 500 $\mu$ l 的細胞液。把冷凍管放到漸凍盒中，放到-80 $^{\circ}$ C的環境中一個晚上
6. 隔天再放入液態氮筒中保存

#### E. 栽種分盤纖維母細胞

1. 栽種分盤纖維母細胞的步驟與繼代細胞的步驟一致，但需要先做細胞計數
2. 將離心沉澱後的細胞以 5ml 的 10% FBS DMEM 回溶
3. 拿出一個微量離心管加入 80 $\mu$ l 的 10% FBS DMEM。以 1000 $\mu$ l 的微吸管將回溶的細胞打散後，取 20 $\mu$ l 的細胞液，定量成 100 $\mu$ l，稀釋成原來的 5 倍
4. 將稀釋成 5 倍的細胞液取 20 $\mu$ l 與 20 $\mu$ l 的台盼藍 (trypan blue)充分混合
5. 取 10 $\mu$ l 的混合液注入細胞計數盤的上下室 (chamber)中，並蓋上蓋玻片
6. 將細胞計數盤用倒立三眼生物顯微鏡觀察，並用細胞計數器計算上下室中的細胞數目

- 
7. 得出來的細胞數目代入此公式來估計離心管內的總細胞數目: (上室細胞數目 + 下室細胞數目) /  $10 \times 5 \times 2 \times 10^4$
  8. 預計栽種的細胞數量為每個孔盤 10000 顆細胞，因此將 10000/總細胞數量代表一個孔盤需拿取多少體積的細胞液
  9. 之後預計有控制組、0% 奈米氟幾丁聚醣樹脂、2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂、4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂和 Clinpro™ 溝隙封填劑，共五組。每組又要五重複，所以總共需拿 25 x 細胞液體積/每個孔盤
  10. 而每個孔盤需要 100μl，那就是(100 -細胞液體積/每個孔盤) x 25 的 10% FBS DMEM
  11. 將所需的 FBS DMEM 和細胞液在 15ml 的離心管中充分混合，在每個孔盤中注入 100μl 的混合液，即種好細胞
  12. 放到 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培養箱培養一天，等待細胞貼附盤面

#### F. 實驗樣本與製作萃取液

1. 本實驗需要三重複
2. 實驗樣本的大小為直徑 6mm、高度 3mm 的鐵氟龍模具，將不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂倒入模具中後脫模
3. 以 P800、P1000 的砂紙將樣本邊緣的尖銳物磨去，並以環氧乙烷滅菌
4. 本實驗依照 ISO 10993-5 及 ISO 10993-12 之規範製備萃取液。樣本厚度超過 1 mm，因此使用 1.25 cm<sup>2</sup>/ml 的萃取比例，而樣本表面積可求出為 1.130 cm<sup>2</sup>，經計算可知一個樣本要以 904.3 μl 的培養基來萃取。
5. 而因為每個組別有三重複，所以需在 15ml 的離心管內裝入 2713μl 的 10% FBS DMEM，浸泡三個樣本





6. 將樣本放入 37°C 的熱循環恆溫水浴槽中隔水浸泡 24 小時
7. 浸泡結束後，將萃取液吸出，使用 0.22  $\mu\text{m}$  micro-filter 過濾並保存於 4°C 冰箱中

#### ISO 10993-5 萃取時間及溫度之規範

$(24 \pm 2) \text{ h}$ at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$
$(72 \pm 2) \text{ h}$ at $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$
$(24 \pm 2) \text{ h}$ at $(70 \pm 2)^\circ\text{C}$
$(1 \pm 0, 2) \text{ h}$ at $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$

#### ISO 10993-12 材料萃取比例之規範

Thickness (mm)	Extraction ratio <sup>a</sup>	Examples of material
< 0.5	6 $\text{cm}^2/\text{ml}$	Film, sheet
0.5 to 1.0	3 $\text{cm}^2/\text{mL}$	Small model items
> 1.0	1.25 $\text{cm}^2/\text{mL}$	Large model items
Irregular shaped solid device	0.2 g/mL	Powder, pellet
Irregular shaped porous devices (low density materials)	0.1 g/mL	membrane

a Expressed as the ratio of the surface area or mass of the test sample to the volume of extractant used

#### G. 細胞存活率分析



1. 本實驗為五重複
2. 培養一盤細胞密度為  $10^4$  個細胞/每個孔盤
3. 培養一天等待細胞貼附盤面過後，之後以 100  $\mu$ l 之萃取液置換原有之培養液(萃取液須先稀釋 10 倍)，放進 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養一、三、五天後以 Cell Counting Kit-8(CCK8)進行細胞活性分析，控制組則是使用培養液培養
4. 將細胞培養盤裡的萃取液及培養基抽掉以微量離心管保存後冰入 -20°C 的冰箱中保存
5. 以細胞沖洗液 100  $\mu$ l 沖洗兩次後吸乾孔盤
6. 將 CCK8 以 10% FBS DMEM 稀釋 10 倍並以鋁箔紙避光保存在 15ml 的離心管中
7. 每個 well 加入 1 倍的染劑 CCK8 100  $\mu$ l，將培養盤用鋁箔紙包裹後，放回培養箱中避光反應 2 小時
8. 反應完成後，從各 well 抽取 100  $\mu$ l CCK8 染劑至 96 孔盤內，並在多的孔盤中放入培養液，用來測量背景值，以鋁箔紙包裹 96 孔盤後避光待測
9. 將孔盤以細胞沖洗液 100  $\mu$ l 沖洗兩次後，加入萃取液繼續培養，控制組則加入培養基
10. 將 96 孔盤放入酵素免疫分析測讀儀，讀取 450 nm 下的可見光吸光值。
11. 將數據皆扣除單純培養液的吸光值（背景值）後以得到結果

#### H. 細胞毒性分析

1. 本實驗為五重複，所使用的 kit 為 Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST。
2. 將冷凍的細胞上清液在做實驗的前一天放到 4°C 冰箱中回溫



3. 開啟微量高速冷凍離心機，並在 4°C 下預冷，計時 5 分鐘
4. 將培養了一、三、五天的細胞上清液按照順序對稱放到離心機中，在 15000rpm 轉速下離心 5 分鐘，將細胞碎屑沉澱
5. 抽取 50μl 的細胞上清液放到 96 孔盤中
6. 開始配製 LDH 溶液：將 5ml 的 Assay Buffer 加入到已冷凍乾燥的 Dye Mixture 粉末中
7. 將 50μl 的 LDH 溶液加入到 50μl 的細胞上清液中，鋁箔紙包起來後反應 30 分鐘
8. 將 25μl 的 Stop Solution 加到每個孔盤中，一樣避光反應 30 分鐘
9. 將 96 孔盤放入酵素免疫分析測讀儀，讀取 490 nm 下的可見光吸光值

#### I. 細胞毒性分析-LDH 最大釋放量的測量

1. 將一、三、五天的細胞上清液以細胞毒性分析後，發現不管是控制組還是實驗組在第 5 天時的細胞死亡數相較於第 1 和 3 天死亡數都高很多，代表生長環境過於擁擠。以 96 孔盤的培養環境來說，細胞成長至第 3 天已到達數量的最高峰，細胞存活數最高，死亡數最少，因此決定再培養一盤細胞
2. 細胞密度一樣是  $10^4$  個細胞/每個孔盤，孔盤內放入培養液即可
3. 培養到第三天的時候將每個孔盤內的 10μl 培養基抽掉，置換為 10 μl Lysis Buffer
4. 將培養盤放回培養箱中反應 30 分鐘。
5. 將各 well 中的培養基取出放至微量離心管中
6. 微量離心管中的培養基一樣以 15000rpm 的轉速離心 5 分鐘。



7. 離心完成後取 50  $\mu$ l 上清液加入另一個透明平底的 96 well 細胞培養盤內，每 well 再加入 50  $\mu$ l reaction mixture，將培養盤用鋁箔紙包裹後，室溫下避光反應 30 分鐘。
8. 將 25 $\mu$ l 的 Stop Solution 加到每個孔盤中，一樣避光反應 30 分鐘
9. 以酵素免疫分析測讀儀讀取 490 nm 吸光值。

實驗組和控制組的吸光值數據，由以下公式計算細胞毒性：

$$Cytotoxicity(\%) = \frac{exp. value - low control}{high control - low control} \times 100$$

其中，*exp. value*：實驗組吸光值

*low control*：low control 吸光值（自然釋放，就是控制組）

*high control*：high control 吸光值（最大釋放）

#### J. 纖維母細胞在光學顯微鏡下的觀察

1. 右手握住顯微鏡臂，左手托住鏡座。
2. 轉動轉換器，使低倍物鏡顯微鏡對准通光孔。注意，物鏡的前端與載物台要保持 2 釐米的距離。
3. 把一個較大的光圈對准通光孔。左眼注視目鏡內，右眼睜開，便於以後觀察畫圖。轉動反光鏡，看到明亮視野。
4. 把培養細胞到第三天的 96 孔盤放到載物台上卡住，孔盤要正對通光孔。
5. 轉動粗准焦螺旋，使鏡筒緩緩下降，直到物鏡接近載玻片。眼睛看著物鏡以免物鏡碰到玻片標本。
6. 左眼向目鏡內看，同時反向轉動粗准焦螺旋，使鏡筒緩緩上升，直到看清細胞為止。再略微轉動細准焦螺旋，使看到的細胞影像更加清晰。




#### 4.3.5 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的機械性質分析

##### A. 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的聚合深度比較

1. 聚合深度 (Depth of cure) 依據 ISO 6874:2015 之規範做測試。
2. 使用不鏽鋼模具 (直徑 4 mm, 高度 6 mm), 製作樣本前先將凡士林塗抹在模具內壁, 以利之後樣本脫膜
3. 將載玻片固定在模具下面, 將 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂以電磁加熱攪拌器暫時加熱以提高流動性, 之後填入模具中, 照光面亦使用載玻片附蓋並輕壓, 移除多餘的樹脂
4. Clinpro™ 樹脂直接填入模具中即可, 不須加熱
5. LED 光固化機距樣本 2 mm, 照光 30 秒後, 立即將樣本從模具中移除
6. 以調拌刀移除未固化的樹脂, 測量聚合深度。每組準備三個樣本做測試

##### B. 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的表面硬度比較

1. 本部分的實驗是利用維克式硬度試驗 (Vickers hardness test)
2. 先製備表面硬度的樣本。將載玻片固定在鐵氟龍模具 (直徑 6 mm, 高度 3mm) 下方, 取 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂填入模具中, 以另一片載玻片在表面輕壓, 移除多餘樹脂, 確保表面之平坦。模具和載玻片都要抹上凡士林以方便脫模。接下來 LED 光固化機距樣本 2 mm, 雙面各照光 20 秒。脫模後, 以 P400、P600、P800、P1000 的砂紙將表面由粗到細濕磨光滑, 避免測量時的誤差。
3. 將厚紙板表面塗上凡士林, 把 50ml 離心管切除物放在厚紙板上, 旁邊塗上大量的凡士林, 避免保麗樹脂及硬化劑在倒入的時候從邊緣縫隙溢出。

- 
4. 調拌保麗樹脂和硬化劑於 15ml 離心管內，比例為每 10ml 的保麗樹脂加 2 滴硬化劑。
  5. 在 50ml 離心管切除物內放入六個試片(2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片/Clinpro™ 溝隙封填劑錠片)，以凡士林稍微固定在厚紙板上
  6. 以塑膠滴管吸入保麗樹脂和硬化劑，慢速滴入 50ml 離心管切除物內，避免錠片的位移
  7. 放到操作台內等待保麗樹脂的硬化，之後再脫模
  8. 脫模後以精密切割機平行切割底座，確保樣品上下兩面相互平行
  9. 再次以 P400、P600、P800、P1000 的砂紙將樣品表面由粗到細濕磨光滑，避免測量時的誤差
  10. 將樣本固定在微硬度計上
  11. 測試條件為荷重 50 克、荷重時間 30 秒，於同一樣本不同位置取五點維克氏硬度值，平均值視為該樣本的硬度值。每組材料做六個樣本，計算得到最終硬度的平均值和標準差

C. 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的徑向抗拉/壓強度比較

1. 本部分的實驗是參考 New American Dental Association Specification No.27 method 做法
2. 製備樣品的作法如同表面硬度測試，但不同的是為了避免實驗誤差，盡量要減少樣品內的缺陷和氣泡
3. 本研究使用萬能測試機來測試抗壓強度，操作條件如下：
  - 下壓速率：0.5 mm / min



- 荷重元：5kN
- 靈敏度：40 %
- 操作條件：compression strength test
- 數據記錄：每 0.1 秒讀取資料一次並記錄之
- 電腦軟體：Bluehill software

將樣本放置於荷重平台的中央，以樣本圓形面作為受壓面，0.5 mm/min 的速度往下施力於樣本，至樣本破壞記錄荷重元下壓延伸的距離(mm)、下壓負荷(N)以及時間(sec)等初步資料，將得到的施力－位移圖形，經由 Bluehill software 轉換成數值，儲存於電腦中。

4. 計算公式如下：

$$(\sigma_t) = \frac{2P}{\pi DT}$$

$\sigma_t$  代表徑向抗拉/壓強度，P 是樣品斷裂時所需要的施力， $\pi$  為圓周率，D 為樣品直徑，T 為樣品厚度

#### D. 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的抗彎強度比較

1. 本部分的實驗是參考 ISO 4049 之規範做測試
2. 把 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂暫時加熱後，倒入長 24mm，高 2mm，寬 2mm 的壓克力模具中(模具內部要先塗好凡士林以方便脫模)
3. 用載玻片將樹脂表面壓平並擠出氣泡
4. 以 LED 光固化機距樣本 2 mm 雙面各照光 20 秒以確保完全聚合
5. 脫模後以 P800、P1000 的砂紙將邊緣銳利處磨平磨細
6. 樣品放在三點抗彎壓力測試機(本實驗使用萬能測試機代替)上，兩側端點距離



20mm，以確保均勻受力

7. 測試抗彎強度時以 0.5mm / min 的速度往下施力於樣本
8. 測得樣本斷裂時的受力，並代入以下公式計算抗彎強度  $\alpha$

$$(\alpha) = \frac{3FL}{2bh^2}$$

F 為樣本上斷裂時所受的力(KN)，L 為兩側端點距離(cm)，h 為樣本的厚度(cm)，b 是樣本的寬度(cm)

#### E. 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的流動性比較

1. 本實驗參考 ISO 6876：2012 之規範，進行流動性（Flowability）的測試。
2. 準備兩片載玻片（長 76 mm，寬 52 mm），將第一片載玻片平放在桌面
3. 將 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂於研鉢上加熱至 45°C，以提高流動性，便於用微吸管吸取樣本。Clinpro™ 溝隙封填劑可先集中在 96 孔盤內再以微吸管吸取
4. 於奈米氟幾丁聚醣樹脂內加入 20μl 的台盼藍幫助顯色
5. 以微吸管吸取 10 μl 的待測樣本放於載玻片中央等待冷卻，以得知真實流動性
6. 再將第二片載玻片放上，並在第二片載玻片的上面持續施加 150 g 的力量
7. 避光等待一分鐘後，測量樣本往四周流動後的直徑。每組材料進行三重複測試。

#### 4.3.6 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的氟釋放與再吸收分析

##### A. 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的氟釋放分析

1. 本實驗需要三重複





2. 實驗樣本的大小為直徑 6mm、高度 2mm 的鐵氟龍模具，將 2% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂、Clinpro™ 溝隙封填劑倒入模具中後脫模，形成錠片
3. 以 P800、P1000 的砂紙將樣本邊緣的尖銳物磨去
4. 將錠片泡在 5ml 的去離子水中(放入 15ml 離心管內，去離子水的使用是避免測量氟離子濃度時其於離子的干擾)
5. 將樣品橫放在數位振盪器上使去離子水能不斷沖刷錠片表面
6. 收集浸泡於去離子水內 1、2、3、4、5、6 天後的含氟去離子水樣本
7. 須將含氟去離子水以 0.22 $\mu$ m 的篩網過篩以去除去離子水內大於 0.45 $\mu$ m 的微粒，這些微粒會減少離子管柱(column)的壽命
8. 配製 1% 硫酸當作再生液，並將濃縮沖流液稀釋 20 倍作為清洗管柱時的移動相。
9. 本實驗使用離子層析儀偵測水中氟離子的濃度，操作條件如下：
  - 延遲時間(Delay)：2.8 min
  - 最小積分面積(Min area)：0
  - 最小電位高度(Min height)：0.01  $\mu$ s /cm
  - 電腦軟體：ICNET software
10. 以 Startup hardware(Measure baseline)先暖機，使背景導電度低於 15  $\mu$ s /cm，水壓最好位於 7~8 MPa
11. 設計 sample queue：離子層析儀的轉盤上總共能放 36 個樣本，以一針樣本一針去離子水的方式，才能避免管路在接連不斷的分析中，遺留了上一針的氟離子。另外也能使管路較乾淨，背景導電度降低
12. 先將 1ppm 的陰離子標準溶液放到離子層析儀上偵測其積分過後的面積以推測

樣本的濃度



13. 將樣品按照順序放到離子層析儀上進行分析(一針樣本為 20 分鐘)

14. 記錄各樣本積分過後的面積以推算水中氟離子濃度

B. 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑氟離子再吸收分析

1. 本實驗需要三重複

2. 將浸泡六天後的樣本從去離子水中取出

3. 將 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片和 Clinpro™ 溝隙封填劑錠片分別放入 50ml 離心管中，每個離心管內注入 45ml 的去離子水

4. 以超音波振盪機振盪 10 分鐘，以去除遺留在錠片上的氟離子

5. 將錠片從去離子水中取出，擦乾並吹乾。調配 0.2% 氟化鈉水溶液，在每個 15ml 離心管中分別放入 10ml 的氟化鈉水溶液。將各組錠片分別加入後，以試管振盪機將每管樣本各振盪 1 分鐘

6. 將錠片取出，重新泡到 5ml 的去離子水中

7. 將樣品橫放在數位振盪器上使去離子水能不斷沖刷錠片表面

8. 收集浸泡於去離子水內 1、2、3 天的水中氟離子樣本

9. 接下來的步驟與測量氟離子釋放的步驟一樣

#### 4.3.7 統計分析

此研究的統計分析若為多組間的比較，由單因子變異數分析(One-way ANOVA)及二因子變異數分析(Two-way ANOVA)來計算所有連續性變項之間的差異性，並以杜凱確實差異檢定(Tukey's test)兩兩互相比較作為事後檢定，找出差異的所在。若為兩組間的比較，則使用獨立樣本 t 檢定(Independent sample t-test)。結果的信賴區間設定在 95%，若 p 值(p-value) $<0.05$  則代表變項間有相關或差異性，所使用的統計軟體為 Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) 和 Real Statistics(Microsoft Corporation)。



## 第五章 結果分析



### 5.1 奈米氟幾丁聚醣的結構與粒徑

#### 5.1.1 幾丁聚醣的傅立葉紅外線光譜轉化圖(圖 1)

幾丁聚醣氫鍵 (O-H bond)和胺基 (N-H bond)的伸縮振動 (stretching vibration) 吸收峰在  $3386\text{ cm}^{-1}$  (wavenumber)，碳氫鍵 (C-H bond)的伸縮振動吸收峰在  $2869\text{ cm}^{-1}$  和  $2929\text{ cm}^{-1}$ ，但因為在樣品乾燥的過程中去除水分不夠徹底，所以  $2500\text{ cm}^{-1}$  以上的波形較為紊亂，已在圖形中去除。根據研究顯示， $1421\text{ cm}^{-1}$  和  $1560\text{ cm}^{-1}$  代表幾丁聚醣的特色峰，推測與乙酰基(acetyl group)是否移除有關，此乙酰基為連接著胺基的羰基 (C=O bond)。

#### 5.1.2 奈米氟幾丁聚醣的傅立葉紅外線光譜轉化圖(圖 1)

在加了三聚磷酸鈉和氟化鈉後，氫鍵、胺基和碳氫鍵的吸收峰並沒有太大幅度的偏移；氫鍵和胺基的吸收峰在  $3407\text{ cm}^{-1}$ ，而碳氫鍵的吸收峰在  $2881\text{ cm}^{-1}$ 。而與氟離子結合過後，幾丁聚醣的主要結構並沒有太大的變化，仍然可以看到特色峰，不過有發生偏移，特色峰分別出現在  $1417\text{ cm}^{-1}$  和  $1567\text{ cm}^{-1}$ 。值得注意的是，傅立葉紅外線光譜的指紋區為  $1000\text{ cm}^{-1}$ ，可以看到  $738\text{ cm}^{-1}$  的位置出現強吸收峰，推測與 CF-CF<sub>3</sub> 鍵結的形成有關。

#### 5.1.3 奈米氟幾丁聚醣的流體動力學半徑(hydrodynamic radius) (圖 2)

此實驗進行三重複測量。粒徑測量是使用多角度奈米粒徑儀，將新鮮純化的奈米氟幾丁聚醣以 5 倍體積的 1% 醋酸水溶液稀釋，反覆吸排分散，粒徑測量使用四面光石英比色管，儀器設定溫度為標準溫度  $25^{\circ}\text{C}$ ，光散射角以側相角  $90^{\circ}$  為主，雷射波長  $633\text{ nm}$ 。結果顯示若用醋酸當作溶劑進行粒徑分析，則流體力學半徑為

629 ± 55 nm。多分散性指數為 0.68 ± 0.10。



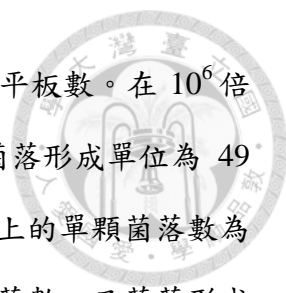
## 5.2 奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌特性

### 5.2.1 轉醣鏈球菌的生長曲線-吸光值與菌液濃度的關係(表 2)

細菌的生長曲線反映了在一段時間內在存活的細菌個數。它分成四個階段，分別是遲滯期 (lag phase)、對數生長期 (exponential phase)、靜止期 (stationary phase)和死亡 (death)。在遲滯期的細菌具有代謝活性但分裂速度緩慢，當細菌的生長進入到對數生長期，細菌生長速度增快，此時細菌在每次世代時間 (generation time)進行二分裂 (binary fission)，去氧核醣核酸的轉錄成核醣核酸，核醣核酸轉譯成細胞壁的蛋白質都非常活躍。抗生素或是消毒劑的使用在此時最有效果，因為它針對的就是細菌必須蛋白質的合成。首先，在吸光值與菌液濃度的關係中發現細菌於液態培養基中成長至 4 小時的時候，吸光值從 0 小時的  $0.022 \pm 0.004$  增加  $0.080 \pm 0.003$ ，正式進入對數生長期。6 小時的時候吸光值為  $0.168 \pm 0.009$ ，8 小時的菌液吸光值到達  $0.410 \pm 0.013$ ，10 小時為  $0.404 \pm 0.026$ 。8 小時與 10 小時的吸光值差不多，代表 8 小時到達對數生長期的高峰，進入靜止期。接下來細菌的代謝物增加造成環境的酸化，細菌呈現對數模式下降，進入死亡期。知道了轉醣鏈球菌在液態培養基中成長 8 小時到達菌量高峰後，就必須以菌落形成單位定量估計一毫升菌液中的細菌數目。

### 5.2.2 轉醣鏈球菌的生長曲線-菌落形成單位與菌液濃度的關係(表 3)

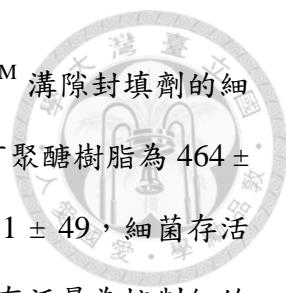
為了知道在對數生長期一毫升菌液中的細菌數目，以 50 $\mu$ l 的濃縮菌液加到總量為 4950 $\mu$ l 的液態培養基中培養 0 ~ 12 小時，以每 2 小時為一個單位進行三重複塗盤，並以  $10^1$ 、 $10^2$ ..... $10^6$  倍作序列性稀釋培養 48 小時，試圖讓細菌菌落數長到有效平板數的範圍內(30~300 個菌落)。結果發現當細菌生長進入到對數生長期時，



第 6、8、10 小時的塗盤必須稀釋到  $10^6$  倍才能讓細菌長到有效平板數。在  $10^6$  倍的稀釋平板上，6 小時的菌落形成單位為  $62 \pm 18$  個，8 小時的菌落形成單位為  $49 \pm 16$  個，10 小時的菌落形成單位為  $65 \pm 26$  個。固態培養基的上的單顆菌落數為將原液稀釋  $10^6$  倍，再取 100 $\mu$ l 的培養 48 小時後所長出來的菌落數。又菌落形成單位為每一毫升中所含的細菌數，因此需將平均單顆菌落數放大  $10^7$  倍，即可得到菌落形成單位。細菌約於生長後的 8 小時達到對數生長高峰，此時的菌落數為每毫升菌液中有  $4.9 \times 10^8$  個。而因為菌落形成的數目與細菌的活性，環境中的溫度、氧含量、酸鹼值和光照有十足的關係，因此越能模擬細菌在口腔成長的環境，菌落形成單位的數目越能反映口內狀況。8 小時的菌落形成單位比 6 小時的少，筆者認為是培養環境中各種因素交互作用後的影響，但是從趨勢中仍然可以知道培養轉糖鏈球菌 8 小時後，會進入對數生長期的高峰，此時的菌量為每毫升菌液中有  $10^8$  個。

### 5.2.3 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌效果與吸光值的關係(圖 3 表 4)

阿爾瑪藍細胞增殖及毒性檢測試驗(Alamar Blue assay)不只能檢測細胞的存活度來反映材料的生物相容性高低，同時也能有一定的敏感度來偵測細菌的存活量來反映材料的抗菌效果。因此在這個部分將一管為每一毫升  $10^8$  個細菌的濃縮菌液序列性稀釋至每一毫升 10 個細菌，並以阿爾瑪藍試劑以 9:1 的體積比配在 96 孔盤中，每個孔盤為 100 $\mu$ l。以波長為 530nm 的螢光激發，590nm 的螢光射出來測量吸光值，以折線圖表示不同菌液濃度對應的吸光值關係。每一毫升  $10^8$  個細菌的吸光值為  $2638 \pm 280$ ，每一毫升  $10^7$  個細菌的吸光值為  $1660 \pm 100$ ，每一毫升  $10^6$  個細菌的吸光值為  $571 \pm 52$ ，每一毫升  $10^5$  個細菌的吸光值為  $489 \pm 3$ 。可以知道當菌液濃度低於每一毫升  $10^6$  個細菌時，阿爾瑪藍試劑就不具有足夠的敏感度來判斷細菌的存活量，抗菌效果落於這個範圍的材料必須直接測量菌落形成單位定量。以阿爾瑪藍細胞增殖及毒性檢測試驗三重複測量控制組、0% 奈米氟幾丁聚醣樹脂、



2%奈米氟幾丁聚醣樹脂、4%奈米氟幾丁聚醣樹脂以及 Clinpro™ 溝隙封填劑的細菌存活量，發現控制組的螢光吸收值為  $752 \pm 35$ ，0%奈米氟幾丁聚醣樹脂為  $464 \pm 96$ ，細菌存活量為控制組的 62%；2%奈米氟幾丁聚醣樹脂為  $351 \pm 49$ ，細菌存活量為控制組的 47%；4%奈米氟幾丁聚醣樹脂為  $433 \pm 58$ ，細菌存活量為控制組的 58%；Clinpro™ 溝隙封填劑為  $505 \pm 103$ ，細菌存活量為控制組的 67%。以 One-way ANOVA 和 Tukey's test 顯示所有組別相較於控制組都有抗菌效果，但各組間沒有統計上的顯著差異。這可能是因為奈米氟幾丁聚醣與 Clinpro™ 溝隙封填劑的抗菌效果使菌量落於每一毫升  $10^6$  個細菌以下，阿爾瑪藍試劑不具有足夠的敏感度來測量細菌的存活量。

#### 5.2.4 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌效果與菌落形成單位關係(表 5)

將不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂試片浸泡在濃度為每一毫升  $10^8$  個細菌，體積為 125 $\mu$ l 的菌液中作為實驗組，不加試片的菌液當作控制組。密封橫放在 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培養箱內震盪培養 12 小時，再將 10 $\mu$ l 的菌液取出，搭配液態培養基作序列性稀釋到  $10^6$  倍，每個孔盤為 100 $\mu$ l。將各組稀釋至  $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  倍的菌液塗盤，計算菌落形成單位。結果顯示 0%奈米氟幾丁聚醣樹脂的細菌存活率為控制組的 54%；2%奈米氟幾丁聚醣樹脂的細菌存活量為控制組的 10%；4%奈米氟幾丁聚醣樹脂的細菌存活量為控制組的 25%；Clinpro™ 溝隙封填劑的細菌存活量為控制組的 45%。以變異數分析 One-way ANOVA 和 Tukey's test 顯示 0%、2%、4%的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑相對於控制組有統計上顯著差異的抗菌效果，而 2%、4%的奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌效果又優於 0%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑。2%和 4%的奈米氟幾丁聚醣樹脂比較後無統計上的顯著差異。

### 5.2.5 不同含量奈米氟幾丁聚醣樹脂抗菌效果於掃描電子顯微鏡下呈現(圖 4)

將放在 100%濕度環境下的試片取出後以 2%戊二醛水溶液固定，並用 50%、75%、90%和 100%酒精進行序列性脫水，在 37°C的烘箱內烘乾 48 小時取出。以導電膠帶貼於載台上後鍍金，於掃描式電子顯微鏡下觀察試片表面的細菌數量與形態。在 2000 倍的視野下找到細菌後，以 5000 倍的倍率觀察細菌型態。發現轉醣鏈球菌的型態為邊角圓鈍的長方形或正方形，並且常會等距離排列成串，如工整的鎖鏈狀，但有時也會單一出現。在 0%奈米氟幾丁聚醣樹脂表面發現微孔洞中藏了許多轉醣鏈球菌，有單一出現的狀況，也有排列成短鏈狀的形式。而在 2%和 4%的奈米氟幾丁聚醣樹脂表面上，2000 倍下難以尋找到細菌的蹤跡，數量不多。在 5000 倍下觀察發現細菌雖少但排列成較長鏈的形式。Clinpro™溝隙封填劑試片表面上在許多微孔洞中發現非常多長鏈的轉醣鏈球菌，抗菌效果甚微。

### 5.3 奈米氟幾丁聚醣樹脂的生物相容性

#### 5.3.1 不同含量奈米氟幾丁聚醣樹脂萃取液對於纖維母細胞的細胞存活率(表 6 圖 5 圖 6)

此試驗以 Cell Counting Kit-8(CCK8)代替 MTT assay 偵測不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂萃取液對於纖維母細胞的細胞存活率。因為 MTT assay 需用二甲基亞砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)有機溶劑來溶解還原後的藍紫色結晶甲臍(formazan)，可能會造成細胞死亡，且實驗重複性較差又操作繁瑣。在 96 孔盤中栽種為每個孔盤 10000 個細胞，除了 0%奈米氟幾丁聚醣樹脂、2%奈米氟幾丁聚醣樹脂、4%奈米氟幾丁聚醣樹脂以及 Clinpro™溝隙封填劑這四組外，還有控制組，總共五個組別，每個組別為五重複。以奈米氟幾丁聚醣樹脂萃取液培養纖維母細胞 1、3、5 天，偵測纖維母細胞的存活率。當以原液培養細胞的時候，發現培養一天，4%奈米氟幾丁聚醣樹脂萃取液和 Clinpro™溝隙封填劑萃取液影響了細胞複製的速率或




造成細胞死亡，因此將不同組別的萃取液以細胞培養基 10 倍稀釋後再次培養纖維母細胞 1、3、5 天。培養過後發現 2% 和 4% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂萃取液和 Clinpro™ 溝隙封填劑萃取液有同樣的細胞存活率，且與控制組的細胞存活率也一樣，沒有統計上的顯著差異。

### 5.3.2 不同含量奈米氟幾丁聚醣樹脂萃取液對於纖維母細胞的細胞毒性(表 7)

此試驗需搭配細胞存活率檢測，需把細胞用萃取液培養了 1、3、5 天的培養液收集起來冰在 -20°C 的環境中，在要測量的前一天放到 4°C 下解凍。以乳酸脫氫酶試驗(lactate dehydrogenase test, LDH test)發現不管是控制組還是實驗組在第 5 天的細胞死亡數相較於第 1 和 3 天死亡數都高很多，代表生長環境過於擁擠。以 96 孔盤的培養環境來說，細胞成長至第 3 天已到達數量的最高峰，細胞存活數最高，死亡數最少，因此決定再培養一盤細胞，並在第 3 天的時候測量乳酸脫氫酶的最大釋放量(high control group)，以控制組當作乳酸脫氫酶的自然釋放量(low control group)，藉此計算細胞死亡率來表示材料的細胞毒性。結果顯示不管是 2% 還是 4% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂，在萃取液稀釋 10 倍的條件下，其細胞毒性與 Clinpro™ 溝隙封填劑造成的細胞毒性一致，細胞毒性趨近於無。

### 5.3.3 纖維母細胞於不同含量奈米氟幾丁聚醣樹脂萃取液稀釋 10 倍後培養下的型態(圖 7)

因為細胞培養至第 3 天的時候具有最大的存活數和最少的死亡數，所以選擇第 3 天的時候觀察細胞在光學顯微鏡下的形貌。可以看到纖維母細胞呈現紡錘形且細胞表面透亮，因為緊密堆疊而平行排列，甚至有多層堆疊，在顯微鏡觀察下顯示出深淺不一，出現大小不同漩渦的現象。0% 奈米氟幾丁聚醣樹脂、2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂、4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂和 Clinpro™ 溝隙封填劑的萃取液在稀釋了



10 倍過後，其細胞生長與控制組的細胞生長沒有明顯的不同，並沒有出現細胞碎裂緊縮、飄浮起來的狀態，表示細胞存活的很好。也反應了以 CCK8 kit 所作的細胞存活率很高，LDH test 所作的細胞毒性趨近於無的結果。經過了上述關於抗菌特性與生物相容性的測試，筆者決定使用 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與市售的 Clinpro™ 溝隙封填劑作機械性質的比較，因為 10 倍稀釋過後的萃取液不一定能代表試片在口腔內的釋放量，因此 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂相較於 4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂還是較安全。也因為 2% 與 4% 的奈米氟幾丁聚醣其抗菌效果沒有統計上的差異，又為了增加其機械性質減少邊緣滲漏破損，所以之後的機械測試會選擇 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑來比較。

#### 5.4 奈米氟幾丁聚醣樹脂的機械性質

##### 5.4.1 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑在聚合深度方面比較(表 8)

此試驗是以直徑 4mm、高度 6mm 的不銹鋼模具作為測試的標準，將 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂加熱後暫時提高流動性，灌入模具內，單面照光 30 秒後觀察樹脂的聚合深度。而 Clinpro™ 溝隙封填劑則是直接加到模具內，同樣單面照光 30 秒後觀察其聚合深度。以三重複測試後發現 Clinpro™ 溝隙封填劑的聚合深度為  $3.63 \pm 0.32$  mm，2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的聚合深度為  $5.93 \pm 0.12$  mm，以獨立樣本 t 檢定發現兩者有統計上顯著的差異，顯示 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的聚合深度遠大於 Clinpro™ 溝隙封填劑的聚合深度。聚合深度在溝隙封填劑的臨床操作上以往是非常重要的，因為溝隙形態複雜且分支迥異，若沒有足夠深的聚合深度，流動到深部的溝隙封填劑就不會聚合，也就無法達到防齲的功效，不過目前對於溝隙封填劑的想法已偏向於擁有良好的固持性和良好的機械強度，聚合深度的重要性就見仁見智。

#### 5.4.2 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑在表面硬度方面的比較(表 8)

此試驗是以直徑 6mm、高度 3mm 的鐵氟龍模具作為測試的標準，將 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂加熱後暫時提高流動性，灌入模具內，雙面各照光 20 秒後脫模，以 P400、P600、P800、P1000 的砂紙畫圓濕磨表面，再將樣本固定在保麗樹脂中，以精密切割器使樣本雙面平行後測定表面硬度。而 Clinpro™ 溝隙封填劑則是直接加到模具內，雙面照光 20 秒再如上述做法處理後觀察其表面硬度。因擔心樣品組內間測量值差異太大，以六重複測試。測試後發現 Clinpro™ 溝隙封填劑的表面硬度為  $16.70 \pm 1.29 \text{ kgf/mm}^2$ ，2%奈米氟幾丁聚醣樹脂的聚合深度為  $19.77 \pm 1.26 \text{ kgf/mm}^2$ ，以獨立樣本 t 檢定發現兩者有統計上顯著的差異，顯示 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂的表面硬度大於 Clinpro™ 溝隙封填劑的表面硬度。表面硬度以及抗壓/抗拉強度在溝隙封填劑的臨床操作上相對重要，因為溝隙封填劑大多施予在上下顎第一大白齒表面上，第一大白齒為咬合功能良好與否的核心，在承受咬合力上扮演很重要的角色。若材料的機械性質脆弱，復形物與牙齒接觸的邊緣會產生裂隙，就有可能產生齲齒，使溝隙封填劑反而成為孩童以刷牙清潔牙齒表面的阻礙物。因此，溝隙封填劑的表面硬度高低與否，對於臨床上防齲功效的能力不可謂不甚。

#### 5.4.3 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑在徑向抗張強度方面的比較(表 8)

此試驗的樣本製作流程如表面硬度所述，但在樣本內部要盡量減少氣泡的產生以避免測量時的誤差，所以加熱 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂以暫時提高流動性為必須，否則因內含將近 20%的填料而減少的流動性會使氣泡無法排出。因為擔心樣品組內間測量值差異太大，所以也是用六重複測試。測試後發現 Clinpro™ 溝隙封填劑的徑向抗張強度為  $29.14 \pm 5.24 \text{ Mpa}$ ，2%奈米氟幾丁聚醣樹脂的徑向抗張強度為  $41.56 \pm 5.10 \text{ Mpa}$ ，以獨立樣本 t 檢定發現兩者有統計上顯著的差異。



#### 5.4.4 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑在抗彎強度方面比較(表 8)

此試驗是以長度 24mm、寬度 2mm、高 2mm 的壓克力模具作為測試的標準，將 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂加熱後暫時提高流動性，灌入模具內，雙面各照光 20 秒後脫模，以 P800 和 P1000 的砂紙濕磨表面去除粗糙及銳利的部分，再將樣本放在萬能測試機上，搭配在軟體上設定的參數，來測量材料斷裂時所受的力，再帶入公式計算抗彎強度。而 Clinpro™ 溝隙封填劑則是直接加到模具內，雙面照光 20 秒再如上述做法處理後計算其抗彎強度，進行三重複測試。測試後發現 Clinpro™ 溝隙封填劑的抗彎強度為  $65.58 \pm 15.24$  Mpa，2%奈米氟幾丁聚醣樹脂的聚合深度為  $73.18 \pm 13.57$  Mpa，以獨立樣本 t 檢定發現兩者沒有統計上顯著的差異。雖然數值在趨勢上顯示 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗彎強度可能會大於 Clinpro™ 溝隙封填劑的抗彎強度，但即便暫時性的加熱了 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂，也沒有辦法完全去除材料中的氣泡，導致組內的個體數值差異性較大，不夠集中，統計後組間相比沒有了明顯的差異性。抗彎強度與表面硬度、抗壓/抗拉強度在牙科材料的臨床操作上一樣重要，抗彎強度又叫作斷裂模數 (modulus of rupture)、破裂強度 (fracture strength)或彎曲強度 (bend strength)。強度與剛性 (stiffness) 為兩種不同的概念。強度是材料在外力作用下抵抗「永久」變形的能力；剛性是材料在外力作用下抵抗變形的能力。談到強度，就必須談到彈性形變。彈性形變僅存在於應變為 0.005 以內，當材料的變形超過此點時，應力與應變的關係不再維持正比的關係，且發生永久不再回復或塑性變形 (plastic deformation)，亦即當除去應力後亦無法返回其原來的位置，如果一種材料在發生塑性變形前能承受的應力越大，代表它的強度越高，例如金屬。但像脆性陶瓷材料這種材料，在塑性變形前能承受的應力不高，一下就斷了，屬於低強度高剛性。2%奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗彎強度在趨勢上比 Clinpro™ 溝隙封填劑的抗彎強度大，代表在發生永久形變前能承受的應力較大，較不容易發生無法回復的變形，對於復形材料來說也較不容易產生

邊緣裂隙，而導致齲齒。




#### 5.4.5 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑在流動性方面比較(表 8)

此試驗是將 2% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂按照重量比配好後，放到研鉢上加熱調拌，再滴入 20 $\mu$ l 的台盼藍幫助顯色。在載玻片上滴入 10 $\mu$ l 的樹脂後等待冷卻，再以另一片載玻片壓上穩定施予 150gm 的力一分鐘，量測樹脂擴散的直徑以代表流動性。Clinpro™ 溝隙封填劑則是先將其滴入 96 孔盤中，再取 10 $\mu$ l，如上述做法處理後量測擴散直徑，進行三重複測試。測試後發現 Clinpro™ 溝隙封填劑的擴散直徑為  $21.67 \pm 2.52$  mm，2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的聚合深度為  $8.38 \pm 0.82$  mm，以獨立樣本 t 檢定發現兩者有統計上顯著的差異。顯示 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的流動性小於 Clinpro™ 溝隙封填劑的流動性。當樣本中的填料固含量到達 20% 以上時，機械性質會有明顯的提升，但是同時也代表必須犧牲流動性。筆者有測試過 10% 的填料固含量，發現流動性大幅提升，表示填料含量的多寡與流動性之間不只有線性的負相關，可能是指數負相關。早期對於溝隙封填劑的臨床使用來說，流動性相當重要，因此在研發時常會犧牲材料的機械性質，試圖讓材料流進極度複雜的窩溝中，並需要調輕咬點，避免咬合力集中在溝隙封填劑上造成材料的碎裂。目前對於溝隙封填劑使用上的觀點，已強調機械強度與固持性來避免邊緣裂隙造成的齲齒，因此提高機械強度勢在必行，流動性的減少實為不可避免。

### 5.5 奈米氟幾丁聚醣樹脂的氟釋放與再吸收

#### 5.5.1 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑氟離子釋放方面的比較(圖 8 圖 9)

此試驗是將直徑 6mm、高度 2mm 的樣品泡在 5ml 的去離子水中，在室溫下橫放在 15ml 離心管內震盪，每天收集氟釋放的水質樣本，共收集六天後，第七天進



行氟再吸收的樣本處理後，再測量三天。將離子層析儀先設定好參數後(延遲時間為 2.8 min、最小積分面積為 0、最小電位高度(Min height):  $0.01\mu\text{s}/\text{cm}$ )，決定氟離子濃度的積分面積。在進行水質分析的時候，注意背景導電度不要大於  $25\mu\text{s}/\text{cm}$ ，最好少於  $15\mu\text{s}/\text{cm}$ ，離子管柱的水壓大約要在 7~8 MPa，才不會使積分面積太少而無法判斷。首先先使用 1ppm 的陰離子標準溶液定量氟離子的積分面積，藉此觀察不同氟離子水質樣本積分面積，然後再推算其濃度。偵測的方法為一針去離子水，一針樣本，避免連續不停偵測後，氟離子或氯離子遺留在管路上，造成管路太髒或是背景值太高。此部分的實驗連續偵測氟離子釋放濃度共六天，可以發現 2% 奈米氟幾丁聚醣雖然聚合在樹脂錠片內，仍有與市售的 Clinpro™ 溝隙封填劑錠片有相等程度的氟離子釋放量，以獨立樣本 t 檢定比較每天的釋氟量，統計上沒有顯著上的差異。不過若以 Two-way ANOVA 比較兩種錠片連續六天的釋氟含量，發現 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片的氟釋放量與 Clinpro™ 溝隙封填劑錠片的氟釋放量有明顯的不同，以事後檢定發現主要是 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片第一天與第二天的氟釋量大於 Clinpro™ 溝隙封填劑錠片的氟釋放量。而以 One-way ANOVA 分析同一種錠片每天氟釋放量的差異，發現 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片在釋放氟離子第三天過後，就與之後天數的釋氟量沒有統計上的顯著差異，表示從第三天開始氟離子就能以低含量  $1.12 \pm 0.07 \sim 2.19 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  穩定釋放。而 Clinpro™ 溝隙封填劑錠片氟離子釋放四天後，就與之後天數的釋氟量沒有統計上的顯著差異，表示從第四天開始氟離子就能以低含量  $0.72 \pm 0.17 \sim 1.62 \pm 0.45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  穩定釋放。以獨立樣本 t 檢定比較累積六天的氟離子濃度發現 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑錠片在總釋氟量上沒有統計上的顯著差異，2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片的總釋氟量為  $12.87 \pm 1.78\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；Clinpro™ 溝隙封填劑錠片的總釋氟量為  $9.92 \pm 1.50\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

#### 5.5.2 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑氟離子再吸收方面的比較

(表 9)

此試驗是將直徑 6mm、高度 2mm 的樣品泡在 5ml 的去離子水中橫放振盪六天過後，將 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片和 Clinpro™ 溝隙封填劑錠片取出分別放入 50ml 離心管中，每個離心管內注入 45ml 的去離子水，以超音波振盪機振盪 10 分鐘，以去除遺留在錠片上的氟離子，再將錠片從去離子水中取出，擦乾並吹乾。調配 0.2% 氟化鈉水溶液，在每個 15ml 離心管中分別放入 10ml 的氟化鈉水溶液，將各組錠片分別加入後，以試管振盪機將每管樣本各振盪 1 分鐘，將錠片取出，重新泡到 5ml 的去離子水中，再連續偵測三天的氟離子釋放含量。結果可以發現 2% 奈米氟幾丁聚醣雖然聚合在樹脂錠片內，仍可與市售的 Clinpro™ 溝隙封填劑錠片相比較，有相等程度的氟離子再吸收能力。比較兩種錠片再吸收後連續三天的釋氟含量，發現 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片的氟釋放量與 Clinpro™ 溝隙封填劑錠片的氟釋放量沒有明顯的不同。以獨立樣本 t 檢定比較經再吸收處理後累積三天的氟離子釋放量，發現 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑錠片在總釋氟量上無顯著差異，2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片的總釋氟量為  $4.59 \pm 1.78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；Clinpro™ 溝隙封填劑錠片的總釋氟量為  $5.16 \pm 1.24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。經過再吸收處理後，2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂及 Clinpro™ 溝隙封填劑錠片的釋氟量標準差相較於單純進行氟離子釋放的實驗來說都較大，可能因為將錠片放於 0.2% 氟化鈉水溶液以試管振盪機振盪來模擬再吸收的環境，不能真正使每個錠片平均吸收氟離子，須以其他方式模擬或增加重複次數。

## 第六章 討論

經由以上的研究，我們發現相對於市售的 Clinpro™ 溝隙封填劑，2%的奈米氟幾丁聚醣樹脂有更好的抗菌效果，優良的生物相容性與機械強度，且與 Clinpro™ 溝隙封填劑有相等的氟離子釋放與再吸收能力。以下會分別探討：

此篇研究中設定的奈米氟幾丁聚醣的濃度為 2%與 4%。選擇 2%奈米氟幾丁聚醣加入樹脂的原因為參考 Mahapoka[10]於 2012 年發表的文章，他比較含不同含量 1、1.5、2、2.5%的幾丁聚醣樹脂其抑制轉醣鏈球菌效果，結果發現至少要 2%幾丁聚醣才有明顯的抗菌效果。以菌落形成單位來說，2%或以上的幾丁聚醣至少有 72.2%細菌減少量，少於 2%的幾丁聚醣只有 31.2~39.2%的細菌減少量，而控制組的細菌減少量為 13.7%，因此以至少 2%的含氟幾丁聚醣加入到樹脂中；而 4%的含氟幾丁聚醣樹脂則是參考 Rajabnia[11]在 2016 年與 Massouda[60]在 2012 年發表的研究。目前筆者回顧到關於幾丁聚醣加入牙科樹脂以幫助抗菌的文獻中，5%的幾丁聚醣為加入樹脂中的最高濃度。Rajabnia[11]在其研究中發現中加入 2~5%的含氟幾丁聚醣，隨濃度越高抗菌效果越好，在培養轉醣鏈球菌 9 小時後，與菌落形成單位呈現線性負相關。但此研究的操作變因有時間和幾丁聚醣的濃度，卻只有使用 One-way ANOVA 作統計，因此 5%的幾丁聚醣是否有最好的抗菌效果不得而知；而 Massouda[60]在 2012 年發表的研究中，將 2.5%和 4%的幾丁聚醣混合乙烯共聚物(copolymer)當作抗菌包裝，抑制大腸桿菌、李斯特菌以及沙門氏桿菌，結果利用搖瓶測試(shake-flask test)發現培養細菌 24 小時後，4%的幾丁聚醣對於此三種細菌可減少其菌量的 100 倍(2 log<sub>10</sub>)，相對於 2.5%的幾丁聚醣有更穩定的抗菌效果。因此，此實驗在抗菌效果與生物相容性中設計的組別為不加奈米氟幾丁聚醣的純樹脂、2%與 4%的奈米氟幾丁聚醣樹脂這三種。而在分子量大小方面，選擇了中分子量大小的幾丁聚醣，參考的是 Kim 在 2013 年發表的研究。他比較含不同分子量的 2%幾丁聚醣樹脂其對轉醣鏈球菌之抗菌能力，偵測抗菌能力的方式為測量吸光值和計算菌落形成單位，以吸光值觀察，發現分子量大小不影響抑制轉醣鏈



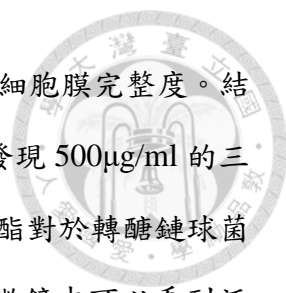
球菌的能力；但是在菌落形成單位上，雖然沒有統計上顯著差異，但中分子量的幾丁聚醣( $(0.19 \pm 0.16) \times 10^9$  CFU)相較於低與高分子量的幾丁聚醣( $(0.53 \pm 0.32) \times 10^9$  :  $(0.63 \pm 0.60) \times 10^9$  CFU)有最少的菌落形成單位。關於去乙醯化程度的部分，根據 Hussain[61]在 2013 年發表的研究中提到幾丁聚醣的去乙醯化程度最低要有 40~60% 才有抗菌效果，而市面上大部分的幾丁聚醣產品為 70~90%，若為了提升抗菌程度使去乙醯化程度大於 95%，可能會導致幾丁聚醣結構不穩定而解聚 (depolymerization)，因此筆者選擇的為 75~85% 去乙醯化的幾丁聚醣。

奈米氟幾丁聚醣的製備為參考 2019 年 Niousha[12]的研究，以三聚磷酸鈉當作交聯劑，並利用離子凝膠法結合氟化鈉與幾丁聚醣形成奈米氟幾丁聚醣。據其結果所述，奈米氟幾丁聚醣的粒徑為 219nm，多分散性指數(polydispersity, PDI)為 0.447；傅立葉紅外線光譜儀中有  $734\text{ cm}^{-1}$  特徵鋒，可能為三氟甲基( $\text{CF}_3$  group)。本研究將其配方中的幾丁聚醣濃度從 1mg/ml 增加到 10mg/ml，為參考 SIGMA-ALDRICH 公司對於幾丁聚醣在 1% 醋酸水溶液中的溶解度測試；另外將氟化鈉濃度從 12mg/ml 增加到 60mg/ml，並在前 6 小時內加熱攪拌溶解幾丁聚醣後加入。參考的是氟化鈉在室溫下的溶解度為 41.3mg/ml，因此若在高溫的環境下所加藥量超過其溶解度，會形成過飽和溶液，隔夜冷卻後沉澱析出後形成飽和溶液，使氟離子能最大限度的與幾丁聚醣結合，預期能釋放更多的氟離子。據 Niousha[12]的研究結果所述，奈米氟幾丁聚醣其粒徑為 219nm，多分散性指數為 0.45；於傅立葉紅外線光譜儀中會有  $734\text{ cm}^{-1}$  特徵鋒，推測可能為三氟甲基( $\text{CF}_3$  group)。本研究做出來的奈米氟幾丁聚醣粒徑為 629nm，多分散指數為 0.68，於傅立葉紅外線光譜儀中有  $738\text{ cm}^{-1}$  特徵鋒。推測粒徑大小較大且粒徑分布較不平均的原因可能來自於界達電位(zeta potential)因加入濃度較高的氟離子，而從帶正電的幾丁聚醣變為較中性的幾丁聚醣，使幾丁聚醣粒子聚集，粒徑增大且粒徑大小較不一致，不過本研究中樹脂機械強度的提供主要來自於 16~20% 均勻分散的奈米級矽烷化

二氧化矽，奈米氟幾丁聚醣所佔的重量百分比僅為 2% 或 4%，所以對於機械強度的影響較小。

關於選擇 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂作為與市售產品比較機械強度，氟離子釋放與再吸收能力的原因，需將抗菌效果的實驗與生物相容性的實驗一併探討。在菌落形成單位的實驗中發現 0%、2%、4% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑都與控制組有統計上顯著意義的抗菌效果，但 2% 與 4% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂相較於 0% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑又更抗菌，2% 與 4% 的奈米氟幾丁聚醣的抗菌效果沒有統計上顯著意義的差別。因此在抗菌效果的部分可能會選擇 2% 或 4% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂；且在掃描式電子顯微鏡中觀察到 0% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的錠片上其細菌數量明顯多於 2% 或 4% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片，更確認奈米氟幾丁聚醣樹脂良好的抗菌效果。但在細胞存活率的實驗中發現，4% 奈米氟幾丁聚醣萃取原液與 Clinpro™ 溝隙封填劑萃取原液在培養纖維母細胞第一天後，細胞數目與其他組別有明顯的差別，因此推測其原液有細胞毒性或會影響細胞複製，將其萃取液以液態培養基稀釋 10 倍後，才能得到與控制組、0% 奈米氟幾丁聚醣、2% 奈米氟幾丁聚醣相等的細胞存活率，因此考量了生物相容性後，選擇 2% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂與市售產品比較機械強度，氟離子釋放與再吸收能力。從抗菌效果與機械強度的觀點也可以分析，若 2% 與 4% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂沒有抗菌效果方面的差異，以填料含量固定為 20% 來說，2% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂相對於 4% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂內有更多的奈米級矽烷化二氧化矽，更能有效提供機械強度。

關於 0% 奈米氟幾丁聚醣樹脂相對於控制組也有抗菌效果的解釋為樹脂中可浸出物(leachables)的析出。Lin[62]於 2018 年的研究中探討樹脂中單體與起始劑對於轉醣鏈球菌的影響，以不同含量的酚 A-甲基丙烯酸縮水甘油酯、三乙二醇二甲基丙烯酸酯、樟腦醃、對二甲胺基苯甲酸乙酯搭配培養基培養細菌後，測量培養基中的 pH 值，以結晶紫試驗(crystal violet assay)觀察細菌的生物質量(biomass)，



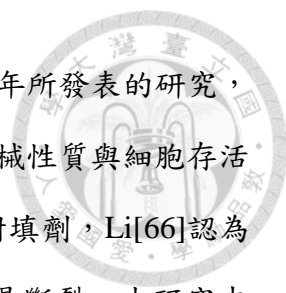
以 MTT 試驗測量細菌活性，以螢光顯微鏡觀察細菌的存活率與細胞膜完整度。結果發現在培養細菌 24 小時後，即使將生物質量標準化後，仍可發現 500 $\mu$ g/ml 的三乙二醇二甲基丙烯酸酯與 50 $\mu$ g/ml 的酚 A-甲基丙烯酸縮水甘油酯對於轉糖鏈球菌的細菌活性有統計上顯著意義的影響，大幅降低，且在螢光顯微鏡中可以看到活細菌大幅減少的樣貌，反而 100 $\mu$ g/ml 的樟腦醃能明顯增加細菌活性。因此雖然樹脂中沒有加入奈米氟幾丁聚醣，但仍因為單體釋出，而有些微的抗菌效果。Clinpro™ 溝隙封填劑雖然在菌落形成單位的計算上也有些微抗菌能力，但在電子顯微鏡上可以看到菌量非常多，說明了有限的抗菌效果。

在細胞存活率的試驗中，4%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的萃取原液在培養纖維母細胞一天以後，細胞數量相對於控制組、0%奈米氟幾丁聚醣樹脂和 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂組別較少。關於 Clinpro™ 溝隙封填劑的細胞毒性探討，Koulaouzidou[63] 在 2018 年比較了五種不同溝隙封填劑 (BeautiSealant(SHOFU)，Clinpro (3M/ESPE)，Conseal f (SDI)，Grandio Seal(VOCO) 和 Heliaseal Clear (Ivoclar/Vivadent))其釋放的有機物，並且觀察其對於 NIH/3T3 細胞的毒性。此篇研究中利用氣相層析質譜儀(Gas chromatography–mass spectrometry，GC-MS)分析各種溝隙封填劑內釋放的成分與含量，並以台盼藍染色直接做細胞計數，估計細胞數量。以 Clinpro™ 溝隙封填劑來說，將直徑 6mm，高度 2mm 的樹脂錠片泡入含有 0.1%咖啡因(cafeine，%CF)的 1% 甲醇中密封 1 天和 40 天後用氣相層析質譜儀測量析出物成分與濃度，析出物成分包括 2,6-二丁基羥基甲苯 (butylated hydroxytoluene，BHT)、乙二醇二甲基丙烯酸酯 (diethyleneglycoldimethacrylate，DEGDMA)、N-二甲基氨基苯甲酸丁基乙氧基酯 (N-dimethylaminobenzoic acid butylethoxyester，DMABEE)、二甲基丙烯酸乙二醇酯 (Ethyleneglycol dimethacrylate，EGDMA)、四丁基四氟硼酸銨 (Tetrabutylammonium tetrafluoroborate，TBATFB)和三乙二醇二甲基丙烯酸酯 (TEGDMA)。並將細胞培養 24 小時後觀察細胞存活率，其細胞存活率根據溝隙封

填劑含量的不同(25mg/盤~100mg/盤)而不同，約 40~70%。在此篇研究中的討論中提到，造成細胞毒性的原因為高濃度的三乙二醇二甲基丙烯酸酯( $140966 \pm 77135$  %CF, 1<sup>st</sup> day)所造成的粒線體損壞和氧化壓力。

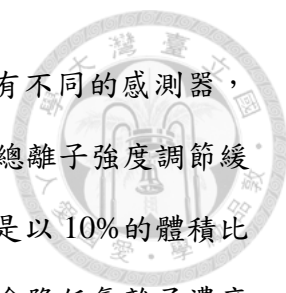
關於培養細胞於 4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂萃取原液後細胞數量減少，其原因可能來自於細胞複製速率下降，而非直接性的細胞毒殺。首先筆者根據離子層析儀測量的 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂第一天氟離子釋放量，估計 4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂萃取原液的氟離子濃度至少有 10ppm。探討氟離子造成細胞毒性的首篇文章為 1956 年 Berry 和 Trillwood[64]所做的研究「氟化鈉與細胞生長」，所培養的細胞為子宮頸癌細胞/海拉細胞(HeLa cell)和小鼠纖維細胞(L mouse fibroblasts)。以含不同含量氟化鈉(0.1ppm、1ppm、10ppm)的培養基培養 7 天後，觀察相對於控制組的細胞數量百分比，結果發現海拉細胞或小鼠細胞在含 0.1ppm 或是 1ppm 的氟化鈉培養基培養 7 天後，其細胞存活率為 82.7~86.8%，但是以含 10ppm 的氟化鈉培養基培養，海拉細胞的存活率為 72.3%，小鼠纖維細胞的細胞存活率為 64.2%。根據 ISO10993-5 的規範，若細胞存活率小於 70%，是有生物毒性的疑慮。因此，此篇文章的作者說明 10ppm 的氟離子濃度雖然不像 100ppm 的氟離子濃度會直接造成細胞死亡，但會使細胞複製速率明顯下降。日本學者 Oguro[65]在 1982 年發表的文章中提到雖然各篇研究中所使用的細胞株不盡相同，但是氟離子濃度在 8~20ppm 之間就會造成初期的(incipient)細胞生長抑制，而細胞生長完全抑制使之死亡的濃度介於 40~60ppm 之間。

機械強度的部分比較了 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的聚合深度、表面抗壓強度、徑向抗拉/壓強度、抗彎強度與流動性。聚合深度參考 ISO6874:2005 的規範，其聚合深度至少要 1.5mm。Clinpro™ 溝隙封填劑的平均聚合深度為 3.63mm，2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的平均聚合深度為 5.93mm，都有達到標準，推測奈米氟幾丁聚醣樹脂之聚合深度優於 Clinpro™ 溝隙封填劑的聚合深度原因為奈米級幾丁聚醣有高透光性，所以聚合深度較深。聚合深度、表面抗壓強




度、徑向抗拉/壓強度、抗彎強度的測試方法為參考 Li[66]在 2019 年所發表的研究，將含氟蒙脫土加入到樹脂基質中與 Clinpro™ 溝隙封填劑比較機械性質與細胞存活率，結果發現含氟蒙脫土樹脂之機械強度弱於 Clinpro™ 溝隙封填劑，Li[66]認為其機械強度不如預期的原因為氣泡陷入材料中，使受壓時較容易斷裂。本研究中華者利用電磁加熱攪拌器暫時提高樹脂的流動性，使樹脂在加入模具時盡量減少因黏稠度太高卡進氣泡的現象，因此測量表面抗壓強度、徑向抗拉/壓強度時的數值都比 Clinpro™ 溝隙封填劑來的高。抗彎強度方面雖然沒有統計上顯著的差異性，但 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的平均抗彎強度為 73.13Mpa，Clinpro™ 溝隙封填劑的平均抗彎強度為 68.58Mpa，還是較高。而流動性方面因添加了 18% 的奈米級矽烷化二氧化矽，而使流動性下降，以 150g 重的力量穩定施力於 10μl 的代測樣品一分鐘，發現 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的平均流動性為 8.83mm，Clinpro™ 溝隙封填劑的平均流動性為 21.67mm。若要增加流動性以及同時提供強度，或許能嘗試將雙酚 A-甲基丙烯酸縮水甘油酯和三乙二醇二甲基丙烯酸酯的比例從 7:3 變成 1:1，增加三乙二醇二甲基丙烯酸酯的含量以調整流動性。

在氟離子釋放與再吸收的實驗中，本篇研究所使用的方法為離子層析儀分析與分批法(batch/static method)。目前分析水中陰離子濃度的方法大致上包括三種，即是離子層析儀分析、離子選擇性電極分析(ion-selective electrode, ISE)以及 SPADNS 比色法(SPADNS method)。離子層析儀分析為將水樣中之待測陰離子，隨流洗液流經一系列陰離子層析管柱時，因其與強鹼性陰離子交換樹脂間之親和力不同而被分離，分離後再流經一高容量陽離子交換樹脂抑制裝置，而被轉換成具高導電度酸之形態，移動相溶液則轉換成低導電度之碳酸。經轉換後之待測陰離子再流經電導度偵測器，即可依其滯留時間及波峰面積、高度或感應強度予以定性及定量。而本次實驗發現，氟離子因與陰離子交換樹脂間的親和力較低，所以滯留時間短，大概 2.8 分鐘後即可看到波峰出現。第二種方法為離子選擇性電極，它很類似酸鹼度計(PH meter)，是透過一個轉換器或感測器(transducer/sensor)，將



樣品中特定離子的濃度轉換為電訊號加以分析，而不同的離子有不同的感測器，需特別購買。並且在分析的時候可能以 50% 的體積百分比加入總離子強度調節緩衝溶液二號(Total Ionic Strength Adjustment Buffer, TISAB II)或是以 10% 的體積比加入總離子強度調節緩衝溶液三號(TISAB III)，其功能在於結合會降低氟離子濃度的鐵離子或鋁離子，使溶液具有較高的待測離子強度。第三種方法為 SPADNS 比色法，透明無色或是偏黃 SPADNS 會與與氯氧化鋇·八水化合物( $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ )形成紅色錯合物的染劑。此染劑會被氟離子還原成氟鋇酸離子( $\text{ZrF}_6^{2-}$ )，釋放出黃色或透明的 SPADNS，使紅色溶液變淺，轉成黃色。需要利用紫外-可見分光光度法(Ultraviolet-visible spectroscopy)來測量，最大吸收波長為 580nm。此三種方法當中，敏感度最高的是離子層析儀分析，最低的是 SPADNS 比色法，雖然廠商的產品目錄中提到 SPADNS 染劑可以偵測 0.02~2ppm 的氟離子，但待測離子的體積至少要 10ml，且樣本可能需要經過蒸餾純化，才能測得吸光值與離子濃度的關係。本次實驗所釋放的氟離子濃度根據 Li[66] 在 2019 年的研究，在釋放後期可能低於 1ppm，因此仍然使用敏感度較高的離子層析儀來分析。在實驗設計方面，有兩種方法，分別為連續流動系統(continuous flow system)[66-68]和分批法，連續流動系統被認為能在口外模擬改變陰離子濃度的參數，例如唾液流速、殘餘量(residual volume)、復形物的表面積以及唾液的成分，有許多研究都是使用連續流動系統來偵測不同參數，如環境酸鹼值，對於氟離子釋放的影響。而分批法為最常使用來偵測離子釋放量的方法，將待測樣品放入液體中一段時間，收集液體並過濾，偵測離子釋放量。根據 Carey[68]在 2003 年的研究中提到，分批法可長達兩年之久。筆者比較了兩篇不同的研究，利用連續流動系統和分批法測得的 Clinpro™ 溝隙封填劑的氟離子釋放濃度，發現兩者之間測得的數值並沒有明顯的差異，又因為此篇研究並沒有改變影響氟離子釋放的參數，所以選擇了分批法作為實驗設計。關於實驗時間長短的選擇則是比較了三篇不同的研究，Li[66]在 2019 年的研究中其氟釋放與再吸收的時間長短分別為 14 天和 7 天，並每天收集樣品過濾分析；Ei[69]在 2018



年的研究中其氟釋放與再吸收的時間一樣是 14 天和 7 天，但是每兩天收集一次樣本；Hsu[67]在 2004 年的研究中其氟釋放與再吸收的時間為 6 天和 1 天，但是在氟釋放和再吸收的第一天，以每半小時到一小時的頻率密集收集樣本。綜合以上關於氟釋放與再吸收的時間長短的選擇，筆者決定參考 Hsu[67]和 Li[66]的實驗設計，氟釋放時間為 6 天，再吸收時間為 3 天，並每天收集樣品過濾分析。原因是根據 Hsu[67]在其研究結果與討論中所述，即使是在醫界公認能釋放氟離子的玻璃離子體，在其釋放後的第四天即以低離子濃度的方式緩慢穩定釋放，之後偵測到的離子濃度都與第四天的離子濃度沒有統計上的顯著差異。最後是探討浸泡錠片的溶液，大部分的研究都是將錠片浸泡到去離子水中分析，但在 Ei[69]的研究中，使用了含有酪蛋白(casein)的人工唾液來模擬口內狀態，他認為酪蛋白能模擬唾液中的磷蛋白(phosphoprotein)。磷蛋白有調節口內礦物質沉積的功效，它可以減少含氟氫氧磷灰石(fluoride apatite)的沉積於牙齒表面，使牙齒表面上的氟離子運輸順利而不會受到阻撓。但因為此篇研究僅單純研究材料的氟離子釋放與再吸收能力，所以以去離子水浸泡。本篇研究在氟離子釋放的結果顯示 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的釋放曲線與 Clinpro™ 溝隙封填劑的釋放曲線有統計上的顯著差異，其來自於第一天 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的氟離子平均釋放量为  $4.02\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，而 Clinpro™ 溝隙封填劑的平均釋放量为  $2.58\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。以 One-way ANOVA 和 Tukey's test 發現 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的釋放曲線在其釋放後的第三天即以低離子濃度的方式緩慢穩定釋放，之後偵測到的離子濃度都與第三天的離子濃度沒有統計上的顯著差異；而 Clinpro™ 溝隙封填劑是第四天開始即以低離子濃度的方式緩慢穩定釋放。在累積六天後的氟離子總釋放量上沒有顯著差異，顯示 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂有與市售產品同樣優良的氟離子釋放能力。而在再吸收分析的部分，其氟離子再吸收總量上沒有明顯的差異。2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂為  $4.59\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，而 Clinpro™ 溝隙封填劑為  $5.16\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。再吸收實驗中所測得的數值標準差較大，可能是因為將樣品放到試管振盪機上振盪，並不能使樣品平均吸收氟離子。

## 第七章 結論



1. 奈米氟幾丁聚醣在合成後，從傅立葉紅外線光譜中看到除了幾丁聚醣本身的特徵峰， $1567\text{cm}^{-1}$  和  $1417\text{cm}^{-1}$ ，還多了  $738\text{cm}^{-1}$ ，顯示三氟甲基形成的可能性。
2. 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的菌落形成單位為控制組的 10%，4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的菌落形成單位為控制組的 25%，兩者的抗菌效果沒有統計上顯著的差異。但相較於 0% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂(54%)和 Clinpro™ 溝隙封填劑(45%)有更明顯的抗菌效果。掃描式電子顯微鏡中可以看到 2% 和 4% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂菌量少於 0% 奈米氟幾丁聚醣樹脂和 Clinpro™ 溝隙封填劑的菌量。
3. 4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑萃取原液影響細胞複製能力或造成細胞死亡，但將萃取液稀釋 10 倍後，奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的細胞存活率良好，且沒有細胞毒性。
4. 2% 和 4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌效果沒有差異，且 4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂可能有影響細胞複製的能力，故最後選擇 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑比較機械性質的強度。另外，以填料重量百分比固定為 20% 來說，2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的奈米級矽烷化二氧化矽含量為 18%，相對於 4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂有更多的奈米級矽烷化二氧化矽，理論上機械強度會更高，因此更增加我們選擇 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑比較機械性質的合理性。
5. 經過機械性質測試，我們發現 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂的聚合深度、表面抗壓強度、徑向抗拉/壓強度皆高於 Clinpro™ 溝隙封填劑。抗彎強度方面沒有差異性，流動性方面則較差。
6. 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂其氟離子釋放曲線 Clinpro™ 溝隙封填劑的釋放曲線有統計上的顯著差異，其來自於第一天氟離子平均釋放量为  $4.02\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，而 Clinpro™ 溝隙封填劑的平均釋放量为  $2.58\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。但氟離子總釋放量則沒有差異，以上結果顯示 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂有與市售產品有同樣優良的氟離子釋放能力。再吸收



氟離子三天後，其氟離子再吸收量相比上沒有統計的顯著差異，表示 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑有相同的氟離子再吸收能力。



## 第八章 檢討與未來研究方向



本篇研究還有許多值得改進和探討的地方，雖然在製備奈米氟幾丁聚醣的時候增加氟化鈉濃度可能使氟離子釋放量增加，但因氟離子增加較多使幾丁聚醣的界達電位下降，可能會降低幾丁聚醣的正電性使之聚集，不能穩定分散於樹脂中，降低抗菌效果。幾丁聚醣的抗菌機制來自於與細菌表面因電性相反而結合，使細菌通透性增加而裂解死亡。雖然本次研究仍然能明顯觀察到奈米氟幾丁聚醣的抗菌效果，但正電性減少造成抗菌效果下降的疑慮也得深思或進一步探討。

本次實驗在測量材料抗菌效果與吸光值的關係是用阿爾瑪藍細胞增殖及毒性檢測試驗，此試驗做出來的結果在菌量低於  $10^6$  下即無法偵測抗菌效果帶來的影響，可能是來自於阿爾瑪藍細胞增殖及毒性檢測試驗雖然可偵測活細菌，但它主要還是測量細胞存活率，對於細菌量與吸光值的關係可能需要針對細菌染色且敏感度更高的測試組。在菌落形成單位的測量方面，雖然大部分的研究都使用此法來比較抗菌效果，但此法的結果重現性較低，需要做非常多次實驗才能看出其中的趨勢，原因是影響細菌成長的環境因子太複雜，希望未來能有更好的方法能偵測材料對於細菌的抗菌效果。

機械性質測試方面雖然以加熱的方式暫時提高流動性避免氣泡陷入，但在臨床使用上可能需要調整三乙二醇二甲基丙烯酸酯的比例或是減少奈米級矽烷化二氧化矽的含量，使溝隙封填劑兼具不錯的強度與操作性，目前製作出來的性質與一般填補用的流動性樹脂相似。

氟離子釋放與再吸收的部分，筆者認為測量出來的數值較低，主要是離子層析儀的機台過於老舊，管路即使以去離子水清洗多次，背景導電度仍較高，所以積分出來的波峰面積相對較少，因此關於奈米氟幾丁聚醣樹脂的氟離子釋放能力可更期待；氟離子濃度測試方法僅為浸泡，口腔內材料會經過咬耗而使內部露出，釋放更多的氟離子，本篇測量出來的濃度僅為材料表面氟離子的釋放能力，未來可能可以將材料壓碎集中，更能確切知道錠片總體可釋放的氟離子含量。

## 第九章 參考文獻

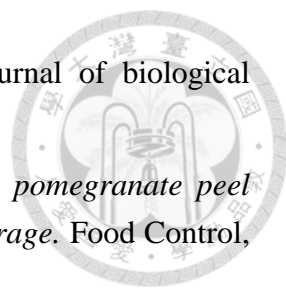


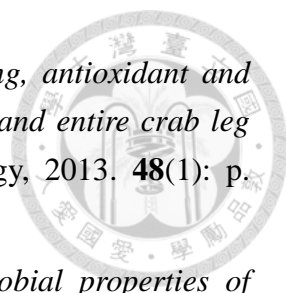
1. Ganesh, M. and T. Shobha, *Comparative evaluation of the marginal sealing ability of Fuji VII and Concise as pit and fissure sealants*. J Contemp Dent Pract, 2007. **8**(4): p. 10-8.
2. Simonsen, R.J., *Retention and effectiveness of dental sealant after 15 years*. J Am Dent Assoc, 1991. **122**(10): p. 34-42.
3. Koyuturk, A.E., et al., *Effect of thermal cycling on microleakage of a fissure sealant polymerized with different light sources*. Dent Mater J, 2006. **25**(4): p. 713-8.
4. Lin, N.J., et al., *Effect of dental monomers and initiators on Streptococcus mutans oral biofilms*. Dent Mater, 2018. **34**(5): p. 776-785.
5. Lussi, A., E. Hellwig, and J. Klimek, *Fluorides - mode of action and recommendations for use*. Schweiz Monatsschr Zahnmed, 2012. **122**(11): p. 1030-42.
6. Li, Y.H. and G.H. Bowden, *The effect of environmental pH and fluoride from the substratum on the development of biofilms of selected oral bacteria*. J Dent Res, 1994. **73**(10): p. 1615-26.
7. Hamilton, I.R., *Biochemical effects of fluoride on oral bacteria*. J Dent Res, 1990. **69 Spec No**: p. 660-7; discussion 682-3.
8. Rathke, A., et al., *Antibacterial activity of a triclosan-containing resin composite matrix against three common oral bacteria*. J Mater Sci Mater Med, 2010. **21**(11): p. 2971-7.
9. Wicht, M.J., et al., *Treatment of root caries lesions with chlorhexidine-containing varnishes and dentin sealants*. Am J Dent, 2003. **16 Spec No**: p. 25a-30a.
10. Mahapoka, E., et al., *Chitosan whiskers from shrimp shells incorporated into dimethacrylate-based dental resin sealant*. Dent Mater J, 2012. **31**(2): p. 273-9.
11. Rajabnia, R., et al., *Anti-Streptococcus mutans property of a chitosan: Containing resin sealant*. J Int Soc Prev Community Dent, 2016. **6**(1): p. 49-53.
12. Niousha, E., et al., *Chitosan/fluoride Nanoparticles for Preventing Dental Caries*. Current Dentistry, 2019. **1**(1): p. 61-67.
13. Kaste, L.M., et al., *Coronal caries in the primary and permanent dentition of children and adolescents 1-17 years of age: United States, 1988-1991*. J Dent



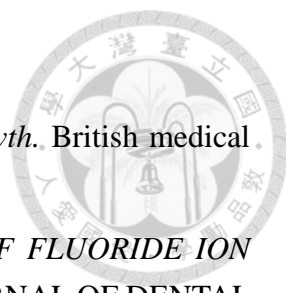
- Res, 1996. **75 Spec No:** p. 631-41.
14. Demirci, M., S. Tuncer, and A.A. Yuceokur, *Prevalence of caries on individual tooth surfaces and its distribution by age and gender in university clinic patients.* Eur J Dent, 2010. **4**(3): p. 270-9.
  15. Nagano, T., *Relation between the form of pit and fissure and the primary lesion of caries.* Shika gakuho, 1960. **60**: p. 80-90.
  16. Hyatt, T.P., *Prophylactic odontomy, the cutting into the teeth for the prevention of disease.* Dent. Cos., 1923. **65**: p. 234-241.
  17. Klein, H. and J.W. Knutson, *XIII. Effect of Ammoniacal Silver Nitrate on Caries in the First Permanent Molar.* The Journal of the American Dental Association, 1942. **29**(11): p. 1420-1426.
  18. Ast, D.B., A. Bushel, and H.C. Chase, *A Clinical Study of Caries Prophylaxis with Zinc Chloride and Potassium Ferrocyanide.* The Journal of the American Dental Association, 1950. **41**(4): p. 437-442.
  19. Symons, A.L., C.Y. Chu, and I.A. Meyers, *The effect of fissure morphology and pretreatment of the enamel surface on penetration and adhesion of fissure sealants.* J Oral Rehabil, 1996. **23**(12): p. 791-8.
  20. Garg, N., et al., *Comparative Evaluation of Penetration Ability of Three Pit and Fissure Sealants and Their Relationship with Fissure Patterns.* Journal of dentistry (Shiraz, Iran), 2018. **19**(2): p. 92-99.
  21. Innes, N.P., D.J.P. Evans, and D.R. Stirrups, *The Hall Technique; a randomized controlled clinical trial of a novel method of managing carious primary molars in general dental practice: acceptability of the technique and outcomes at 23 months.* BMC Oral Health, 2007. **7**(1): p. 18.
  22. Selecman, J.B., B.M. Owens, and W.W. Johnson, *Effect of preparation technique, fissure morphology, and material characteristics on the in vitro margin permeability and penetrability of pit and fissure sealants.* Pediatr Dent, 2007. **29**(4): p. 308-14.
  23. Gooch, J., H. Dong, and F. Schork, *Waterborne oil-modified polyurethane coatings via hybrid miniemulsion polymerization.* Journal of Applied Polymer Science, 2000. **76**: p. 105-114.
  24. Kim, B.K. and J.C. Lee, *Waterborne polyurethanes and their properties.* Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 1996. **34**(6): p. 1095-1104.
  25. Madbouly, S.A., et al., *Rheological Behavior of Aqueous Polyurethane*

- Dispersions: Effects of Solid Content, Degree of Neutralization, Chain Extension, and Temperature*. *Macromolecules*, 2005. **38**(9): p. 4014-4023.
26. Shin, E.J. and S.M. Choi, *Advances in Waterborne Polyurethane-Based Biomaterials for Biomedical Applications*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1077**: p. 251-283.
  27. Dawes, C., *What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid?* *J Can Dent Assoc*, 2003. **69**(11): p. 722-4.
  28. Arends, J. and J. Christoffersen, *The nature of early caries lesions in enamel*. *J Dent Res*, 1986. **65**(1): p. 2-11.
  29. ten Cate, J.M. and P.P. Duijsters, *Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I. Chemical data*. *Caries Res*, 1983. **17**(3): p. 193-9.
  30. Ogaard, B., et al., *Microradiographic study of demineralization of shark enamel in a human caries model*. *Scand J Dent Res*, 1988. **96**(3): p. 209-11.
  31. Caslavaska, V., E.C. Moreno, and F. Brudevold, *Determination of the calcium fluoride formed from in vitro exposure of human enamel to fluoride solutions*. *Arch Oral Biol*, 1975. **20**(5-6): p. 333-9.
  32. Saxegaard, E. and G. Rolla, *Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro*. *Scand J Dent Res*, 1988. **96**(6): p. 523-35.
  33. Klimek, J., et al., *Fluoridaufnahme im Zahnschmelz nach Anwendung von NaF-und AmF-Zahnpasten*. *Oralprophylaxe*, 1998. **20**: p. 192-196.
  34. Weatherell, J.A., et al., *Assimilation of fluoride by enamel throughout the life of the tooth*. *Caries Res*, 1977. **11 Suppl 1**: p. 85-115.
  35. van der Mei, H.C., et al., *Effects of amine fluoride on biofilm growth and salivary pellicles*. *Caries Res*, 2008. **42**(1): p. 19-27.
  36. ten Cate, J.M. and C. van Loveren, *Fluoride mechanisms*. *Dent Clin North Am*, 1999. **43**(4): p. 713-42, vii.
  37. Hosseinnjad, M. and S.M. Jafari, *Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016. **85**: p. 467-475.
  38. Severino, R., et al., *Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against Escherichia coli O157: H7 and Salmonella Typhimurium on green beans*. *Food control*, 2015. **50**: p. 215-222.
  39. Zhihan, L. and R. Yang, *Synthesis and characterization of chitosan derivatives*

- 
- with dual-antibacterial functional groups. *International journal of biological macromolecules*, 2015. **75**.
40. Yuan, G., et al., *Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage*. *Food Control*, 2016. **59**: p. 818-823.
  41. Chien, R.-C., M.-T. Yen, and J.-L. Mau, *Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells*. *Carbohydrate polymers*, 2016. **138**: p. 259-264.
  42. Fernandez-Saiz, P., J.M. Lagaron, and M. Ocio, *Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area*. *Food Hydrocolloids*, 2009. **23**: p. 913-921.
  43. Alburquerque, C., et al., *Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of Candida spp.* *Med Mycol*, 2010. **48**(8): p. 1018-23.
  44. Devlieghere, F., A. Vermeulen, and J. Debevere, *Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables*. *Food microbiology*, 2004. **21**(6): p. 703-714.
  45. Kulikov, S.N., et al., *Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some Candida species and clinical isolates of Candida albicans: molecular weight-activity relationship*. *Eur J Med Chem*, 2014. **74**: p. 169-78.
  46. Ye, M., H. Neetoo, and H. Chen, *Control of Listeria monocytogenes on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films*. *Food Microbiol*, 2008. **25**(2): p. 260-8.
  47. Li, X.-f., et al., *Chitosan kills Escherichia coli through damage to be of cell membrane mechanism*. *Carbohydrate Polymers*, 2010. **79**(3): p. 493-499.
  48. Reesha, K.V., et al., *Development and characterization of an LDPE/chitosan composite antimicrobial film for chilled fish storage*. *Int J Biol Macromol*, 2015. **79**: p. 934-42.
  49. Xiaorong, f., et al., *Chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups for antimicrobial finishing of cotton fabrics*. *Carbohydrate Polymers - CARBOHYD POLYM*, 2011. **85**: p. 221-227.
  50. Liu, N., et al., *Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli*. *Carbohydrate polymers*, 2006. **64**(1): p. 60-65.
  51. Chung, Y.C., et al., *Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall*. *Acta Pharmacol Sin*, 2004. **25**(7): p. 932-6.

- 
52. Byun, S.M., et al., *Comparison of physicochemical, binding, antioxidant and antibacterial properties of chitosans prepared from ground and entire crab leg shells*. International Journal of Food Science & Technology, 2013. **48**(1): p. 136-142.
  53. Jeihanipour, A., K. Karimi, and M. Taherzadeh, *Antimicrobial properties of fungal chitosan*. Research journal of biological sciences, 2007. **2**(3): p. 239.
  54. Chien, R.C., M.T. Yen, and J.L. Mau, *Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells*. Carbohydr Polym, 2016. **138**: p. 259-64.
  55. Husain, S., et al., *Chitosan Biomaterials for Current and Potential Dental Applications*. Materials (Basel, Switzerland), 2017. **10**(6): p. 602.
  56. Kim, J.-S. and D.-H. Shin, *Inhibitory effect on Streptococcus mutans and mechanical properties of the chitosan containing composite resin*. Restorative dentistry & endodontics, 2013. **38**(1): p. 36-42.
  57. Gomez-Estaca, J., et al., *Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation*. Food Microbiol, 2010. **27**(7): p. 889-96.
  58. Sanpui, P., et al., *The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticles composite*. Int J Food Microbiol, 2008. **124**(2): p. 142-6.
  59. Yang, H., et al., *Effects of combined aqueous chlorine dioxide and chitosan coatings on microbial growth and quality maintenance of fresh-cut bamboo shoots (Phyllostachys praecox f. prevernalis.) during storage*. Food and Bioprocess Technology, 2015. **8**(5): p. 1011-1019.
  60. Massouda, D.F., et al., *Extruded Blends of Chitosan and Ethylene Copolymers for Antimicrobial Packaging*. Packaging Technology and Science, 2012. **25**(6): p. 321-327.
  61. Hussain, M.R., M. Iman, and T.K. Maji, *Determination of degree of deacetylation of chitosan and their effect on the release behavior of essential oil from chitosan and chitosan-gelatin complex microcapsules*. International Journal of Advanced Engineering Applications, 2013. **6**(4): p. 4-12.
  62. Lin, N.J., et al., *Effect of dental monomers and initiators on Streptococcus mutans oral biofilms*. Dental Materials, 2018. **34**(5): p. 776-785.
  63. Koulaouzidou, E.A., et al., *Investigation of the chemical profile and cytotoxicity evaluation of organic components eluted from pit and fissure sealants*. Food

Chem Toxicol, 2018. **120**: p. 536-543.

- 
64. Berry, R.J. and W. Trillwood, *Sodium fluoride and cell growth*. British medical journal, 1963. **2**(5364): p. 1064.
65. OGURO, A., N. KOIZUMI, and K.-i. HORII, *EFFECT OF FLUORIDE ION ON PROLIFERATION OF VERO CELL LINE CELLS*. JOURNAL OF DENTAL HEALTH, 1982. **31**(5): p. 453-460.
66. Li, K.-Y., et al., *Fluorinated Montmorillonite Composite Resin as a Dental Pit and Fissure Sealant*. Polymers, 2019. **11**(10): p. 1535.
67. Hsu, H.M., et al., *A continuous flow system for assessing fluoride release/uptake of fluoride-containing restorative materials*. Dent Mater, 2004. **20**(8): p. 740-9.
68. Carey, C.M., et al., *Fluoride release from a resin-modified glass-ionomer cement in a continuous-flow system. Effect of pH*. J Dent Res, 2003. **82**(10): p. 829-32.
69. Ei, T.Z., et al., *Comparison of resin-based and glass ionomer sealants with regard to fluoride-release and anti-demineralization efficacy on adjacent unsealed enamel*. Dent Mater J, 2018. **37**(1): p. 104-112.



## 附錄-圖

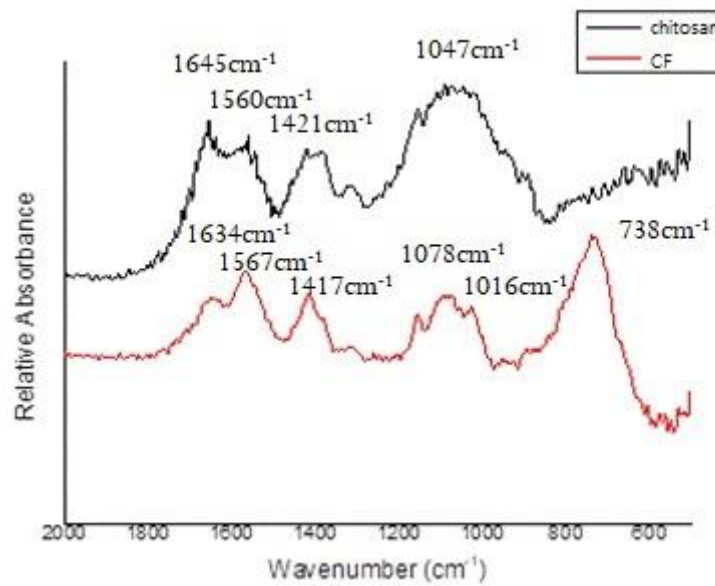


圖 1 幾丁聚醣與奈米氟幾丁聚醣的傅立葉紅外線光譜轉化圖

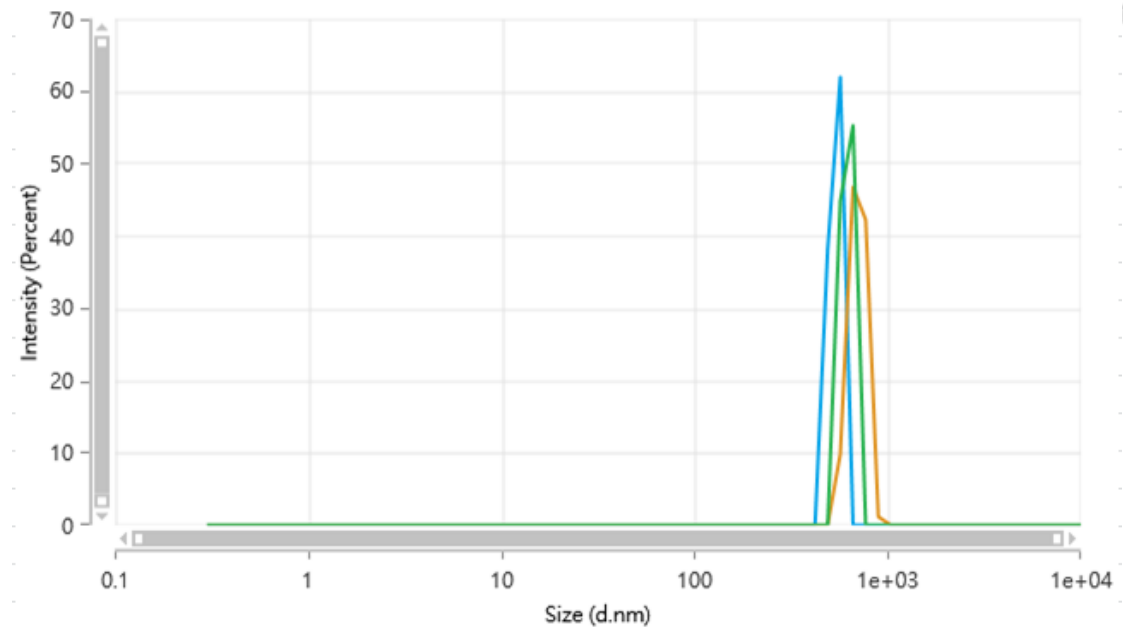


圖 2 奈米氟幾丁聚醣的粒徑分析

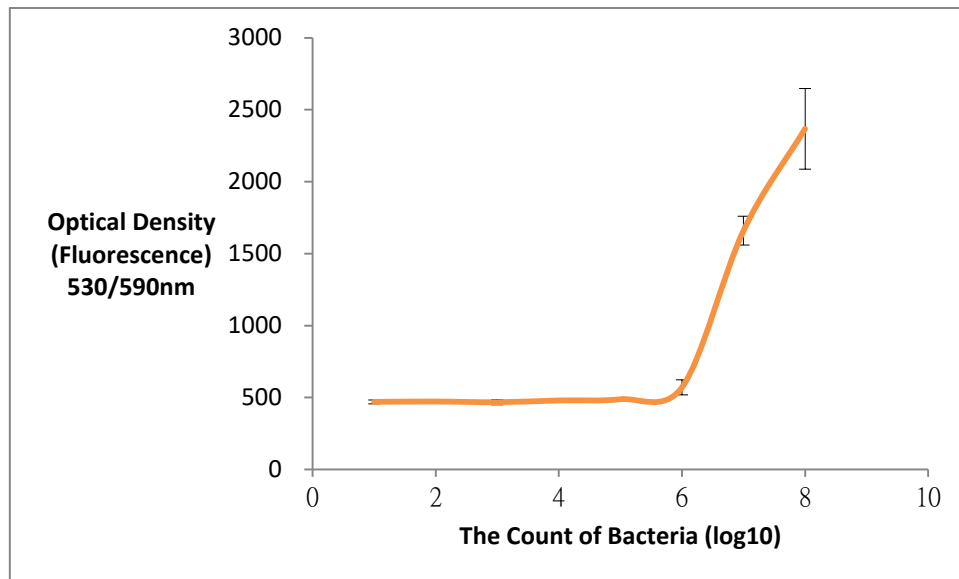
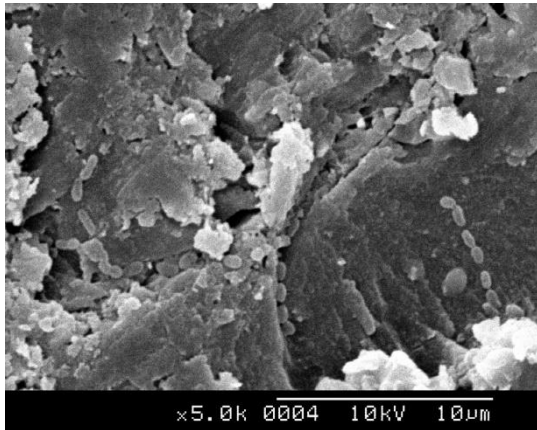
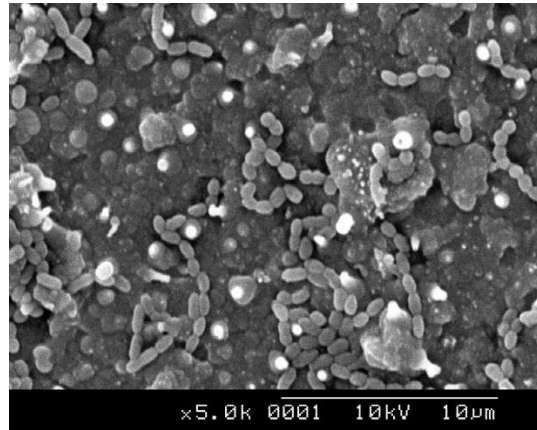


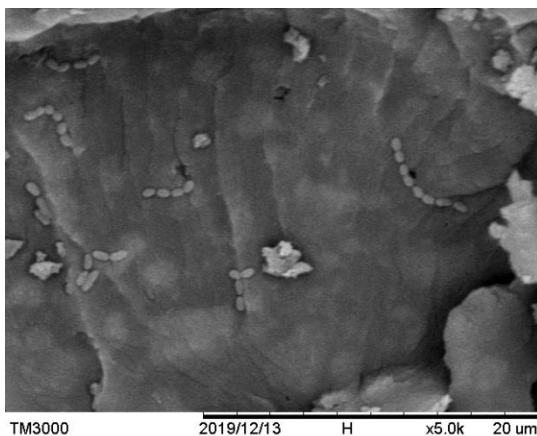
圖 3 不同含量的轉糖鏈球菌菌液與吸光值的折線圖：阿爾瑪藍細胞增殖及毒性檢測試驗(Alamar Blue assay)



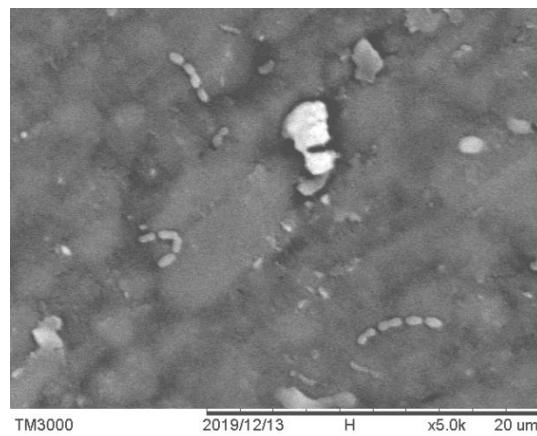
0% 奈米氟幾丁聚醣樹脂



Clinpro™ 溝隙封填劑

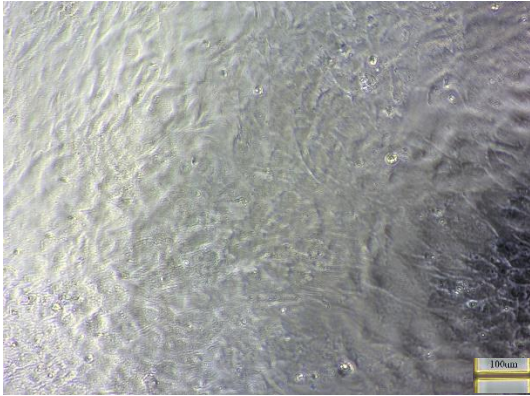


2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂

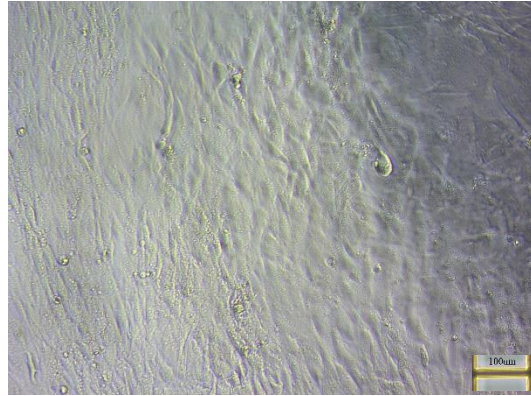


4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂

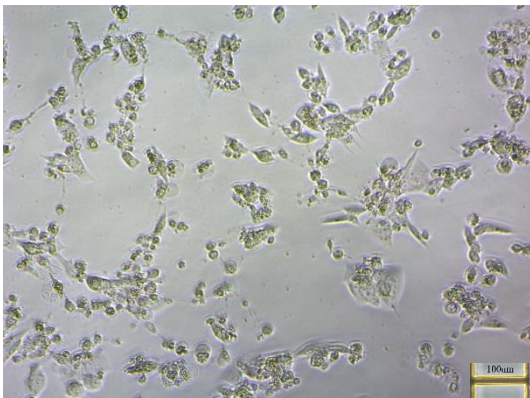
圖 4 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌效果於掃描式電子顯微鏡下的呈現



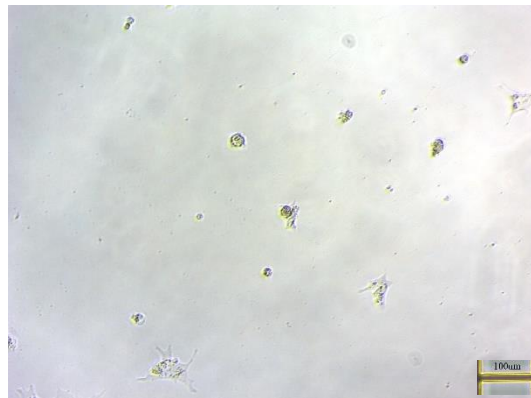
0% 奈米氟幾丁聚醣樹脂



2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂



4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂



Clinpro™ 溝隙封填劑

圖 5 纖維母細胞於不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑萃取液中培養的型態(第一天)

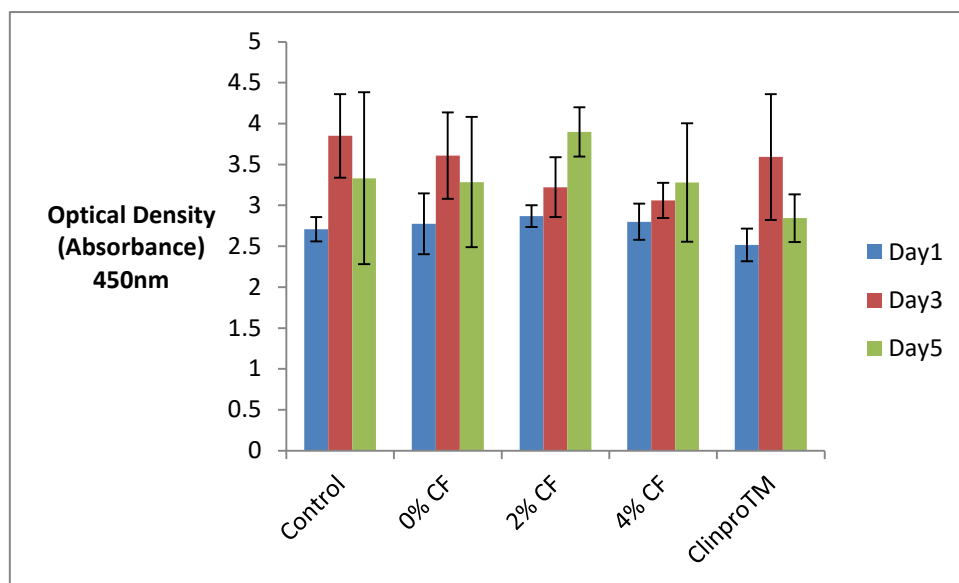
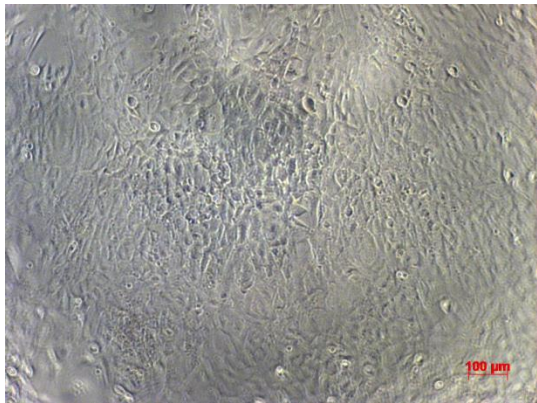


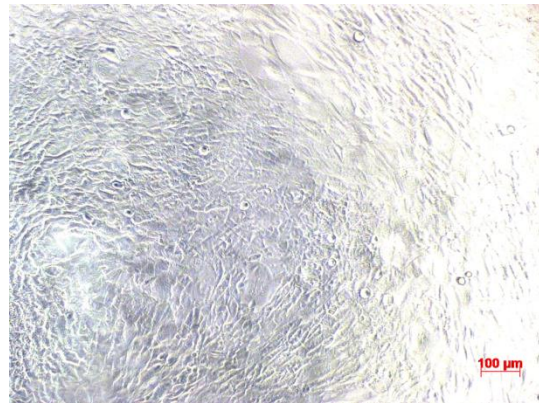
圖 6 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑萃取液稀釋 10 倍後培養細胞一、三、五天的細胞存活率吸光值(Absorbance=450nm)

以 Two-way ANOVA 後，發現不同天數不同組別之間的吸光值沒有統計上顯著的差異。表示萃取液在稀釋 10 倍過後，0%、2%、4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂和 Clinpro™ 溝隙封填劑的細胞存活率良好，與市售商品一致，沒有明顯的細胞毒性。

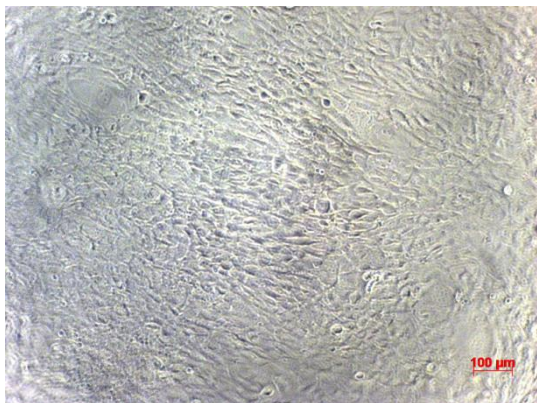




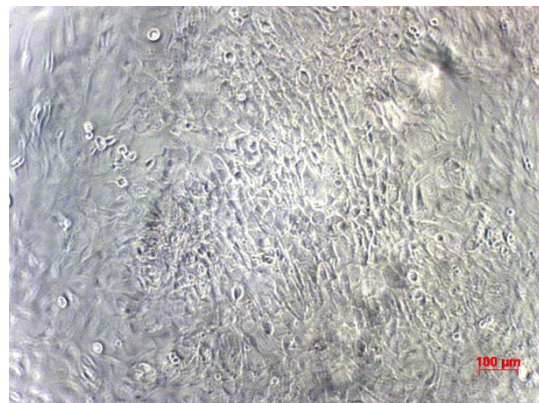
0% 奈米氟幾丁聚醣樹脂



Clinpro™ 溝隙封填劑



2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂



4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂

圖 7 纖維母細胞於 10 倍稀釋之不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑萃取液中培養的型態(第三天)

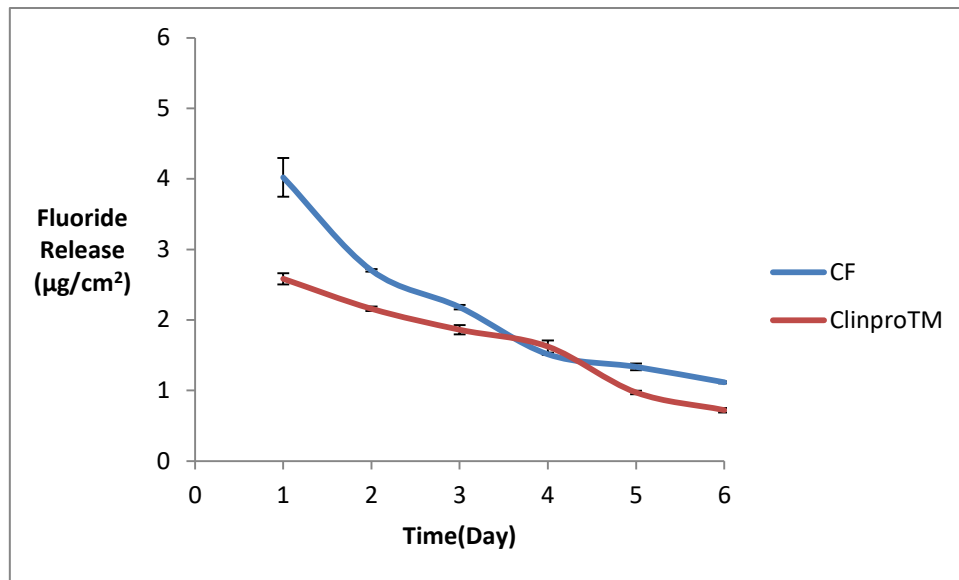


圖 8 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro<sup>TM</sup> 溝隙封填劑在氟釋放方面的比較

以 Two-way ANOVA 比較兩種錠片在 pH 值=7 的去離子水中連續六天的釋氟含量，發現 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片的氟釋放量曲線與 Clinpro<sup>TM</sup> 溝隙封填劑錠片的氟釋放量曲線有明顯的不同，主要是 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片第一天及第二天的氟釋量大於 Clinpro<sup>TM</sup> 溝隙封填劑錠片的氟釋放量。



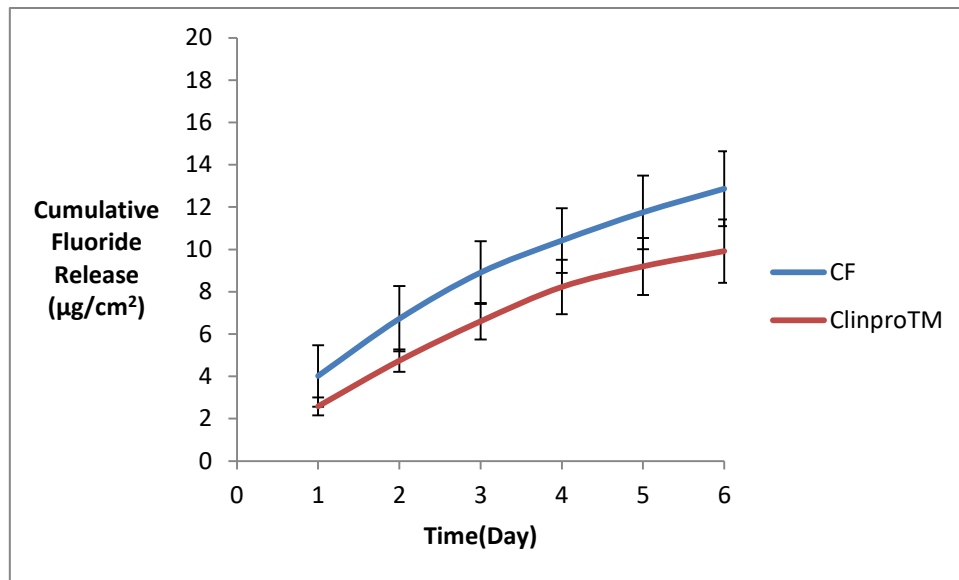


圖 9 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro<sup>TM</sup> 溝隙封填劑在累積氟釋放方面比較

以獨立樣本 t 檢定比較在 pH 值=7 的去離子水中累積六天的氟離子濃度。發現 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro<sup>TM</sup> 溝隙封填劑錠片在總釋氟量上沒有統計上的顯著差異，2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片的總釋氟量為  $12.87 \pm 1.78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；Clinpro<sup>TM</sup> 溝隙封填劑錠片的總釋氟量為  $9.92 \pm 1.50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

## 附錄-表



表 1 奈米氟幾丁聚醣樹脂的構成分析

	Components	(wt./wt. %)	Weight (g)
Control resin	Filler	20.000	0.600
	Bis-GMA, TEGDMA (7:3)	78.400	2.352
	Camphorquinone	0.800	0.024
	EDMAB	0.800	0.024
Experimental resin (2% /4%)	Filler	18.000/16.000	0.540/0.480
	CF	2.000/4.000	0.060/0.120
	Bis-GMA, TEGDMA (7:3)	78.400	2.352
	Camphorquinone	0.800	0.024
	EDMAB	0.800	0.024
Total		100.000	3.000



表 2 轉糖鏈球菌的生長時間與吸光值之間的關係

各個時間點的吸光值以平均值±標準差表示，並比較於 0 小時的吸光值。

Time(hr)	Absorbance(600nm)			Mean±SD
0	0.026	0.023	0.018	0.022±0.004
2	0.028	0.031	0.034	0.031±0.003
4	0.082	0.077	0.082	0.080±0.003*
6	0.178	0.161	0.165	0.168±0.009*
8	0.424	0.405	0.399	0.410±0.013*
10	0.426	0.410	0.375	0.404±0.026*

\*P<0.05



表 3 固態培養基上不同時間點的單顆菌落數(個)

固態培養基上的單顆菌落數為將原液稀釋  $10^6$  倍，再取 100 $\mu$ l 培養 48 小時後所長出來的菌落數。又菌落形成單位為每 1ml 中所含的細菌數，因此須將平均單顆菌落數放大  $10^7$  倍，即可得到菌落形成單位。細菌約於生長後的 8 小時達到對數生長期高峰，此時的細菌數為  $4.9 \times 10^8$  個。

Time(hr)	Colony Forming Units (CFUs)			Mean $\pm$ SD
6	80	44	61	62 $\pm$ 18
8	67	38	41	49 $\pm$ 16
10	95	45	56	65 $\pm$ 26



表 4 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌效果與吸光值的關係

以 One-way ANOVA 和 Tukey's test 發現每一組相對於控制組都有抗菌效果，但組間相比則沒有差異性。

	Control (n=3)		0% CF (n=3)		2% CF (n=3)		4% CF (n=3)		Clinpro™ (n=3)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
OD	752 <sup>A</sup>	35	464 <sup>a</sup>	96	351 <sup>a</sup>	49	433 <sup>a</sup>	55	505 <sup>a</sup>	103
Ratio	100%		62%		47%		58%		67%	

\*右上角的大小寫英文字母若不同，表示有統計上的顯著差異。



表 5 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂的抗菌效果與菌落形成單位的關係

以 One-way ANOVA 和 Tukey's test 檢定後發現 0%、2%、4% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑都與控制組有統計上顯著意義的抗菌效果，但 2% 與 4% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂相較於 0% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑又更抗菌，2% 與 4% 的奈米氟幾丁聚醣的抗菌效果沒有統計上顯著意義的差別。

	Control (n=3)		0% CF (n=3)		2% CF (n=3)		4% CF (n=3)		Clinpro™ (n=3)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
CFU Ratio	1.00 <sup>Ab</sup>	0.00	0.54 <sup>aB</sup>	0.12	0.10 <sup>ab</sup>	0.03	0.25 <sup>ab</sup>	0.01	0.45 <sup>aB</sup>	0.10

\*A、a 為各組與控制組比，右上角的大小寫英文字母若不同，表示有統計上的顯著差異。

\*B、b 為各組與 0%CF 比，右上角的大小寫英文字母若不同，表示有統計上的顯著差異。



表 6 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑萃取原液於培養細胞一天後的吸光值(Absorbance=450nm)

以 One-way ANOVA 與 Tukey's test 發現 4% 奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑的萃取原液在培養纖維母細胞一天以後，細胞數量相對於控制組、0% 奈米氟幾丁聚醣樹脂和 2% 奈米氟幾丁聚醣樹脂組別較少。

	Control (n=5)		0% CF (n=5)		2% CF (n=5)		4% CF (n=5)		Clinpro™ (n=5)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
Absorbance	1.96 <sup>A</sup>	0.21	2.19 <sup>A</sup>	0.20	1.74 <sup>A</sup>	0.31	0.23 <sup>a</sup>	0.29	0.07 <sup>a</sup>	0.15

\*右上角的大小寫英文字母若不同，表示有統計上的顯著差異。



表 7 不同含量的奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑萃取液稀釋 10 倍後的細胞毒性(Absorbance=490nm)

以培養至第三天的細胞作為乳酸脫氫酶的最大釋放組，並用 Two-way ANOVA 分析後，顯示不管是 2% 還是 4% 的奈米氟幾丁聚醣樹脂，在萃取液稀釋 10 倍的條件下，其細胞毒性與 Clinpro™ 溝隙封填劑造成的細胞毒性一致，細胞毒性趨近於無。

	High Control (n=5)		Low Control (n=5)		0% CF (n=5)		2% CF (n=5)		4% CF (n=5)		Clinpro™ (n=5)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
Day1	NA	NA	0.25	0.04	0.29	0.01	0.30	0.01	0.30	0.02	0.31	0.01
Day3	2.78	0.17	0.29	0.03	0.28	0.01	0.28	0.01	0.28	0.02	0.28	0.03
Day5	NA	NA	1.38	0.12	1.36	0.19	1.34	0.21	1.32	0.10	1.13	0.14





表 8 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™溝隙封填劑在機械性質方面的比較

以獨立樣本 t 檢定作統計分析，發現 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂的聚合深度、表面抗壓強度、徑向抗拉/壓強度皆高於 Clinpro™溝隙封填劑。抗彎強度方面沒有差異性，流動性方面則較差。

Materials	Curing Depth(mm) (n=3)		Micro Hardness (kgf/mm <sup>2</sup> ) (n=6)		Diametral Tensile Strength(Mpa) (n=6)		Flexural Strength(Mpa) (n=3)		Flowability(mm) (n=3)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
Clinpro™	3.63	0.32	16.70	1.29	29.14	5.24	68.58	15.24	21.67*	2.52
2%CF	5.93*	0.12	19.77*	1.26	41.56*	5.10	73.18	13.57	8.83	0.82

\*P<0.05



表 9 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑於氟離子再吸收的比較

以獨立樣本 t 檢定比較經再吸收處理後，在 pH 值=7 的去離子水中累積三天的氟離子釋放量，發現 2%奈米氟幾丁聚醣樹脂與 Clinpro™ 溝隙封填劑錠片在總釋氟量上沒有統計上的顯著差異，2%奈米氟幾丁聚醣樹脂錠片的總釋氟量為  $4.59 \pm 1.78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；Clinpro™ 溝隙封填劑錠片的總釋氟量為  $5.16 \pm 1.24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

	Day1 (n=3)		Day2 (n=3)		Day3 (n=3)		Total amount of release (n=3)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
2%CF ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	1.92	0.81	1.67	0.57	1.01	0.41	4.59	1.78
Clinpro™ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	2.61	0.42	1.60	0.63	0.95	0.21	5.16	1.24