

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's Thesis

根管壁磷酸鈣沈積於誘導牙本質再生之應用

Calcium Phosphate Deposition in Canal Wall for
Induction of Dentinogenesis

吳崇璋

Chung-Wei Wu

指導教授：李苑玲 博士

Advisor : Yuan-Ling Lee, Ph.D.

中華民國 113 年 8 月

August 2024

誌謝



在研究所的這段時光，很謝謝一路上給予許多幫助與指導的師長、同學、學長姐與學弟妹以及我的家人，在各方面給了我有形與無形的支持，讓我也能夠順利的完成碩士班的學業。

研究所的日子裡很感謝我的指導教授，李苑玲老師，在臨床門診與研究實驗都是按部就班的給予方向讓我前進，也很感念老師一次又一次的逐字幫我修改文書資料，辛苦且耗時的付出，期許自己也能從中逐漸地建立邏輯性的思考方式以及嚴謹的做事態度；更感謝老師的包容，讓我有如此難得的學習過程，改變了我很多！另外感謝陳振中教授及其團隊、學生，教導並予以協助研究實驗中許多儀器的原理與操作，面臨問題時，也提供了很多建議與改善方式。

實驗室中非常感謝一路上有一起打拼的寬程、怡伶、東岳，能和大家分享臨牙所中的甘苦，也在互相討論中有所成長。許多學長姊在這三年中不論是實驗或是臨床也都給予了我許多寶貴的意見和鼓勵，讓我也能保持正面的心態面對一路來的挑戰。

就讀研究所的這段時間也很感謝家人的支持與包容，讓我也能夠沒有後顧之憂的完成碩士班的學業。一直陪伴在我身旁的郁涵老婆，每天發生的事情不論是好是壞，都和我一起分享與承擔，尤其是最後一年的孕期及小孩出生後，真的很辛苦。這段求學路途中也有辛苦與甜美的一面，都會成為我人生的一段美好回憶。

中文摘要



傳統人工合成的氫氧基磷灰石(hydroxyapatite, HAP)為結晶性良好的磷酸鹽材料，是臨床醫療常見的人工骨粉材料，在做為骨傳導(osteocondution)的應用上具有相當良好的療效。近年研究發現生物體中的 HAP 隨著硬組織的不同而呈現不同的次級結構，在生物礦化過程扮演重要調控角色。因此開發 HAP 前驅物或晶體結構較不穩定之磷酸鈣材料，用於生物硬組織再生研究成為新興的課題。由於感染的根管在進行情創與修形後，會影響根管表面硬組織的形態特徵與組成性質，在後續若要進行牙本質-牙髓再生(dentin-pulp regeneration)處置時可能不利於幹細胞的貼附、生長與分化。因此本研究目的是利用沈積法在根管內表面形成一層均質覆蓋且結晶性不佳的磷酸鈣沈積物，透過可釋放鈣離與磷酸根離子的特性吸引並調控幹細胞的生物礦化行為，並且改變根管表面形態特徵以利於幹細胞貼附生長。本研究首先使用接近飽和濃度的 10% Na_2HPO_4 與不同濃度的 CaCl_2 溶液進行沉澱反應來製備磷酸鈣沈積物，從產物結晶尺寸與反應酸鹼值結果，選擇 0.05 M 與 0.1 M CaCl_2 進行後續實驗。接著在牙本質樣本的根管表面直接進行沈積反應，評估反應時間、 CaCl_2 濃度對於牙本質表面之磷酸鈣沈積物形態、組成成分、晶體結構與覆蓋牙本質表面行為的影響效應。最後再以牙根根管模型進行研究，測試溶液沖洗位置與 CaCl_2 濃度對於根管表面形成磷酸鈣沈積物的覆蓋行為。

掃描式電子顯微鏡(scanning electron microscope, SEM)分析發現，當反應時間大於 15 分鐘時，無論是 0.05 M 與 0.1 M CaCl_2 組均可於牙本質表面形成高覆蓋率的磷酸鈣沈積物，主要呈現表面針刺狀或條狀結晶覆蓋的球狀結構，與 HAP 結構相似，0.1 M 組在反應時間大於 30 分鐘時開始可觀察到少量片狀結晶散布於球狀主結構中。此外隨著反應時間與 CaCl_2 濃度增加，穿透式電子顯微鏡(transmission electron microscope, TEM) 分析發現產物鈣磷比從 1.31 增加到 1.47，同時產物晶體也逐漸呈現方向性排列形態，而選區電子衍射(selected area electron diffraction,

SAED) 的晶體繞射點亦趨明顯，顯示產物結晶性提升，其結構鑑定為缺鈣型氫氧基磷灰石 (calcium-deficient hydroxyapatite, CDHA)。覆蓋率分析方面，當反應時間為15分鐘時，0.05 M組平均覆蓋率為97.82%、平均覆蓋厚度為18.71 μm ，0.1 M組平均覆蓋率為97.57%、平均覆蓋厚度為12.79 μm ，兩組的平均覆蓋率與覆蓋厚度相似，沒有統計顯著差異。於牙根根管模型的研究結果發現，針頭置於根管中段進行沖洗所形成磷酸鈣沉積物覆蓋情況最佳，當反應時間為15分鐘時，0.05 M組的產物均呈現球狀結構，其平均覆蓋率為93.39 %，0.1 M組則除了球狀結構外亦有片狀結構出現，其平均覆蓋率為95.88 %，兩者間沒有統計顯著差異。

總結來說，將針頭置於根管中段沖洗 0.05 M CaCl_2 15 分鐘，可在牙根根管樣本表面形成覆蓋率高、均值度佳、低結晶性的磷酸鈣沈積物，推測將有利於調控齒源性幹細胞的生物礦化行為，進而達到促進牙本質與牙髓組織再生的結果。

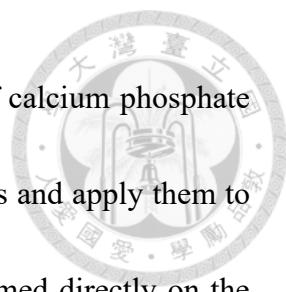
關鍵字：牙本質-牙髓再生、牙根根管、非晶性磷酸鈣、缺鈣型氫氧基磷灰石。

英文摘要



Artificial hydroxyapatite(HAP) is a kind of calcium phosphate with well crystallized and good biocompatibility. It is widely used in bone graft material because good osteoconductive ability results in good treatment outcomes. There are several HAP substructures in different hard tissues, and it plays an essential regulatory role in the biomineratization process. Therefore, developing HAP precursors or calcium phosphate materials with relatively unstable crystal structures for studying biological hard tissue regeneration has become an emerging topic. The morphological characteristics and composition of the hard tissue on the surface of the root canal might be affected by canal debridement and enlargement, and may be unfavorable for subsequent dentin-pulp regeneration for attachment, growth, and differentiation of stem cells. Therefore, the purpose of this study is to use the precipitation method to form a layer of calcium phosphate deposits with homogeneous coverage and poor crystallinity on the inner surface of the root canal. Change the morphological characteristics of root canal surface to facilitate the growth of stem cells.

In this study, we use the precipitation method to form calcium phosphate using a serial application of a 10% Na_2HPO_4 and different concentrations of CaCl_2 and observe the appropriate crystal form and size under the optical microscope as a result of an ionic



reaction. Considering the neutral pH value and small crystal size of calcium phosphate formation, we choose 0.05M and 0.1M CaCl_2 as ideal concentrations and apply them to the following experiment. Then, the deposition reaction was performed directly on the dentin samples. The effect of reaction time and CaCl_2 concentration on the morphology, composition, crystal structure, and behavior of covering the dentin surface of calcium phosphate deposits were evaluated. Finally, the root canal samples were used to study the coverage behavior by different solution irrigation positions and CaCl_2 concentration in forming calcium phosphate deposits on the root canal surface.

Key words: pulp-dentin regeneration, root canal, amorphous calcium phosphate, calcium-deficient hydroxyapatite.

目次



謝詞	1
中文摘要	ii
英文摘要	iv
目次	vi
圖次	ix
表次	xii
縮寫表	xiii
第一章 前言	1
第二章 文獻回顧	3
2.1 現代根管治療之發展與限制	3
2.2 組織工程於牙本質-牙髓再生之目前應用與限制	4
2.3 支架設計	6
2.3.1 清創後的根管表面	6
2.3.2 材料基值剛性與誘導組織再生的關聯	6
2.3.3 磷酸鈣於生物醫學上的應用	7
2.3.4 磷酸鈣於牙本質再生的應用	9
第三章 動機與目的	10
第四章 材料與方法	11
4.1 儀器裝置	11
4.2 藥品材料	11
4.3 利用沈澱法製備磷酸鈣	12
4.4 氯化鈣濃度對磷酸鈣晶體形成的影響效應	12



4.5 牙本質樣本與牙根根管樣本製備	12
4.6 影響磷酸鈣在牙本質表面生成變因分析	13
4.6.1 反應時間與氯化鈣濃度變因	13
4.6.2 掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察	14
4.6.3 穿透式電子顯微鏡-能量光譜 (TEM-EDS) 及選區電子衍射 (SAED) 分析	14
4.6.4 磷酸鈣沈積物覆蓋率半定量分析	錯誤！尚未定義書籤。
4.7 影響磷酸鈣在牙根根管表面生成變因分析	15
4.7.1 沖洗針頭位置變因	15
4.7.2 沖洗針頭位置變因	15
第五章 結果	17
5.1 氯化鈣濃度的影響效應	17
5.2 反應時間對磷酸鈣沈積物覆蓋牙本質表面的影響效應	17
5.2.1 磷酸鈣覆蓋牙本質行為評估	17
5.2.2 磷酸鈣產物顯微結構觀察	18
5.2.3 磷酸鈣產物晶相鑑定	18
5.2.4 磷酸鈣產物鈣磷比分析	19
5.3 氯化鈣濃度對磷酸鈣沈積物覆蓋牙本質表面的影響效應	20
5.3.1 磷酸鈣覆蓋牙本質表面形態觀察 (光學顯微鏡+SEM)	20
5.3.2 磷酸鈣覆蓋率與覆蓋厚度分析	20
5.3.3 磷酸鈣產物晶相鑑定	18
5.3.4 磷酸鈣產物鈣磷比分析	19
5.4 根管內表面生成磷酸鈣沈積物行為分析	21
5.4.1 沖洗位置的影響效應	21
5.4.2 0.05M 氯化鈣於根管內表面生成磷酸鈣沈積物覆蓋行為	21



5.4.3 0.1M 氯化鈣於根管內表面生成磷酸鈣沈積物覆蓋行為.....	22
第六章 討論	23
6.1 實驗模型之探討	23
6.1.1 使用沉澱法於牙本質表面形成磷酸鈣結晶沈澱	20
6.1.2 使用牙根根管樣本	20
6.2 磷酸鈣覆蓋率及覆蓋厚度之探討	24
6.3 晶體組成與結構分析之探討	24
6.4 晶體形態分析之探討	25
第七章 結論	26
參考文獻	27
附錄	32

圖次



圖 1：牙本質與牙根根管樣本製備示意圖。	31
圖 2：牙本質樣本表面沈積磷酸鈣實驗流程圖。	32
圖 3：牙根根管樣本表面沈積磷酸鈣實驗流程圖。	32
圖 4：0.7 M 磷酸氫二鈉與不同濃度氯化鈣混合後之結晶形態。	33
圖 5：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M 氯化鈣在不同反應時間於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。(A) 15 分鐘；(B) 30 分鐘；(C) 60 分鐘。	34
圖 6：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.1 M 氯化鈣在不同反應時間於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。(A) 15 分鐘；(B) 30 分鐘；(C) 60 分鐘。	35
圖 7：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M 氯化鈣在不同反應時間於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之球狀結構形態。(A) 15 分鐘；(B) 30 分鐘；(C) 60 分鐘。 ..	36
圖 8：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.1 M 氯化鈣在不同反應時間於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之球狀結構形態。(A) 15 分鐘；(B) 30 分鐘；(C) 60 分鐘。 ..	37
圖 9：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.1 M 氯化鈣在不同反應時間於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之片狀結構形態。(A) 30 分鐘；(B) 60 分鐘。	38
圖 10：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M 氯化鈣反應 15 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之 TEM-EDS 分析，方框為 EDS 照射位置。(A) 結晶形態；(B) EDS 分析圖。	39
圖 11：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M 氯化鈣反應 60 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之 TEM-EDS 分析，方框為 EDS 照射位置。(A)、(C) 結晶形態；(B)、(D) EDS 分析圖。	39
圖 12：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.1 M 氯化鈣反應 15 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之 TEM-EDS 分析，方框為 EDS 照射位置。(A) 結晶形態；(B) EDS 分析圖。	40

圖 13：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.1 M 氯化鈣反應 60 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之 TEM-EDS 分析，方框為 EDS 照射位置。(A)、(C) 結晶形態；(B)、(D) EDS 分析圖。	40
圖 14：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M 氯化鈣反應 15 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積之 TEM 結構形態分析。(A) 晶體結構形態；(B) SAED 圖。	41
圖 15：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M 氯化鈣反應 60 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積之 TEM 結構形態分析。(A) 晶體結構形態；(B) SAED 圖。	41
圖 16：0.7M 磷酸氫二鈉與 0.1 M 氯化鈣反應 15 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積之 TEM 結構形態分析。(A) 晶體結構形態；(B) SAED 圖。	42
圖 17：0.7M 磷酸氫二鈉與 0.1 M 氯化鈣反應 60 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積之 TEM 結構形態分析。(A) 晶體結構形態；(B) SAED 圖。	42
圖 18：與反應前（左圖）相比較，牙本質樣本經 0.7 M 磷酸氫二鈉浸泡並與 0.05 M 氯化鈣反應 15 分鐘後（右圖），可觀察到明顯有白色結晶沈積於牙本質表面。	43
圖 19：與反應前（左圖）相比較，牙本質樣本經 0.7 M 磷酸氫二鈉浸泡並與 0.1 M 氯化鈣反應 15 分鐘後（右圖），可觀察到明顯有白色結晶沈積於牙本質表面。	43
圖 20：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M (A) 和 0.1 M (B) 之氯化鈣反應 15 分鐘，於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之覆蓋情形。	44
圖 21：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M (A) 和 0.1 M (B) 之氯化鈣反應 15 分鐘，於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之厚度。	45
圖 22：不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙本質表面磷酸鈣沈積物覆蓋率分析（平均值+標準差）。	46
圖 23：不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙本質表面磷酸鈣沈積物覆蓋厚度分析（平均值+標準差）。	46

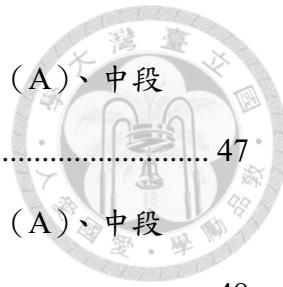


圖 24：在根管根尖處沖洗 0.05 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根上段 (A)、中段 (B)、下段 (C) 根管表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。 47
圖 25：在根管中段處沖洗 0.05 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根上段 (A)、中段 (B)、下段 (C) 根管表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。 48
圖 26：在根管冠部處沖洗 0.05 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根上段 (A)、中段 (B)、下段 (C) 根管表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。 49
圖 27：牙根根管樣本經 0.7 M 磷酸氫二鈉處理並於根管中段處沖洗 0.05 M 氯化鈣 15 分鐘，可見有明顯結晶沈積於牙本質表面。(A) 縱切面觀；(B)、(C) 剖斷面觀。 40
圖 28：牙根根管樣本經 0.7 M 磷酸氫二鈉處理並於根管中段處沖洗 0.1 M 氯化鈣 15 分鐘，可見有明顯結晶沈積於牙本質表面。(A) 縱切面觀；(B)、(C) 剖斷面觀。 50
圖 29：在根管中段處沖洗 0.05 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根上段 (A)、中段 (B)、下段 (C) 根管表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。 51
圖 30：在根管中段處沖洗 0.1 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根上段 (A、D)、中段 (B、E)、下段 (C、F) 根管表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。大部分區域之磷酸鈣沈積物呈現球狀結構形態 (左側圖)，少部分區域可在球狀結構中觀察到少量片狀晶體形成 (右側圖)。 52
圖 31：在根管中段處沖洗 0.05 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根根管表面形成磷酸鈣沈積物之球狀結構形態。 53
圖 32：在根管中段處沖洗 0.1 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根根管表面形成磷酸鈣沈積物之球狀 (A)、片狀 (B) 結構形態。 54
圖 33：不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙根根管表面上段、中段、下段磷酸鈣沈積物覆蓋率分析 (平均值+標準差)。 55

表次



表 1 0.7 M 磷酸氫二鈉與不同濃度氯化鈣混合後之 pH 值	56
表 2 不同氯化鈣濃度及反應時間於牙本質表面形成磷酸鈣沉積物之組成與晶體結構分析	56
表 3 國際繞射資料中心 (ICDD) 之氫氧基磷灰石 (hydroxyapatite) 粉末繞射主峰資料 (PDF : 84-1998)	57
表 4 不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙本質表面磷酸鈣沉積物覆蓋率統計分析表	58
表 5 不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙本質表面磷酸鈣沉積物覆蓋厚度統計分析表	58
表 6 不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙根根管表面磷酸鈣沉積物覆蓋率統計分析表	59
表 7 不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙根根管表面上段、中段、下段磷酸鈣沉積物覆蓋率統計分析表	59

縮寫表



縮寫	全名
ACP	Amorphous calcium phosphate
CDHA	Calcium-deficient hydroxyapatite
E	elastic modulus
EDS	Energy dispersive X-Ray Micro Analyzer
HA	hyaluronic acid
HAP	Hydroxyapatite
SAED	Selected area electron diffraction
SCAP	stem cell from apical papilla
SEM	Scanning electron microscope
hDPSCs	human dental pulp stem cells
MTA	mineral trioxide aggregate
OCP	octacalcium phosphate
TE	tissue engineering
TEM	transmission electron microscope

第一章 前言



在臨牀上牙髓因為各種原因受到嚴重感染時，對於根尖發育完成的恆牙，我們會進行傳統的根管治療，但若是發生在牙根未發育完全的恆牙時，在完成根管清創後進行根尖成形術 (apexification)，這些治療方式都可以解決感染的問題，而且有不錯的治療成功率。但是，這類牙齒因為治療後，長期來說因為牙根無法繼續發育，導致牙冠牙根比例較差、牙根根管壁較薄，後續發生牙根斷裂的風險較高 (Cvek, 1992)；另外，也因為喪失牙髓的關係，失去對外界感知的能力，可能再次蛀牙但沒有及時介入治療等因素而最終需要被拔除。所以不論是牙根發育完成與否的牙齒，假設我們可以維持牙髓組織活性，都可以獲得較佳的治療效果。對於牙髓壞死的狀況，如果進一步可以進行牙髓組織再生的話，讓牙齒可以繼續生長、有足夠的強度，相信可以提高這些牙齒存留於口腔中的時間、改善患者的生活品質。

因此牙本質牙髓組織再生 (dentin-pulp tissue regeneration) 是目前研究的重點，而當前的趨勢是使用組織工程 (tissue engineering, TE) 達到再生的目的。組織工程包含三大要素：幹細胞 (stem cells)、支架 (scaffold)、和生長因子 (growth factors)。牙本質牙髓複合體 (dentin-pulp complex) 的構造，是由兩個異質結構組成，外層是牙本質、內層是牙髓組織。當在進行牙本質牙髓組織再生時，會希望細胞分化可以長在原本牙本質、牙髓的位置。過去文獻發現目前絕大部分的再生結果在根管中都只有長類牙髓組織、並沒有硬組織生成；或是雖然同時誘導了軟硬組織的生成，但是這些組織是混合生長，並沒有在外圍長牙本質、內層長牙髓的情況，這也是目前現今牙科組織再生研究領域中的瓶頸 (Qu et al., 2015) (Yang, Tan, Cen, & Zhang, 2016)。

近年來一個新興的論點，利用支架不同的剛性特質 (stiffness)，來促使幹細胞走向不同的分化程序，可能是一個比較好的策略。Engler 等學者在 2006 年提出，當人類間質幹細胞 (mesenchymal stem cells) 生長在不同剛性的支架表面時，會有



不同的分化結果。在低剛性 ($E = 0.1 \sim 1 \text{ kPa}$) 的支架上面生長時，會分化成生長成軟組織的細胞，例如：神經細胞 (neuron cells)；而隨著剛性增加 ($E > 10 \text{ kPa}$)，較易分化成生長硬組織的細胞，例如：骨母細胞 (osteoblast) 的生成 (Engler, Sen, Sweeney, & Discher, 2006)。後續也有研究證實，利用材料的剛性調控人類牙髓幹細胞 (human dental pulp stem cells, hDPSCs)，分化成不同種類的細胞，而長出不同結構的組織 (Qu et al., 2015)。

哺乳類動物的硬組織中，主要的無機物成分是磷酸鹽類，而氫氧基磷灰石 (hydroxyapatite, HAP) 是最主要的結構，且不同組織中的氫氧基磷灰石有不同的次級結構；而非晶性磷酸鈣 (amorphous calcium phosphate, ACP) 被認為是氫氧基磷灰石的前驅物，兩者皆以奈米大小存在體內。過去文獻指出，人工合成的氫氧基磷灰石具有良好的生物相容性，而非晶性磷酸鈣則表現有較好的溶解度、生物降解性及生物活性，所以皆被廣泛應用在生醫材料的用途上，近期也常被應用於支架材料 (S. V. Dorozhkin, 2010)。

本研究目的是利用沈積法在根管內表面形成一層均質覆蓋且結晶性不佳的磷酸鈣沈積物，透過可釋放鈣離子與磷酸根離子的特性吸引並調控幹細胞的生物礦化行為，並且改變根管表面形態特徵以利於幹細胞貼附生長。

第二章 文獻回顧



2.1 現代根管治療之發展與限制

在牙根發育完全的恆牙牙髓因齲齒、特殊解剖構造、或是外傷導致牙髓嚴重感染時，通常以傳統根管治療為主要術式。傳統根管治療目前臨床治療成功率可高達70%~90%，但牙齒會喪失感知外界刺激的功能，導致無法早期發現再度蛀牙或是牙周破壞。另外接受根管治療的牙齒，通常有因蛀牙或是其他病灶導致的大範圍的齒質破壞，加上髓腔開擴後齒質的移除，整體結構強度降低，即便後續使用填補或是補綴物恢復外觀和功能，仍存在牙冠或是牙根斷裂的風險，最終拔除。

當牙髓感染發生於牙根尚未發育完全的恆牙時，倘若牙髓傷害範圍較侷限，則可使用活髓治療作為術式，去保留健康的活髓組織，促進持續性的牙根生長，達到齒質重建的結果，另外也維持牙齒活性達到預防保護的功能，其成功率可達9成以上 (Aguilar & Linsuwanont, 2011)。若牙髓已全部壞死，一般會使用根尖成型術治療，以氫氧化鈣誘導根尖鈣化屏障 (apical barrier) 的形成，或直接使用三氧化礦化物 (mineral trioxide aggregate, MTA) 作為根尖栓塞 (apical plug)，雖然在臨床上有八成以上的成功率，但缺點在於牙根不會繼續成長，未發育完全的牙根因為較短且根管壁較薄，導致齒質結構較脆弱且牙冠牙根長度比 (crown-root ratio) 不佳，日後仍有很高的機會發生牙齒斷裂需要拔除。

當牙髓受損時，無論牙根是否發育完全，目前的治療術式雖然都有臨床和影像學的良好預後，但皆無法促進受損區域的齒質重建以及牙髓組織再生。因此針對這些牙齒，除了盡量保留健康的活髓組織以外，若能以一個策略達到牙本質-牙髓組織的再生，讓牙根可以持續生長、提升整體強度，並且能恢復牙齒活性，維持對外界的感知能力並穩定組織結構，相信可以突破目前根管治療的限制。目前學者多以組織工程 (tissue engineering) 的觀念以及技術，來進行牙本質-牙髓組織再生的研究。



2.2 組織工程於牙本質-牙髓再生之目前應用與限制

牙本質-牙髓組織再生的概念最早可追溯到 1970 年代, Nygaard-Ostby 學者等人在完成牙齒的根管清創後, 使用器械穿出根尖孔誘導根管內生成血塊, 期望藉由此種方式來修復受損的牙髓組織, 不過此研究在後續組織學觀察卻發現僅有局部的纖維結締組織及牙骨質生成, 並非真正的牙髓組織再生(Nygaard-Ostby and Hjortdal, 1971), 而後續牙髓組織再生相關研究也並未有更進一步的突破。直到 2000 年, Gronthos 學者等人自人類牙髓幹細胞 (human dental pulp stem cells, hDPSC) 被成功分離出來(Gronthos et al., 2000), 組織工程技術在牙本質-牙髓組織再生的領域才開始有更進一步發展。組織工程技術依; 其中依幹細胞參與的有無分成兩種方式, 分別是無細胞 (non-cell based) 以及幹細胞 (cell-based) 牙本質牙髓組織再生 (Huang, 2011)。

無細胞牙髓-牙本質組織再生策略, 因為沒有幹細胞參與關係, 較無醫學倫理與免疫問題, 在實驗設計上也較單純。而回顧目前在臨牀上針對牙髓壞死但未發育完全之恆牙所使用的血管再生術式 (revascularization) 或再生性牙髓治療步驟 (regenerative endodontic procedures, REPs) 即是無細胞牙本質-牙髓組織再生概念的應用。經由誘導根尖組織出血的方式在根管內產生血塊, 血塊中因為含有趨化因子, 可以吸引在根尖處周圍的幹細胞進入到根管空間內, 作為幹細胞來源, 而同時根管內所形成的血塊也可作為後續提供細胞生長貼附的支架。然而根據研究, 雖然血管再生術式有助於改善臨床症狀、促進根尖病灶癒合, 臨床成功率僅有 76% 左右(Silujjai and Linsuwanont, 2017), 且經由臨床組織學檢查也顯示新生成之硬組織為類牙骨質 (cementum-like) 或類骨質 (bone-like) 組織, 根管內所生成的軟組織也並非正常牙髓組織, 證實沒有辦法真正的達成牙本質-牙髓組織再生(Patricia et al., 2014), 可見無細胞牙本質-牙髓組織再生策略有其限制, 所以目前的主流為幹細胞牙本質-牙髓組織再生策略。

幹細胞牙髓組織工程再生的研究中，2009年日本Iohara學者的研究團隊在狗的牙齒上進行冠髓切除術(pulpotomy)，置放自犬齒取出的幹細胞和膠原蛋白，後續犧牲做組織學觀察。實驗結果可以看到，實驗組在冠髓切除的區域有明顯的牙本質牙髓組織再生，同時具備良好的血液供應。高倍率下觀察，可以看到有牙本質小管(dentin tubule)的結構，同時牙本質母細胞(odontoblast cell)也有細胞核極化(nuclear polarization)的現象，相較之下控制組則沒有任何組織再生(Iohara et al., 2009)。

另外2010年黃教授的研究團隊，使用活體de novo實驗模型，以人類牙根片段(root fragment)兩邊開口擴大至1-2.5公釐，一端封以MTA，另一端至入混合hDPSC及作為支架的聚乳酸乙醇酸共聚物(poly-D,L-lactide and glycolide, PLG)，植入小鼠背部皮下，做組織學觀察。組織切片顯示，置入的區域有類牙本質組織(dentin-like tissue)和類牙本質母細胞生成，顯示此種組織工程再生方式有潛力可應用於牙本質-牙髓組織再生的研究上。但血管生成來源是來自小鼠，而非人類幹細胞分化生成，因此如何誘導再生組織中的血管新生仍待克服，且牙根片段兩端開擴須超過1公釐，過於破壞齒質結構不利於承受外在力量，亦仍需進一步研究(G.T.-J. Huang et al., 2010)。

然而，牙本質屬於礦化硬組織，牙髓屬於軟組織，顯示hDPSC在分化時是受到兩種不同環境所影響，而目前研究所使用的支架均無模擬軟硬組織的環境，導致目前利用組織工程絕大部分的結果顯示，在牙根根管中都只有生成牙髓組織、並沒有硬組織生成；或是雖然同時誘導了軟硬組織的生成，但是這些組織是混合生長，並沒有系統性排列，使外圍生成牙本質、內層生成牙髓組織的情況。如何去調控細胞生長、誘導分化並系統性排列成原本組織生成位置是目前牙本質牙髓組織再生最大的瓶頸(Qu et al, 2015)。



2.3 支架設計

2.3.1 清創後的根管表面

臨牀上當牙齒因為齲齒或外傷等因素，導致牙髓發炎並造成進一步的感染時，一般會進行根管治療，將所有受感染的組織清除乾淨並使用根管挫或鎳鈦旋轉器械進行根管修形與擴大；而在進行根管清創的時候，容易造成根管表面的不平整，也容易使牙本質小管外露讓原本殘留於牙本質小管內的細菌出現，不利於幹細胞貼附生長。

2.3.2 材料基值剛性與誘導組織再生的關聯

根據 2006 年 Engler 等學者的研究，透過彈性模數 (elastic modulus, E) 可評估材料之剛性 (stiffness) 性質，幹細胞在不同剛性材料上生長時，會有不同分化結果。材料剛性低 ($E=0.1 \sim 1 \text{ kPa}$) 時，幹細胞易分化為軟組織，如神經細胞 (neuron cells)，材料剛性增加 ($E > 10 \text{ kPa}$)，幹細胞易分化為生長硬組織的細胞，如骨母細胞 (osteoblasts) (Engler et al., 2006)。2015 年 Qu 學者等人設計兩種不同剛性材料，E 值分別為 0.89 kPa 與 18.23 kPa ，搭配 DPSC 進行牙髓-牙本質組織再生研究，結果顯示，高剛性材料 (18.23 kPa) 相較低剛性材料 ($E=0.89 \text{ kPa}$)，更能誘導硬組織生成 (Qu et al., 2015)。

就牙髓再生而言，支架材料除需具備生物相容性與足夠物理強度以維持材料結構外，還須能均勻分布於根管空間並與根管壁貼合，以提升幹細胞增生分化的速率，達到組織再生的目標 (Galler, D'souza, Hartgerink, & Schmalz, 2011)。由於根管空間狹窄，使用固體支架在置放上有其限制，因此可注射性成為支架設計的重點之一。而從血管新生以及營養供應的觀點，多孔性支架除可提供營養交換空間，亦可攜帶生長因子和幹細胞，促進細胞攀爬生長，是現今支架材料發展的主流 (Bakhtiar et al., 2018)。目前常用的支架種類可分為人工聚合物及天然聚合物兩大類。其中人

工聚合物可分為多聚體(polymer)、生物陶瓷類 (bio-ceramic)和奈米纖維(nanofiber)，此類材料具備良好的生物相容性及適中的降解速率，但通常不具備可注射性，無法均勻分布在根管空間中。而天然聚合物通常生物相容性佳，價格低廉，如膠原蛋白(collagen)、纖維蛋白(fibrin)、絲蛋白(silk protein)、玻尿酸 (hyaluronic acid, HA)等(Moussa & Aparicio, 2019)。其中膠原蛋白在組織再生應用歷史悠久，但其原料多來自豬或牛等物種而有免疫的疑慮及宗教上的限制，或是動物本身疾病(例如狂牛症)因素而有感染的風險，其產品安全性需要嚴格把關。此外天然 聚合物通常降解速率較快，支架結構強度不佳常影響再生組織生長。而具備可注射性和結構穩定性的膠體材料是當前支架的主流，其中交聯型 HA(cross-linked HA)因可藉由交聯程度達到強化結構穩並控制降解時間的效果，近年來受到重視。此外，Qu 學者等人提出外層與內部具有不同表面剛性的雙相型三維奈米立體支架材料，發現貼附於外層高剛性結構生長的幹細胞可分化生成鈣化組織，而內部低剛性的網狀結構可促使細胞生成結締組織，並利用材料內外層有不同降解速率，促進細胞攀爬增生。但此類支架製作需搭配三維列印技術，並且內外層混合比例對細胞分化行為的影響尚未定論，故目前未普遍使用 (Qu et al, 2015)。

2.3.3 磷酸鈣沉積於生物醫學上的應用

磷酸鈣在自然界中是哺乳類動物牙齒和骨頭中最主要的無機物，其中氫氧基磷灰石 (hydroxyapatite, HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) 是最主要的結構，鈣磷比為 1.67，在人體中，氫氧基磷灰石占骨頭的 70%，占牙釉質中的 97%，在牙本質中則有 60% 的含量(Veis, 2005)。不同組織中的氫氧基磷灰石含量各有不同之外，其磷酸鈣的晶體大小形態等次級結構也不盡相同。早期的研究相繼證實牙本質內的氫氧基磷灰石呈現盤狀的形態，大小約為 250 nm (Johansen & Parks, 1962; Watson & Avery, 1954)；骨頭內的 HAP 呈梭狀，大小約為 2~3 μm ；牙釉質內的 HAP 則呈長柱狀，大小約為 200nm(Veis, 2005; Weiner & Price, 1986)。而這些不同次級結構的 HAP 在生物體

內的功能還有和細胞交互作用的機制仍然不是很清楚。

在牙科治療中，牙周病以及牙髓方面的問題常會伴隨著硬組織的破壞，過往的治療方式是利用贋復物來進行缺損的修補，而近年來隨著組織工程的進步，開始在手術中使用具有生物活性的材料。生物活性在材料上的定義為材料會與生物組織在界面上誘發生物化學反應而形成化學鍵結，是衡量生物材料的一個重要指標。而在具有生物活性的材料種類中，目前最常被研究的材料為氫氧基磷灰石，其具有好的生物相容性 (biocompatibility)，沒有毒性，也因此目前已被廣泛的運用在硬組織的修復和替換材料中，例如：作為牙科鈦金屬植體外的塗層，研究發現將包附有氫氧基磷灰石與沒有包附物的牙科植體放入狗的股骨中四個星期，結果發現有氫氧基磷灰石包附的植體的組別有顯著的骨頭高度以及植體和骨頭間有較好的結合強度(Y.-L. Chang, Lew, Park, & Keller, 1999)；作為可分解的生物支架與各式各樣的整形外科植體表面塗層(Suchanek & Yoshimura, 1998)；或是用於骨缺損以及創傷後的牙齒骨頭的重建手術(Sergey V. Dorozhkin & Epple, 2002; Matsumine et al., 2006)等用途。然而檢視到目前為止的研究，儘管硬組織與生物材料皆是由氫氧基磷灰石所組成，但生物材料的氫氧基磷灰石往往只能作為支架而無法被生物體所吸收使用。在追溯生物體內的礦化過程中，發現儘管在硬組織礦化初期就有 HAP 的存在於牙本質中，但是在組織中有大量的其他類型的磷酸鈣出現，這些磷酸鈣被認為是 HAP 的前驅物，包括非晶性磷酸鈣 (amorphous calcium phosphate, ACP) 及磷酸八鈣 (octacalcium phosphate, OCP) (Posner & Tannenbaum, 1984)。也因此在生物鈣化的假說中，主要有兩個不同的骨鈣化假說模型：骨礦化前驅物假說 (bone mineral precursor theory) 與非晶性磷酸鈣假說 (amorphous calcium phosphate theory)。

骨礦化前驅物假說認為 OCP 是鈣化過程中的起始物質(Brown, 1962)，因為 OCP 和 HAP 有非常相似的結構，因此認為在生物鈣化的水解過程中會逐漸轉變成 HAP。相關的研究也發現利用高解析電子顯微鏡在新生貓以及六個月大人類幼兒牙釉質生成 (amelogenesis) 中可以發現 OCP-like 的存在(Weiss, Voegel, & Frank,

1981)。然而，Glimcher 等人利用 ^{31}P 核磁共振研究 (nuclear magnetic resonance, NMR)、X 光繞射分析 (X-ray diffraction, XRD) 與傅立葉轉換紅外線吸收光譜分析 (FTIR) 發現骨組織中的無機物主要是由結晶性差的磷灰石所構成，且在早期的生物鈣化組織中並沒有觀察到 OCP 的晶體結構(Glimcher, 1984; Wu, Glimcher, Rey, & Ackerman, 1994)。因為缺乏證實 OCP 晶體存在於生物性磷灰石結構的直接證據，因此骨礦化前驅物假說在生物鈣化行為的應用仍無法得到普遍的認同。

非晶性磷酸鈣假說是藉由 X 光繞射分析宜觀察硬組織成熟過程中的磷酸鈣繞射峰轉變而提出的假說(Quinaux & Richelle, 1967)，其假設鈣化過程是由最初的固相非晶性磷酸鈣沉積在細胞外基質後，逐漸轉變成結晶性較低的氫氧基磷灰石，另外在液態製程反應中，非晶性磷酸鈣被視為結晶性氫氧基磷灰石的前驅物(Boskey & Posner, 1976)。另外，Glimcher 也利用 X 射線徑向分佈函數分析 (x-ray radial distribution function analysis) 與 ^{31}P NMR 發現在礦化過程中無法觀察到固態的 ACP。因此到目前為止的文獻與結果都無法妥善的解釋生物鈣化的調控機制，在環境中的鈣、磷離子如何在生物鈣化過程中沉積於細胞外基質中，並且如何轉換成生物性磷酸鈣的結構機制，目前都仍然不是很清楚(Grynpas & Omelon, 2007)。也因此這兩個學說到目前為止仍有爭議。

2.3.4 磷酸鈣沉積於牙本質再生的運用

考量到牙齒的主要無機礦物為磷酸鈣，具有極佳的生物相容性，且為長久以來作為牙本質堵塞法治療牙本質過敏症 (dentin hypersensitivity) 的成分，能有效於牙本質上沉積(IMAI & AKIMOTO, 1990) (Ishikawa et al., 1994) (Suge et al., 1995) (Cherng, Chow, & Takagi, 2004)，並且具有較強之剛性 ($E=100\text{-}900\text{ MPa}$) (Al-Sanabani, Madfa, & Al-Sanabani, 2013)。若在牙根根管管壁上形成一均質性高、平整的磷酸鈣沉積，除了利於幹細胞貼附生長，也能將牙本質小管蓋住，讓病原體密封於牙本質小管內，增加組織再生的成功率，並誘導硬組織生成。

第三章 動機與目的



依照目前組織工程的研究，單純誘導牙髓組織再生已經有不錯的效果，但是要同時在特定位置誘導功能性牙本質牙髓組織再生，仍無法達到。利用組織基質的不同剛性對於幹細胞分化行為有不同的調控效果，剛性高的材料可以誘導產生硬組織，剛性低的材料會以生成軟組織為主。利用此原理，若在根管表面給予一高剛性材料，應該可以達到在特定位置誘導牙本質牙髓再生的目的。本研究希望在根管表面形成一高剛性的磷酸鈣沉積，藉此誘導幹細胞形成牙本質鈣化組織。利用 CaCl_2 和 Na_2HPO_4 沉澱反應方式，在牙本質表面形成磷酸鈣沉積，同時探討不同反應時間和不同 CaCl_2 濃度對於在牙本質表面生成磷酸鈣的覆蓋行為與特質的分析。希望可以研發出一種在根管表面有效形成均質性覆蓋磷酸鈣的方法，進而去調控幹細胞的分化，達到功能性牙本質牙髓再生的目的。

第四章 材料與方法



4.1 儀器裝置

1. FDU 1200 freeze dryer (EMELA, Tokyo, Japen)
2. Hybridization oven DHO-101 (Firstek, Taipei, Taiwan)
3. Image J software (National Institutes of Health, USA)
4. MM-60R pH meter (TOA DKK, Tokyo, Japen)
5. Olympus CX43 biological microscope (Olympus, Tokyo, Japen)
6. pH test paper, whole range, pH 0~14 (ADVANTEC®, Tokyo, Japen)
7. SEM :
 - S-2400 (Hitachi, Tokyo, Japen)
 - S-4800 FE-SEM (Hitachi, Tokyo, Japen)
 - JSM-7600F Schottky FE-SEM (JEOL, Tokyo, Japen)
8. SPSS statistics software (IBM, USA)
9. TEM-EDS :
 - JEM-2100F Cs STEM (JEOL, Tokyo, Japen)
 - AZtec Ultim Max (Oxford Instrument, Abingdon, England)
10. ZEISS EXTARO 300 dental microscope (ZEISS, Germany)
11. ZEN blue imaging software (ZEISS, Germany)

4.2 藥品材料

1. Calcium chloride, anhydrous (J.T.Baker)
2. Sodium phosphate, dibasic (ACROS organics)
3. EDTA (J.T.Baker)

4. NaOCl



4.3 利用沈澱法製備磷酸鈣

考量到安全性及方便性，以 Na_2HPO_4 作為磷酸根離子來源，並以 CaCl_2 作為鈣離子來源，使用沉澱法 (precipitation method) 形成磷酸鈣沈積。希望可以藉由兩種溶液混合找出形成大量磷酸鈣沈積的反應條件，有利後續在牙本質表面形成均質且大範圍的磷酸鈣覆蓋，故選擇接近飽和濃度之 Na_2HPO_4 為反應濃度，不同 CaCl_2 濃度為變因。

本研究策略如圖 1，因在溶液條件下最容易有反應物沉積，第一部分先以溶液條件下混合形成磷酸鈣產物，藉由觀察晶體形態與大小，找出合適的 CaCl_2 反應濃度。第二、三部分再於牙本質表面形成磷酸鈣沈積，並探討不同反應時間、不同 CaCl_2 濃度與不同針頭位置對於在牙本質表面生成磷酸鈣的覆蓋行為與特質的分析。

4.4 氯化鈣濃度對磷酸鈣晶體形成的影響效應

取 $50 \mu\text{l}$ Na_2HPO_4 滴於載玻片上，再取 $50 \mu\text{l}$ CaCl_2 滴入， Na_2HPO_4 濃度固定為 0.7 M ， CaCl_2 濃度作為反應控制變因分別為 1 M 、 0.5 M 、 0.1 M 、 0.05 M 、 0.01 M 。30 秒後將反應後的磷酸鈣產物以 pH 試紙測量 pH 值，並將多餘水分吸乾，再滴上 $20 \mu\text{l}$ 0.1% 甲苯胺藍 (toludine blue) 溶液染色，最後蓋上蓋玻片，以光學顯微鏡 (Olympus, CX43) 放大 400 倍率下，觀察磷酸鈣結晶顆粒形態與大小。

4.5 牙本質樣本與牙根根管樣本製備

牙本質樣本、牙根根管樣本詳細製備流程如圖 2。牙根選擇條件為未接受過根



管治療且無齲齒之單根管牙根，如上顎前牙、單根管小白齒等。以高速手機於牙釉質牙骨質交界 (cemento-enamel junction, CEJ) 處切除牙齒冠部，同時切除 1 mm 牙根尖 (root apex)，後續搭配大量 5.25% 次氯酸鈉 (sodium hypochloride, NaOCl) 溶液進行根管沖洗，以根管銑、ProTaper Gold® 鎳鈦旋轉根管器械 (Dentsply Sirona, USA) S1~F4、蓋氏鑿鑽 (Gates-Glidden drills) #1~#4 等器械將根管空間擴大至 ISO #110 (1.1 mm)。在根管壁厚度大於 1 mm 的條件下，製備 3 mm 牙根片段，並在牙根頰、舌側表面製造縱向刻痕 (notch)，以鐵鎚及鑿子將牙根片段剖半，作為牙本質樣本 (dentin sample)。在根管壁厚度大於 1 mm 的條件下，製備 6 mm 牙根片段，並在牙根頰、舌側表面製造縱向刻痕，作為牙根根管樣本 (root canal sample)。

將樣本放入離心管，並裝有大於樣本 10 倍體積的 5.25% 次氯酸鈉溶液，置於烘箱 (hybridization oven) 之旋轉器以旋轉速度 50 rpm 浸洗 15 分鐘，隨後以相同設定以 17 % EDTA 溶液浸洗 10 分鐘，步驟之間皆以大量二次蒸餾水進行浸洗以移除殘留化學溶液，最後將浸洗完全的樣本先保存於 4 °C 二次蒸餾水中備用。

4.6 影響磷酸鈣在牙本質表面生成變因分析

4.6.1 反應時間與氯化鈣濃度變因

牙本質樣本表面沈積磷酸鈣實驗流程圖如圖3。將牙本質樣本以根管面朝上的方式，平放於裝有 9 ml 之 0.7 M Na_2HPO_4 溶液的容器中浸泡 24 小時後，將牙本質樣本取出並將樣本表面多餘溶液以紙針 (paper point) 擦乾。接著將在浸泡過 Na_2HPO_4 溶液的牙本質樣本根管表面加入 0.5 ml 的 CaCl_2 ，使其完全覆蓋牙本質樣本表面，在設定的條件下進行磷酸鈣沈積反應，反應終止時以吸唾管吸去樣本周圍溶液，牙本質表面以紙針吸乾。

牙本質表面沈積磷酸鈣的反應控制變因包括反應時間與 CaCl_2 濃度。反應時間的組別分別為 15 分鐘、30 分鐘、60 分鐘。而 CaCl_2 濃度組別分別為 0.1 M 與 0.05 M



(n=8)，其中6個樣本用於觀察與分析根管表面磷酸鈣沈積物之結構與覆蓋行為，而2個樣本則將牙本質樣本剖半，觀察剖斷面（split surface）沈積物覆蓋厚度情形。

4.6.2 掃描式電子顯微鏡（SEM）觀察

將樣本置於70%、90%、100%酒精各15分鐘進行序列性脫水（dehydration），再浸泡液態氮後冷凍乾燥（FDU 1200 freeze dryer）24小時以移除水分。置於導電膠帶及黏貼於鋁台上（aluminum slab），接著使用覆膜機做金覆膜（gold palladium）處理後，以SEM觀察表面沈積物覆蓋情形與顯微結構形態。

4.6.3 穿透式電子顯微鏡-能量光譜（TEM-EDS）及選區電子衍射（SAED）分析

以反應時間為15分鐘、60分鐘，及CaCl₂濃度組別為0.1 M與0.05 M，於牙本質表面形成磷酸鈣沉積後，分別置入裝有1 ml 95%酒精的1.5 ml微量離心管（eppendorf）中，音波震盪（sonication）30分鐘，靜置30分鐘，將牙本質樣本取出，取微量離心管底部的10 μ l磷酸鈣產物滴在銅網上，等待10秒後用濾紙將銅網上的溶液吸乾，依情況重複以上步驟兩到三次。將乾燥的銅網放入TEM的樣品載體中，等待儀器抽真空即可進行觀測。以TEM觀察磷酸鈣產物晶體結構形態，以EDS分析其鈣磷元素比例，並進行SAED鑑定其晶體結構與晶相組成。

4.6.4 磷酸鈣沈積物覆蓋率半定量分析

磷酸鈣沈積物覆蓋率半定量分析示意圖如圖5，將一個樣本分為上段、中段、下段三段，各段隨機挑選3處（即一個樣本共9處），以放大倍率1000倍進行拍攝記錄，並使用Image J軟體，依照沈積物灰階差異計算覆蓋率，並以 SPSS 統

計軟體於 $\alpha=0.05$ 的條件下進行無母數分析 (nonparametric statistics)。



4.7 影響磷酸鈣在牙根根管表面生成變因分析

4.7.1 沖洗針頭位置變因

將牙根根管樣本水平放於盛有9 ml 0.7 M Na_2HPO_4 溶液的6 well 孔盤中，浸泡24小時，取出後將牙根根管表面多餘溶液以紙針擦乾。

將經0.7 M Na_2HPO_4 處理過的牙根根管樣本垂直置於9cm玻璃培養皿，並以雙面膠黏貼牙根底部、牙科鑷輔助壓住牙根冠部固定。以1ml針筒搭配27G針頭沖洗針頭，分別將針頭放置於牙根根管樣本冠部處 (coronal part)、中段處 (middle part)、以及根尖處 (apical part)，以每分鐘1ml的速度沖洗1 ml 0.05 M CaCl_2 ，浸泡時間為15分鐘。最後以牙科用吸唾管吸去樣本周圍溶液，根管表面以紙針吸乾。

將牙根根管樣本於刻痕處進行剖半，並依4.6.2步驟，以500倍觀察表面沈積物覆蓋情形及大致沉澱結構形態。牙根根管樣本表面沈積磷酸鈣實驗流程圖如圖3。

4.7.2 氯化鈣濃度變因

以4.5步驟製備牙根根管樣本，並依照4.6.2步驟將針頭放置於牙根根管樣本中段處分別沖洗0.05 M (樣本數=6) 及0.1M (樣本數=6) CaCl_2 後，將牙根根管樣本於刻痕處進行剖半，並依4.6.2步驟，以1000倍觀察表面沈積物覆蓋情形，以3000倍、5000倍觀察顯微結構形態。

以4.6.4步驟，對磷酸鈣沈積物覆蓋率進行半定量分析，並以 SPSS 統計軟體於 $\alpha=0.05$ 的條件下進行無母數分析 (nonparametric statistics)，各組間差異使用

Kruskal-Wallis 檢定法分析。



第五章 結果



5.1 氯化鈣濃度的影響效應

5種不同濃度 CaCl_2 都會與 0.7 M Na_2HPO_4 產生磷酸鈣沉澱，在光學顯微鏡下觀察，都以顆粒狀的結晶為主，其尺度較小，呈顆粒狀叢聚，晶體直徑小於 5 μm 。而濃度大於 0.5 M 會產生較大的片狀結晶，其尺度較大，呈長方形或平行四邊形，晶體邊長介於 10 ~ 50 μm ；而 0.01 M 因為濃度很低，單位面積結晶數量很低，需要提高 CaCl_2 的量才能觀察到適量的結晶生成（圖 4）。

另外，1 M CaCl_2 反應後磷酸鈣產物之 $\text{pH}=4\sim 5$ ，0.5 M CaCl_2 反應後產物之 $\text{pH}=6\sim 7$ ；0.1 M CaCl_2 反應後產物之 $\text{pH}=7\sim 8$ ；0.05 M CaCl_2 反應後產物之 $\text{pH}=7\sim 8$ ；0.01 M CaCl_2 反應後產物之 $\text{pH}=8$ （表1）。顯示隨著 CaCl_2 濃度降低，反應物的 pH 值也有從酸性升高為中性的趨勢。

本研究考慮到要形成均質性的磷酸鈣覆蓋，顆粒狀結晶應較為有利；而中性 pH 值比較不會造成組織毒性；另外也考量到反應物的有效性，最後選用 0.05 M、0.1 M 兩種 CaCl_2 濃度進行後續實驗。

5.2 反應時間對磷酸鈣沉積物覆蓋牙本質表面的影響效應

5.2.1 磷酸鈣覆蓋牙本質行為評估

於 SEM 以 500 倍以下倍率觀察，0.7 M Na_2HPO_4 與 0.05 M（圖 5）、0.1 M（圖 6） CaCl_2 在不同反應時間於牙本質表面形成磷酸鈣沉積物覆蓋情形。無論 0.05 M 或 0.1 M CaCl_2 反應 15 分鐘、30 分鐘、60 分鐘，均可發現磷酸鈣沉積物將牙本質表面完全覆蓋，無牙本質小管（dentin tubule）外漏。隨著時間增長，亦可觀察到



沉積物垂直方向堆疊增加。

5.2.2 磷酸鈣產物顯微結構觀察

於SEM以3000倍以上倍率觀察，0.7 M Na_2HPO_4 與0.05 M（圖7）、0.1 M（圖8） CaCl_2 在不同反應時間於牙本質表面形成磷酸鈣沉積物之顯微結構形態。無論0.05 M或0.1 M CaCl_2 反應15分鐘、30分鐘、60分鐘其沉積物均為球狀結構（globular structures）為主，球狀直徑大小約為1~2 μm ，由水平方向相連且垂直方向堆疊沉積。隨著反應時間增長為60分鐘，球狀結構上的針刺狀次級結構（acicular crystals）也越明顯，且單一球狀外型越趨不明顯（圖7-C、圖8-C）。但0.1 M大於30分鐘組別，少部分區域可在球狀結構中觀察到少量片狀晶體形成，其尺度較大，呈長方形或平行四邊形，晶體邊長介於10~50 μm ，通常與球狀結構交錯、或是覆蓋於球狀結構之上（圖9）。

依照各學者的研究顯示，當鈣離子與磷酸根離子作用時，初期可能會先形成非晶性的ACP (Zhang, Zhang, & Wang, 2022)，顯微結構主要是呈現球狀結晶；隨著反應時間，晶體的排列會越趨規則，有可能會形成片狀結構的CDHA (Yang et al., 2011)，或是形成表面帶有針刺狀次級結構的球狀結晶HAP (Pan, Liu, Tang, & Xu, 2010)。比對我們的研究，15分鐘時主要呈現球狀結構，與ACP的結構相似，推測此時磷酸鈣主要以ACP產物為主；隨著濃度增加到0.1 M、反應時間到30分鐘，可以看到部分區域有片狀結晶形成，和CDHA相似，推測此時有CDHA的生成；當反應時間到60分鐘時，球狀結構表面出現針刺狀次級結構，與典型HAP的型態相同，推測此時應有HAP產物生成。

5.2.3 磷酸鈣產物晶相鑑定

在TEM的觀察下，反應時間15分鐘的晶體排列是比較沒有方向性的（圖14-A、圖16-A）；隨著時間的增加，會出現一些線條狀排列的晶體結構，尤其是0.1

M 反應時間60分鐘（圖17-A），很明顯有線條狀結晶排列的方向，顯示時間增加，晶體結晶性應該有所提升。

SAED結果都是以暈開的繞射圈形式為主（圖14-B、圖15-B、圖16-B、圖17-B），顯示產物以方向排列較差、非晶性磷酸鈣為主，與TEM結果符合。同時可以看到明顯繞射點的存在，顯示同時也有部分結晶性較好的磷酸鈣形成。隨著反應時間及濃度增加，可以發現繞射點訊號有增強，顯示結晶性有逐漸提升的趨勢。

表2針對這四組SAED繞射結果進行晶面間距的比較，可以發現在同一濃度的晶面間距結果大致相同，但0.05 M與0.1 M第二圈及第四圈的晶面間距略有差異。另外，進行結晶面訊號的比對（表3），可以發現和HAP訊號較強的結晶面是有相關的，推測結晶性較好的產物應該是類似HAP的結晶結構。

5.2.4 磷酸鈣產物鈣磷比分析

取四組不同濃度氯化鈣和反應時間作用下的磷酸鈣沉積物進行TEM-EDS分析，其結果順序如下：0.05 M CaCl_2 反應15分鐘組，選取照射位置（圖10-A）所對應能量光譜分析（圖10-B），平均鈣磷比為1.31（表2）。0.05 M CaCl_2 反應60分鐘組，選取照射位置為圖中結晶較密集且顏色較深處（圖11-A），所對應能量光譜分析（圖11-B）之鈣磷比為1.48（表2）；選取照射位置為圖中結晶較稀疏且顏色較淺處（圖11-C），所對應能量光譜分析（圖11-D）之鈣磷比為1.39（表2）；整體平均之鈣磷比為1.45（表2）。0.1 M CaCl_2 反應15分鐘組，選取照射位置（圖12-A）所對應能量光譜分析（圖12-B），平均鈣磷比為1.39（表2）。0.1 M 氯化鈣反應60分鐘組，選取照射位置為圖中結晶較密集且顏色較深處（圖13-A），所對應能量光譜分析（圖13-B）之鈣磷比為1.51（表2）；選取照射位置為圖中結晶較稀疏且顏色較淺處（圖13-C），所對應能量光譜分析（圖13-D）之鈣磷比為1.41（表2）；整體平均之鈣磷比為1.47（表2）。

在反應時間為15分鐘的時候，鈣磷比是1.31，SAED繞射結果也顯示為非晶性

的ACP結構，比對學者研究ACP鈣磷比介於1.2-2.2之間 (Zhao, Liu, Sun, & Yang, 2012)，故推測反應產物是以ACP為主。隨著反應時間增加到60分鐘，鈣磷比提升到1.47，SAED繞射結果也顯示繞射點增加，結晶性提升，比對學者研究HAP的鈣磷比為1.67、CDHA的鈣磷比為1.5-1.67 (Zhao et al., 2012)，本研究結果為1.47，故推測60分鐘的產物是以CDHA為主。

5.3 氯化鈣濃度對磷酸鈣沈積物覆蓋牙本質表面的影響效應

5.3.1 磷酸鈣覆蓋牙本質表面形態觀察（光學顯微鏡+SEM）

以牙科顯微鏡觀察牙本質樣本，經0.7 M Na₂HPO₄浸泡並與0.05 M CaCl₂反應15分鐘後，與反應前（圖18-A,B,C）相比較，可觀察到明顯有白色沈積於牙本質表面（圖18-D,E,F）。0.1 M CaCl₂反應15分鐘組，反應後也可觀察到明顯有白色沈積於牙本質表面（圖19）。

SEM下以1000倍觀察0.05 M CaCl₂反應15分鐘、及0.1 M CaCl₂反應15分鐘後，於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之覆蓋情形相似（圖20），均可發現磷酸鈣沈積物將牙本質表面幾乎完全覆蓋，並無牙本質小管開口外漏，且呈球狀結構，並無片狀結晶出現。

5.3.2 磷酸鈣覆蓋率與覆蓋厚度分析

圖21為不同CaCl₂濃度於反應15分鐘之牙本質表面磷酸鈣沈積物覆蓋率半定量分析結果：0.05 M CaCl₂反應15分鐘之平均覆蓋率為97.82 %，0.1 M CaCl₂反應15分鐘之平均覆蓋率為97.57 %。結果顯示兩組平均覆蓋率相似，沒有統計上的差異（表4）。

圖22為不同CaCl₂濃度於反應15分鐘之牙本質表面磷酸鈣沈積物覆蓋厚度分析結果：0.05 M CaCl₂反應15分鐘之平均覆蓋厚度為18.71 μm ，0.1 M CaCl₂反應15分鐘之平均覆蓋厚度為12.79 μm 。結果顯示雖然0.05 M CaCl₂反應15分鐘平均覆蓋厚



度大於0.1 M CaCl_2 反應15分鐘，但不具統計上的顯著差異（表5）。

另外可觀察到磷酸鈣沉澱均無進入牙本質小管中。

5.4 根管內表面生成磷酸鈣沈積物行為分析

5.4.1 沖洗位置的影響效應

圖24~26顯示SEM下以500倍觀察，在根管根尖處、中段處、及冠部處沖洗0.05 M CaCl_2 15分鐘，於牙根不同位置根管表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。結果顯示於根尖處沖洗時（圖24），牙根上段（A）、中段（B）牙本質小管外露，磷酸鈣沈積物覆蓋率極低；牙根下段（C）覆蓋率較高，較無牙本質小管外露。於中段處沖洗時（圖25），牙根上段（A）、中段（B）、下段（C）大部分都有磷酸鈣沈積物覆蓋，少部分牙本質小管外露，整體而言覆蓋率較平均。於冠部處沖洗時（圖26），牙根上段（A）、中段（B）大部分都有磷酸鈣沈積物覆蓋，少部分牙本質小管外露；牙根下段（C）牙本質小管大部分外露，磷酸鈣沈積物覆蓋率低。

整體而言，當針頭位於中段處沖洗時，牙根上段、中段、下段覆蓋率較平均、均值度也較高，因此後續以針頭位於中段處沖洗作為實驗條件。

5.4.2 0.05M 氯化鈣於根管內表面生成磷酸鈣沈積物覆蓋行為

以牙科顯微鏡觀察，牙根根管樣本經0.7 M Na_2HPO_4 處理並於根管中段處沖洗0.05 M CaCl_2 15分鐘，可見有明顯白色沈積於牙本質表面（圖27）。

SEM下以1000倍觀察（圖29），可發現牙根上段（A）、中段（B）、下段（C）覆蓋情形類似，大部分都有磷酸鈣沈積物覆蓋，少部分牙本質小管外露。

SEM下以5000倍觀察（圖31），其沈積物均為球狀結構，直徑大小約為1~2 μm ，由水平方向相連且垂直方向堆疊沉積。

牙根根管表面上段、中段、下段磷酸鈣沈積物覆蓋率分析結果（圖33）：上



段平均覆蓋率為94.21%，中段平均覆蓋率為94.90%，下段平均覆蓋率為95.90%，全根管平均覆蓋率為93.39%。結果顯示上中下段平均覆蓋率相似，沒有統計上的差異（表7）。

5.4.3 0.1M 氯化鈣於根管內表面生成磷酸鈣沈積物覆蓋行為

以牙科顯微鏡觀察，牙根根管樣本經0.7 M Na_2HPO_4 處理並於根管中段處沖洗0.1 M CaCl_2 15分鐘，可見有明顯結晶沈積於牙本質表面（圖28）。

SEM下以1000倍觀察（圖30），可發現牙根上段（A）、中段（B）、下段（C）覆蓋情形類似，大部分都有磷酸鈣沈積物覆蓋，少部分牙本質小管外露。大部分區域之磷酸鈣沈積物呈現球狀結構形態（左側圖），少部分區域可在球狀結構中觀察到少量片狀晶體形成（右側圖）。

SEM下以5000倍觀察（圖32），球狀結構直徑大小約為1~2 μm ，由水平方向相連且垂直方向堆疊沉積；片狀結晶尺度較大，呈長方形或平行四邊形，晶體邊長介於10~50 μm ，通常與球狀結構交錯、或是覆蓋於球狀結構之上。

牙根根管表面上段、中段、下段磷酸鈣沈積物覆蓋率分析結果（圖33）：上段平均覆蓋率為95.84%，中段平均覆蓋率為96.92%，下段平均覆蓋率為94.88%，全根管平均覆蓋率為95.88%。結果顯示上中下段平均覆蓋率相似，沒有統計上的差異（表7）。

結果顯示雖然0.1 M CaCl_2 平均覆蓋率略大於0.05 M CaCl_2 ，但不具統計上的顯著差異（表7）。

第六章 討論



6.1 實驗模型之探討

6.1.1 使用沉澱法於牙本質表面形成磷酸鈣結晶沉澱

因為磷酸鈣為牙齒最主要的無機成分，一直以來都有不少研究以磷酸鈣結晶作為牙本質牙髓組織再生的支架。過去沉澱法較常使用於減少牙本質敏感（dentin hypersensitivity）用途上，最早於1990由Imai以及Akimoto學者提出，在牙本質表面塗抹5%磷酸氫二鈉後再塗抹10%氯化鈣，立即形成磷酸鈣沉積，將牙本質小管開口堵住（block dentinal tubule），研究顯示高達84%患者有立即改善敏感性牙齒的問題(IMAI & AKIMOTO, 1990)。而Tung等學者在1993年也以0.044M氯化鈣及0.022M磷酸氫二鈉作用降低牙本質通透性，並以XRD證實其磷酸鈣產物為ACP或DCPD(Tung, Bowen, Derkson, & Pashley, 1993)。本研究參考上述學者之研究結果，並考量到材料取得便利、與臨床操作方便性，也使用沉澱法，以氯化鈣作為鈣離子來源，磷酸氫二鈉作為磷酸根離子來源，於牙本質表面進行快速離子反應產生磷酸鈣沉澱。

6.1.2 使用牙根根管樣本

本研究先以溶液混合的方式，以光學顯微鏡下觀察結晶大小、及混合後之pH值變化，挑選適合的氯化鈣濃度為0.1M及0.05M進行後續實驗。

以牙本質樣本進行不同反應時間的試驗，發現氯化鈣濃度不論為0.1M或0.05M，反應時間只要 15分鐘，皆有良好的覆蓋率，且反應15分鐘的結晶形態較為一致，均為直徑為1~2 μm 球狀顆粒，具有均質性高的特點。

最後使用長度6mm、根尖孔徑大於1mm之牙根根管樣本模擬臨床上牙根未發育完全的恆牙，並以針筒裝載藥品以根管沖洗方式模擬實際臨床操作步驟，期望能具有臨床操作參考價值。結果發現針頭位置於中段沖洗所形成磷酸鈣結晶覆蓋



率較平均分布，且平均覆蓋率也高達93%以上。

6.2 磷酸鈣覆蓋率及覆蓋厚度之探討

作用於牙本質樣本，0.05 M氯化鈣反應15分鐘平均覆蓋率為97.82%，0.1 M氯化鈣反應15分鐘平均覆蓋率為97.57%；做用於牙根根管樣本，0.05 M氯化鈣反應15分鐘平均覆蓋率為93.39%，0.1 M氯化鈣反應15分鐘平均覆蓋率為95.88%。牙本質樣本之平均覆蓋率大於牙根根管樣本，推測其原因為牙本質樣本是靜態作用，其沉積狀況會較穩定；反觀牙根根管樣本為流動沖洗，鈣離子亦隨水流沖出，會影響沉積。

而關於覆蓋厚度，0.05M和0.1M都可以看到為垂直方向的層層堆疊，統計結果0.05M較0.1M的沉積厚，但無統計差異；且可觀察到0.1M堆疊較緻密，層與層之間較無空隙，推測0.1M結晶量多、厚重壓密所致。另外，無論0.05M或0.1M，沉積物都沒有進入牙本質小管中，推測因球狀結晶大小為 $1\sim 2\mu\text{m}$ ，和牙本質小管開口大小接近所致；另外也可能與牙本質小管表面電性有關，根據過去學者的研究，牙本質在中性環境時是帶負電(Neidens, Weiss, & Cudney, 1970)，這與牙本質小管內的蛋白質有極大關係，依照蛋白質環境電性變化，環境偏鹼性時，蛋白質帶負電。經測量10%磷酸氫二鈉pH值9.19為鹼性，其鹼性環境會讓所釋放出的磷酸根離子無法進入牙本質小管中，導致磷酸鈣在牙本質表面及沉積。或許可先對牙本質表面進行適度酸性處理，使牙本質小管帶正電，再進行磷酸氫二鈉及氯化鈣處理。

6.3 晶體組成與結構分析之探討

將本次晶面間距的實驗結果對照國際繞射資料中心之氫氧基磷灰石粉末繞射主峰資料（PDF：84-1998）發現吻合，並且考量到鈣磷元素比為1.31~1.47，推測



其結晶為鈣原子缺乏的氫氧基磷灰石 (CDHA)。推測由於HAp晶體的表面容易參與水分子與 HPO_4^{2-} ，因此若是晶體顆粒較小，則表面結構的影響就會相對增加，使整體鈣磷比例下降，這樣就會形成CDHA (Huo, Q. et al, 1994)。

從TEM-EDS結果顯示，相同濃度作用下，反應時間越長，鈣磷元素比會增加，顯示磷酸鈣結晶性越好。

進行SAED時可發現，利用電子數和晶格之間的繞射關係，看到點越多，結晶度越高。圖14、圖15中顯示0.05M氯化鈣反應60分鐘比0.05M氯化鈣反應15分鐘的亮點還要多，圖16、圖17中顯示0.1M氯化鈣反應60分鐘比0.1M氯化鈣反應15分鐘的亮點還要多，都顯示相同濃度下，反應時間越長會導致磷酸鈣結晶性越好。

6.4 晶體形態分析之探討

0.1M氯化鈣反應15分鐘作用於牙本質樣本時，磷酸鈣沈積物只呈現球狀結構形態；而同樣濃度與反應時間，作用於牙根根管樣本時，大部分區域之磷酸鈣沈積物呈現球狀結構形態，但有少部分區域可在球狀結構中觀察到少量片狀晶體形成。推測是因為作用於牙根根管樣本時為動態沖洗氯化鈣1ml，相較於滴上0.5ml於牙本質樣本，鈣離子來源較充足而易生成片狀晶體。

從5000倍SEM觀察到，球狀結晶（圖31）之間無論水平方向或垂直方向，會出現1~5 μm 不等的間距，有微孔洞 (microporosity) 的特性，文獻證實支架若具有小於10 μm 的微孔洞特性，有助於人體體液的循環 (Jung et al., 2018)，也助於骨誘導 (osteoinduction) 的生成 (Zhang et al., 2018)；但是若要有利於dental pulp-derived cell貼附，進而有助於牙本質再生，則需要100~300 μm 的大孔性 (macroporosity) (Jung et al., 2018)。此點可作為之後實驗參考方向。

第七章 結論



本實驗之結果，可以得到以下幾點結論：

1. 使用10%磷酸氫二鈉作為磷酸根離子來源，以0.05M、或0.1M氯化鈣作為鈣離子來源，使用沉澱法反應15分鐘，能在牙本質樣本表面形成覆蓋率高、均值度佳的磷酸鈣結晶沈澱。
2. 使用10%磷酸氫二鈉作為磷酸根離子來源，以0.05M氯化鈣作為鈣離子來源，針頭沖洗位置於根管中段，反應15分鐘，能在牙根根管樣本表面形成覆蓋率高、均值度佳的磷酸鈣結晶沈澱。
3. 磷酸鈣結晶種類經TEM-EDS及SAED確認為鈣原子缺乏的氫氧基磷灰石 (CDHA)。

參考文獻



Abraham, W. (1983). Principles of biochemistry: mammalian biochemistry.

Aguilar, P., & Linsuwanont, P. (2011). Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *Journal of endodontics*, 37(5), 581-587.

Abraham, W. (1983). Principles of biochemistry: mammalian biochemistry.

Aguilar, P., & Linsuwanont, P. (2011). Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *Journal of endodontics*, 37(5), 581-587.

Al-Sanabani, J. S., Madfa, A. A., & Al-Sanabani, F. A. (2013). Application of calcium phosphate materials in dentistry. *International journal of biomaterials*, 2013.

Bakhtiar, H., Mazidi S, A., Mohammadi Asl, S., Ellini, M., Moshiri, A., Nekoofar, M., & Dummer, P. (2018). The role of stem cell therapy in regeneration of dentine-pulp complex: a systematic review. *Progress in biomaterials*, 7(4), 249-268.

Banava, S., Fazlyab, M., Heshmat, H., Mojtahedzadeh, F., & Motahhary, P. (2015). Histological evaluation of single and double-visit direct pulp capping with different materials on sound human premolars: a randomized controlled clinical trial. *Iranian Endodontic Journal*, 10(2), 82.

Boskey, A., & Posner, A. (1976). Formation of hydroxyapatite at low supersaturation. *The Journal of Physical Chemistry*, 80(1), 40-45.

Brown, W. E. (1962). Octacalcium phosphate and hydroxyapatite: crystal structure of octacalcium phosphate.

Chang, S.-W., Kim, J.-Y., Kim, M.-J., Kim, G.-H., Yi, J.-K., Lee, D.-W., . . . Kim, E.-C. (2016). Combined effects of mineral trioxide aggregate and human placental extract on rat pulp tissue and growth, differentiation and angiogenesis in human dental pulp cells. *Acta Odontologica Scandinavica*, 74(4), 298-306.

Chang, Y.-L., Lew, D., Park, J. B., & Keller, J. C. (1999). Biomechanical and morphometric analysis of hydroxyapatite-coated implants with varying crystallinity. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 57(9), 1096-1108.
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0278-2391\(99\)90333-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-2391(99)90333-6)

Cherng, A., Chow, L. C., & Takagi, S. (2004). Reduction in dentin permeability using mildly supersaturated calcium phosphate solutions. *Archives of oral biology*, 49(2), 91-98.

Cvek, M. (1992). Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol*, 8(2), 45-55. doi:10.1111/j.1600-9657.1992.tb00228.x

Dorozhkin, S. V. (2010). Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomater*, 6(12), 4457-4475. doi:10.1016/j.actbio.2010.06.031

Dorozhkin, S. V., & Epple, M. (2002). Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(17), 3130-3146. doi:10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3130::AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1

Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4), 677-689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044

Friedman, S., & Mor, C. (2004). The success of endodontic therapy-healing and functionality. *CDA J*, 32(6), 493-503.

Galler, K. M., D'souza, R., Hartgerink, J., & Schmalz, G. (2011). Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Advances in Dental Research*, 23(3), 333-339.

Glimcher, M. J. (1984). Recent studies of the mineral phase in bone and its possible linkage to the organic matrix by protein-bound phosphate bonds. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 304(1121), 479-508. Retrieved from <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/304/1121/479.long>

Grynpas, M. D., & Omelon, S. (2007). Transient precursor strategy or very small biological apatite crystals? In (Vol. 41, pp. 162-164): Elsevier.

Huang, G.-J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Critical reviews in oral biology & medicine: mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), 792.

Huang, G. T.-J., Yamaza, T., Shea, L. D., Djouad, F., Kuhn, N. Z., Tuan, R. S., & Shi, S. (2010). Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Engineering Part A*, 16(2), 605-615.

IMAI, Y., & AKIMOTO, T. (1990). A new method of treatment for dentin hypersensitivity by precipitation of calcium phosphate in situ. *Dental materials journal*, 9(2), 167-172,229.

Iohara, K., Zheng, L., Ito, M., Ishizaka, R., Nakamura, H., Into, T., . . . Nakashima, M. (2009). Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31-/CD146-side population cells from a canine tooth.

Ishikawa, K., Suge, T., Yoshiyama, M., Kawasaki, A., Asaoka, K., & Ebisu, S. (1994). Occlusion of dentinal tubules with calcium phosphate using acidic calcium phosphate solution followed by neutralization. *Journal of Dental Research*, 73(6), 1197-1204.

Johansen, E., & Parks, H. F. (1962). Electron-microscopic observations on sound human dentine. *Arch Oral Biol*, 7, 185-193.



Kisby, L. (2016). Vital pulp therapy in primary teeth: an update. *Dentistry today*, 35(5), 112-113.

Mansbridge, J. (2009). A “selection model” of political representation. *Journal of Political Philosophy*, 17(4), 369-398.

Matsumine, A., Kusuzaki, K., Matsubara, T., Okamura, A., Okuyama, N., Miyazaki, S., . . . Uchida, A. (2006). Calcium phosphate cement in musculoskeletal tumor surgery. *Journal of Surgical Oncology*, 93(3), 212-220. doi:10.1002/jso.20355

Moussa, D. G., & Aparicio, C. (2019). Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 13(1), 58-75.

Neiders, M. E., Weiss, L., & Cudney, T. L. (1970). An electrokinetic characterization of human tooth surfaces. *Arch Oral Biol*, 15(2), 135-151. doi:10.1016/0003-9969(70)90049-x

Pan, H., Liu, X. Y., Tang, R., & Xu, H. Y. (2010). Mystery of the transformation from amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite. *Chemical communications*, 46(39), 7415-7417.

Posner, A. S., & Tannenbaum, P. J. (1984). The mineral phase of dentin. *Dentin and dentinogenesis*, 2, 17-36.

Qu, T., Jing, J., Ren, Y., Ma, C., Feng, J. Q., Yu, Q., & Liu, X. (2015). Complete pulpodentin complex regeneration by modulating the stiffness of biomimetic matrix. *Acta Biomater*, 16, 60-70. doi:10.1016/j.actbio.2015.01.029

Quinaux, N., & Richelle, L. (1967). X-RAY DIFFRACTION AND INFRARED ANALYSIS OF BONE SPECIFIC GRAVITY FRACTIONS IN GROWING RAT. *Israel Journal of Medical Sciences*, 3(5), 677-&.

Ravindran, S., Huang, C.-C., & George, A. (2014). Extracellular matrix of dental pulp stem cells: applications in pulp tissue engineering using somatic MSCs. *Frontiers in physiology*, 4, 395.

Rutherford, R. B., & Gu, K. (2000). Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7. *European journal of oral sciences*, 108(3), 202-206.

Suchanek, W., & Yoshimura, M. (1998). Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *Journal of Materials Research*, 13(01), 94-117. doi:doi:10.1557/JMR.1998.0015

Suge, T., Ishikawa, K., Kawasaki, A., Yoshiyama, M., Asaoka, K., & Ebisu, S. (1995). Duration of dentinal tubule occlusion formed by calcium phosphate precipitation method: in vitro evaluation using synthetic saliva. *Journal of Dental Research*, 74(10), 1709-1714.

Tung, M. S., Bowen, H. J., Derkson, G. D., & Pashley, D. H. (1993). Effects of calcium

phosphate solutions on dentin permeability. *J Endod*, 19(8), 383-387. doi:10.1016/S0099-2399(06)81500-1

Vacanti, J. P., & Langer, R. (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The lancet*, 354, S32-S34.

Veis, A. (2005). Materials science. A window on biominerilization. *Science*, 307(5714), 1419-1420. doi:10.1126/science.1109440

Wang, L., & Stegemann, J. P. (2010). Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. *Biomaterials*, 31(7), 1612-1618.

Watson, M. L., & Avery, J. K. (1954). The development of the hamster lower incisor as observed by electron microscopy. *Am J Anat*, 95(1), 109-161. doi:10.1002/aja.1000950105

Weiner, S., & Price, P. A. (1986). Disaggregation of bone into crystals. *Calcif Tissue Int*, 39(6), 365-375.

Weiss, M. P., Voegel, J. C., & Frank, R. M. (1981). Enamel crystallite growth: width and thickness study related to the possible presence of octocalcium phosphate during amelogenesis. *J Ultrastruct Res*, 76(3), 286-292. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022532081800597>

Witherspoon, D. E. (2008). Vital pulp therapy with new materials: new directions and treatment perspectives—permanent teeth. *Pediatric dentistry*, 30(3), 220-224.

Wu, Y., Glimcher, M. J., Rey, C., & Ackerman, J. L. (1994). A unique protonated phosphate group in bone mineral not present in synthetic calcium phosphates. Identification by phosphorus-31 solid state NMR spectroscopy. *J Mol Biol*, 244(4), 423-435. doi:10.1006/jmbi.1994.1740

Yang, R., Tan, L., Cen, L., & Zhang, Z. (2016). An injectable scaffold based on crosslinked hyaluronic acid gel for tissue regeneration. *RSC Advances*, 6(20), 16838-16850. doi:10.1039/c5ra27870h

Yang, X., Xie, B., Wang, L., Qin, Y., Henneman, Z. J., & Nancollas, G. H. (2011). Influence of magnesium ions and amino acids on the nucleation and growth of hydroxyapatite. *CrystEngComm*, 13(4), 1153-1158.

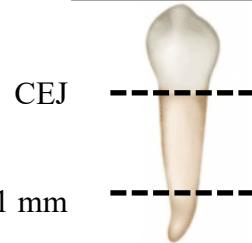
Zhang, J., Zhang, W., & Wang, L. (2022). In Situ Observation of Dicalcium Phosphate Monohydrate Formation and Phase Transformation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 126(26), 4881-4888.

Zhao, J., Liu, Y., Sun, W.-b., & Yang, X. (2012). First detection, characterization, and application of amorphous calcium phosphate in dentistry. *Journal of Dental Sciences*, 7(4), 316-323.

附錄



Tooth section



Canal preparation

ProTaper Gold[®] S1-F4
GG Drill #1-#4



ISO #110

Root section

Dentin sample



3 mm

Root canal sample



6 mm

Split

Irrigation

5.25 % NaOCl , 15 mins
17 % EDTA , 10 mins

Storage → ddH₂O , 4 °C

圖 1：牙本質與牙根根管樣本製備示意圖。

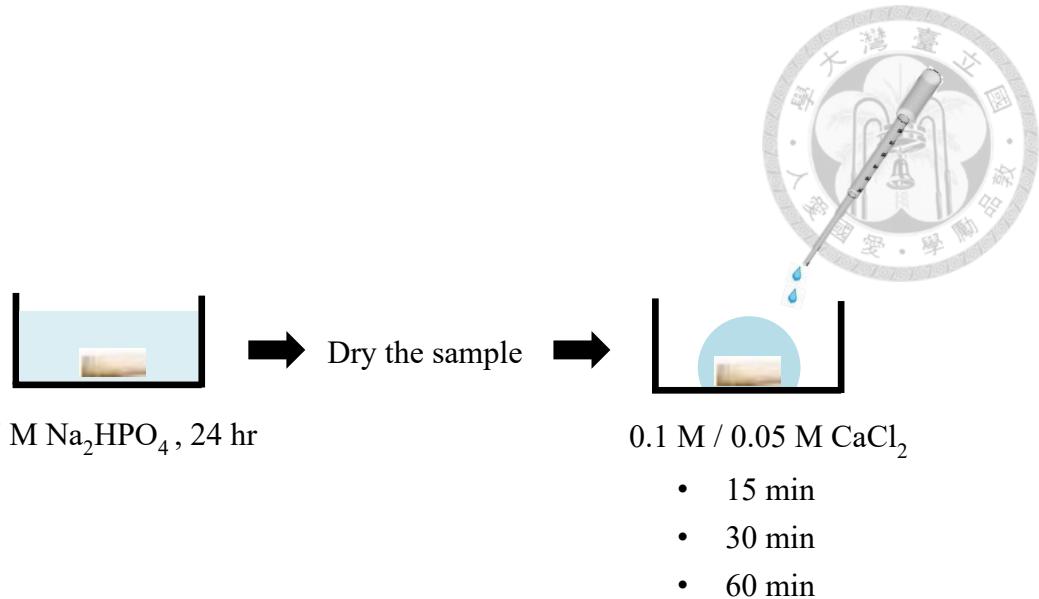


圖 2：牙本質樣本表面沈積磷酸鈣實驗流程圖。

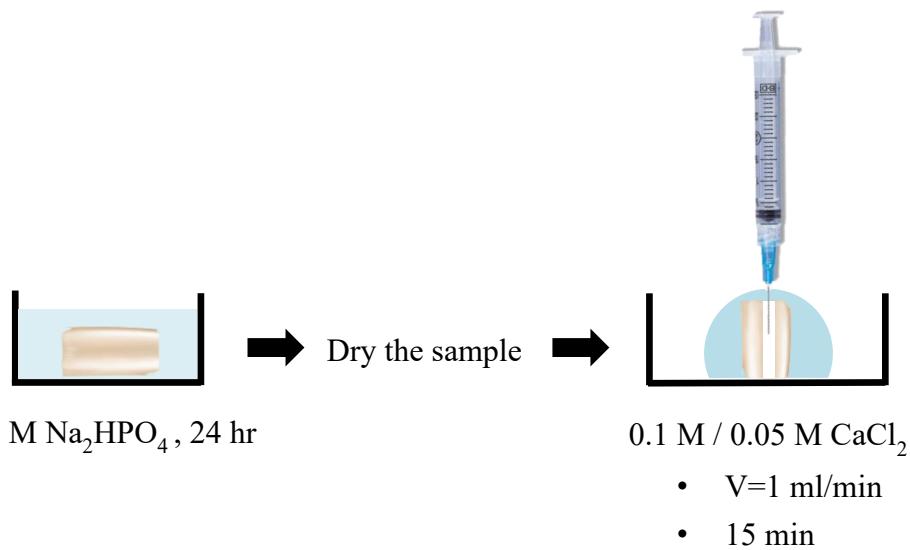


圖 3：牙根根管樣本表面沈積磷酸鈣實驗流程圖。

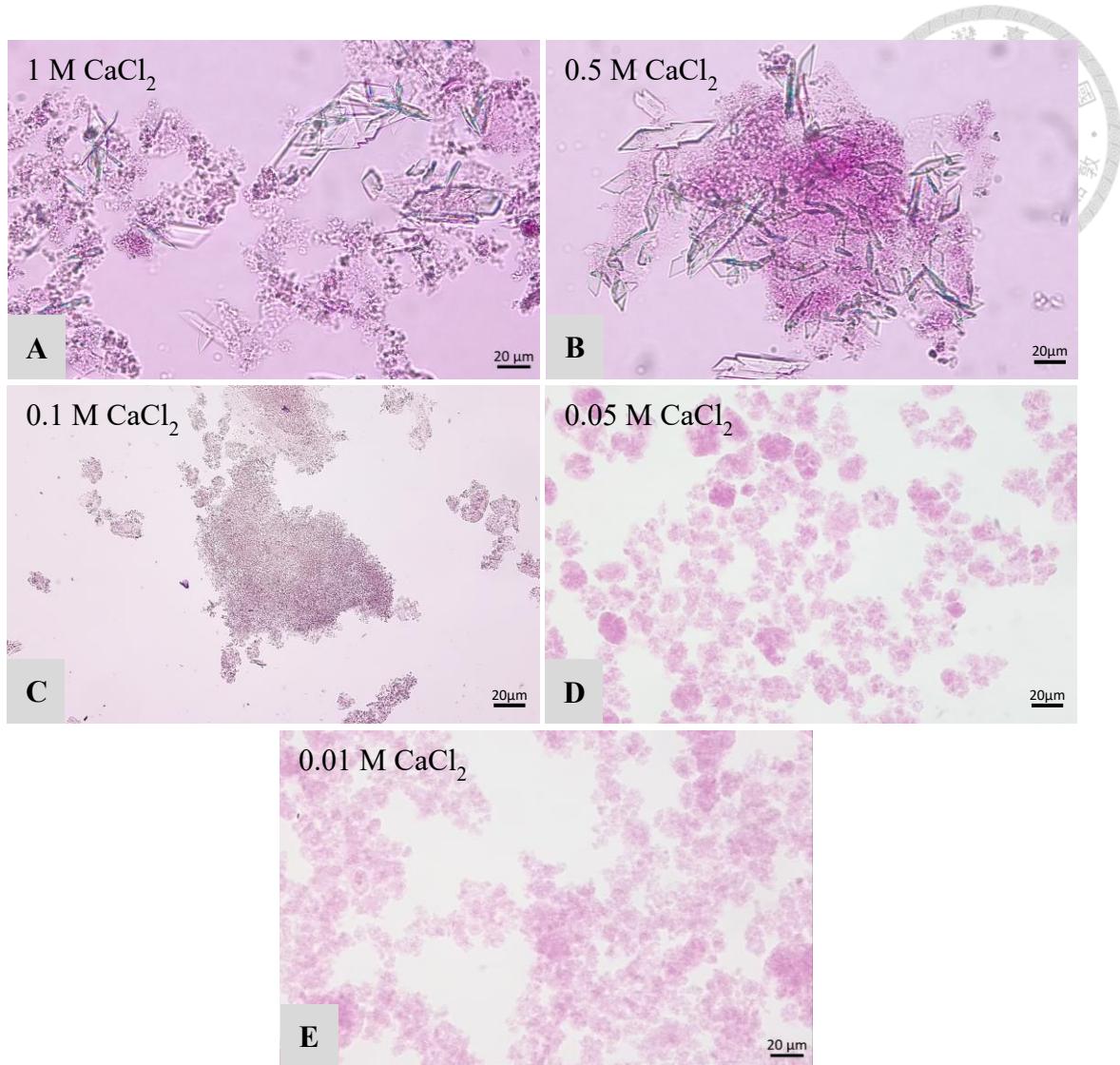


圖 4：0.7 M 磷酸氫二鈉與不同濃度氯化鈣混合後之結晶形態。

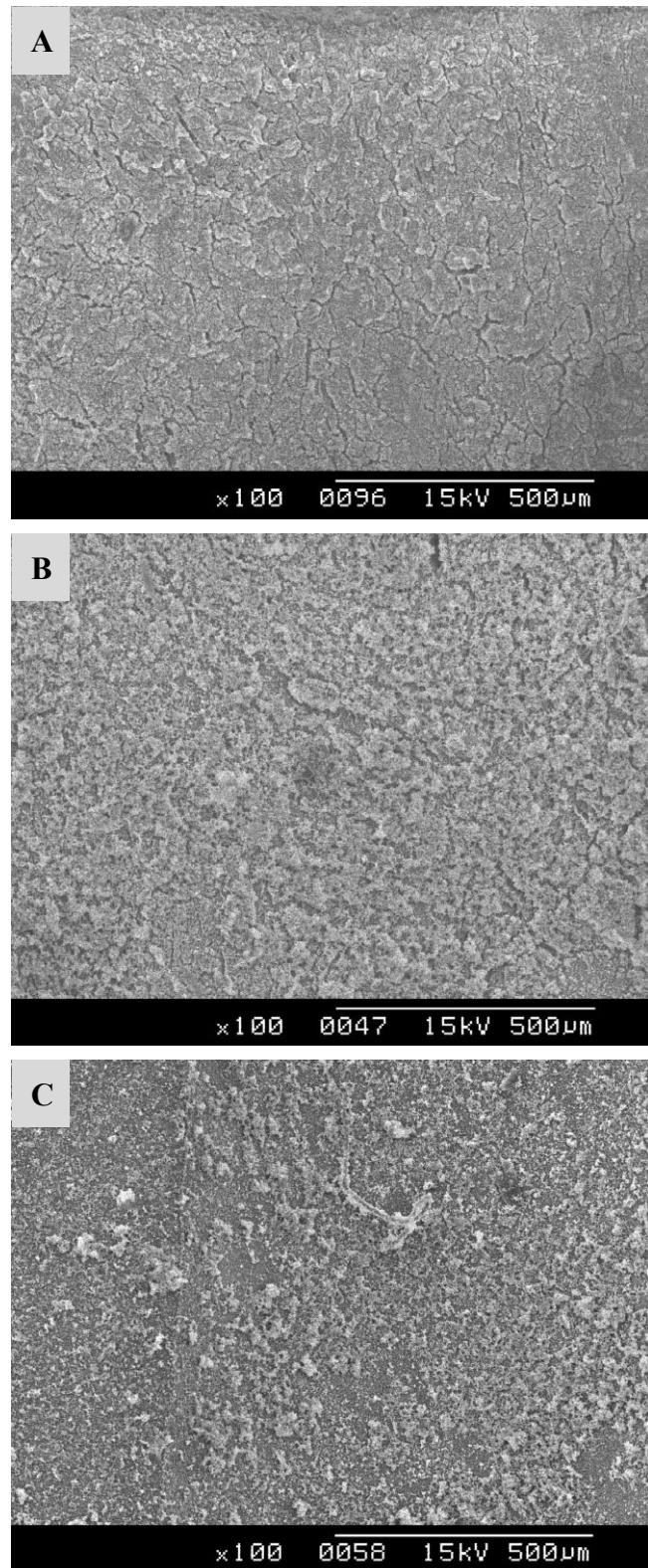


圖 5：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M 氯化鈣在不同反應時間於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。(A) 15 分鐘；(B) 30 分鐘；(C) 60 分鐘。

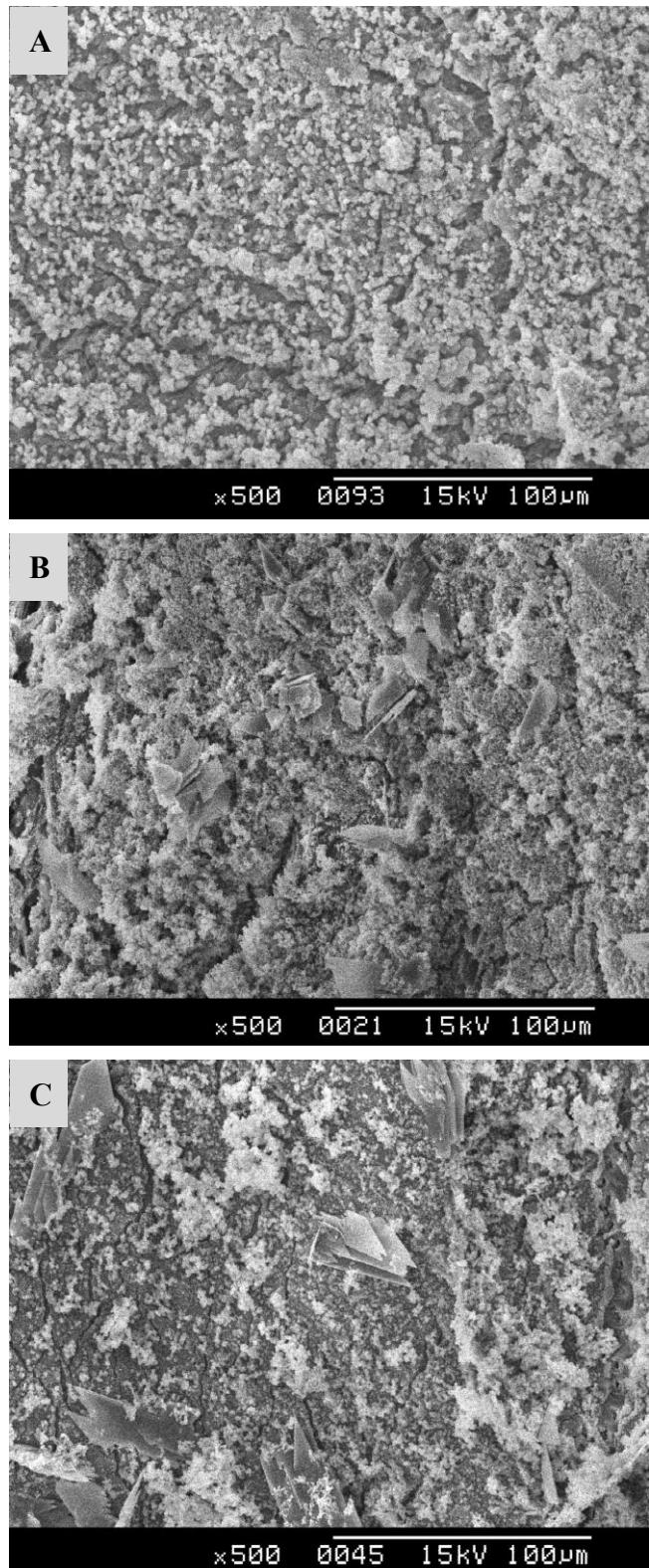


圖 6：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.1 M 氯化鈣在不同反應時間於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。(A) 15 分鐘；(B) 30 分鐘；(C) 60 分鐘。

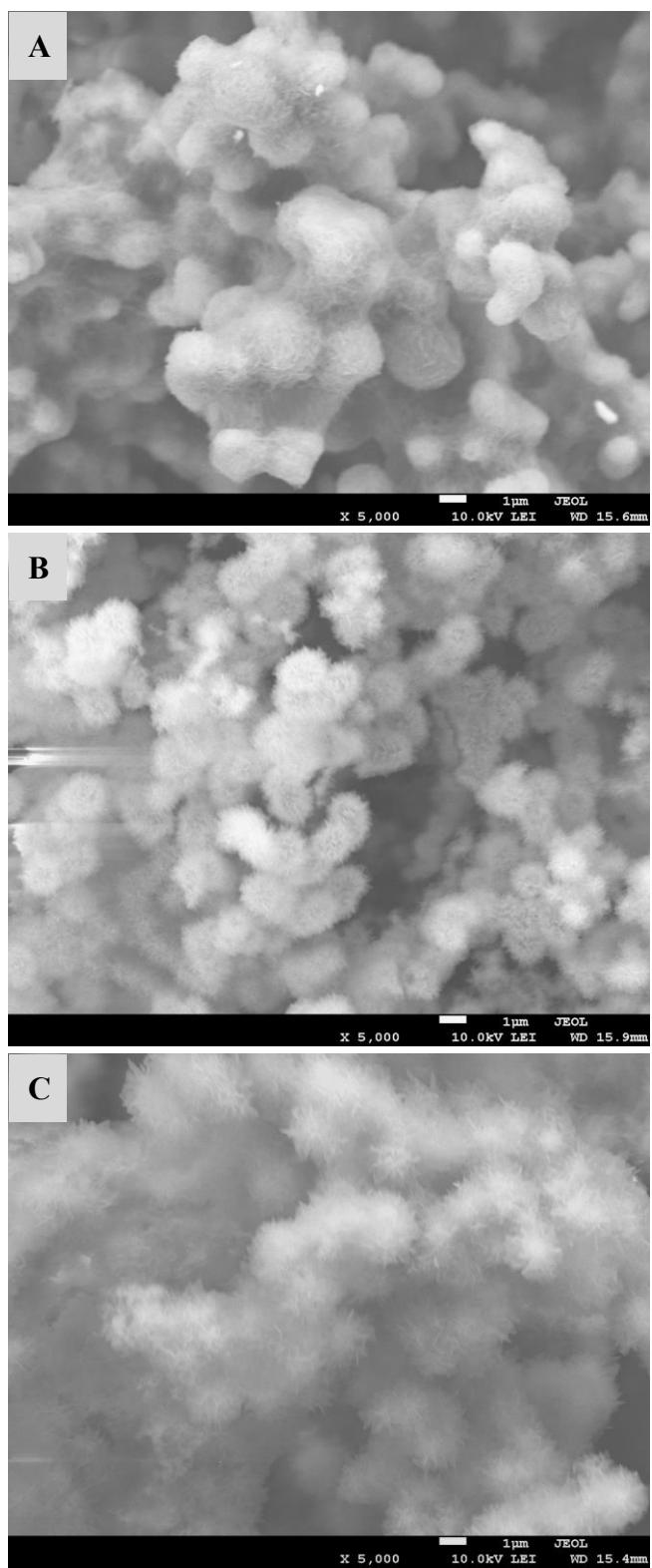


圖 7：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M 氯化鈣在不同反應時間於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之球狀結構形態。(A) 15 分鐘；(B) 30 分鐘；(C) 60 分鐘。

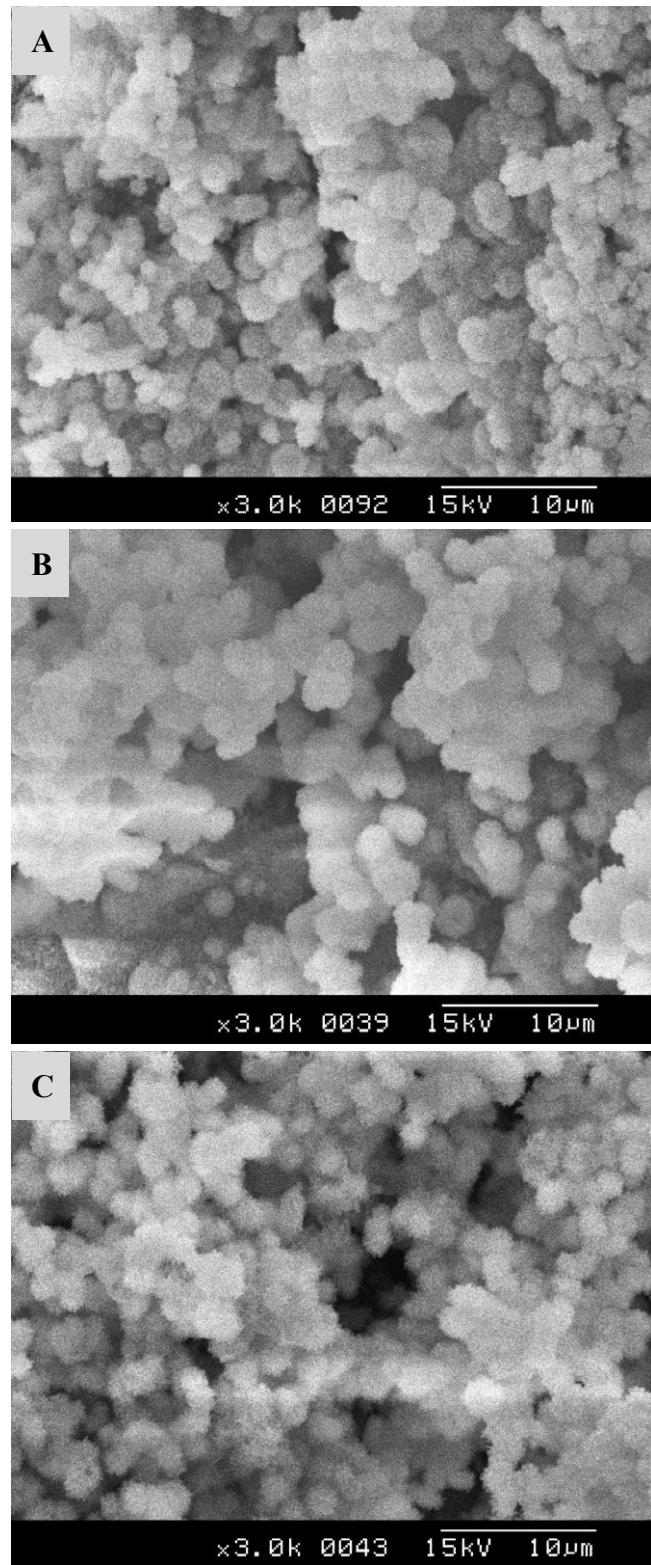


圖 8：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.1 M 氯化鈣在不同反應時間於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之球狀結構形態。(A) 15 分鐘；(B) 30 分鐘；(C) 60 分鐘。

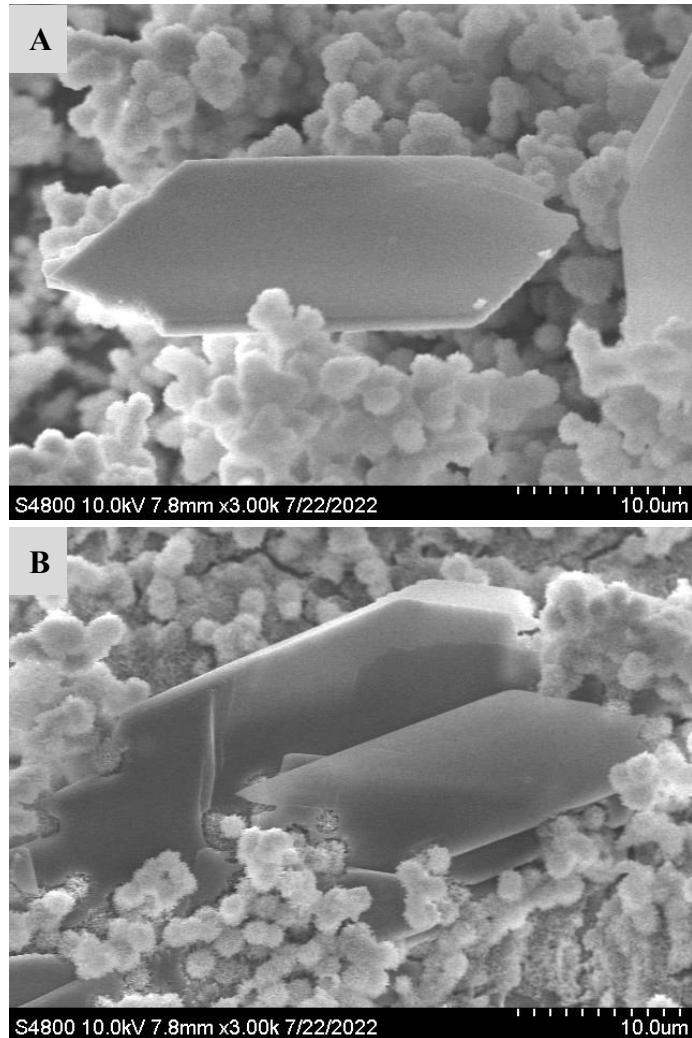


圖 9：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.1 M 氯化鈣在不同反應時間於牙本質表面
形成磷酸鈣沈積物之片狀結構形態。(A) 30 分鐘；(B) 60 分鐘。

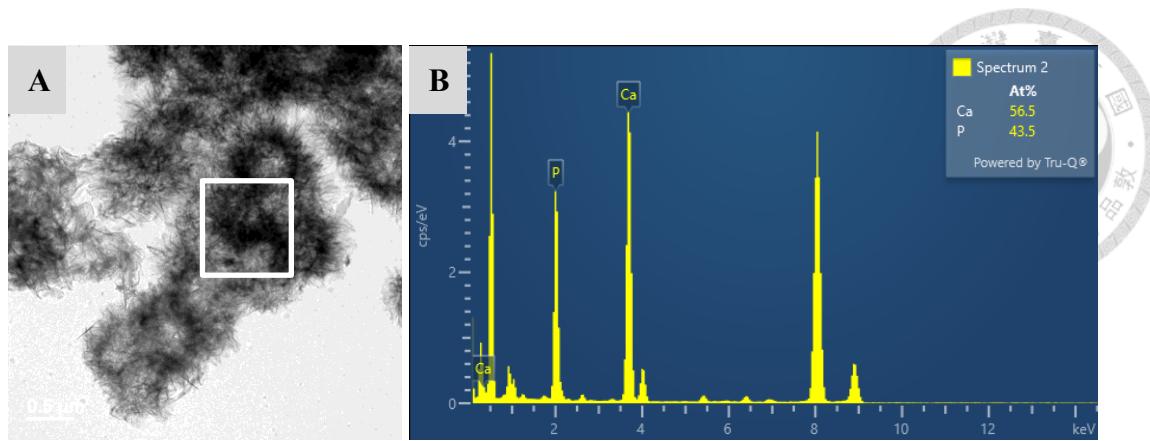


圖 10：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M 氯化鈣反應 15 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之 TEM-EDS 分析，方框為 EDS 照射位置。(A) 結晶形態；(B) EDS 分析圖。

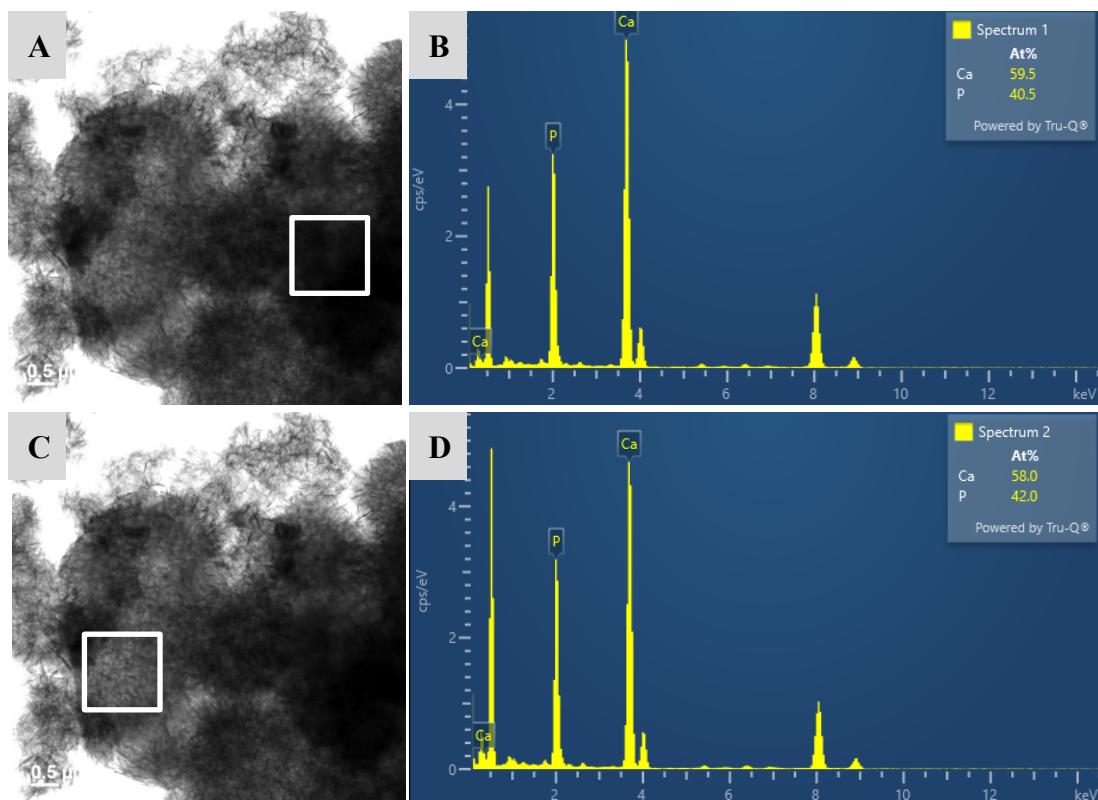


圖 11：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M 氯化鈣反應 60 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之 TEM-EDS 分析，方框為 EDS 照射位置。(A)、(C) 結晶形態；(B)、(D) EDS 分析圖。

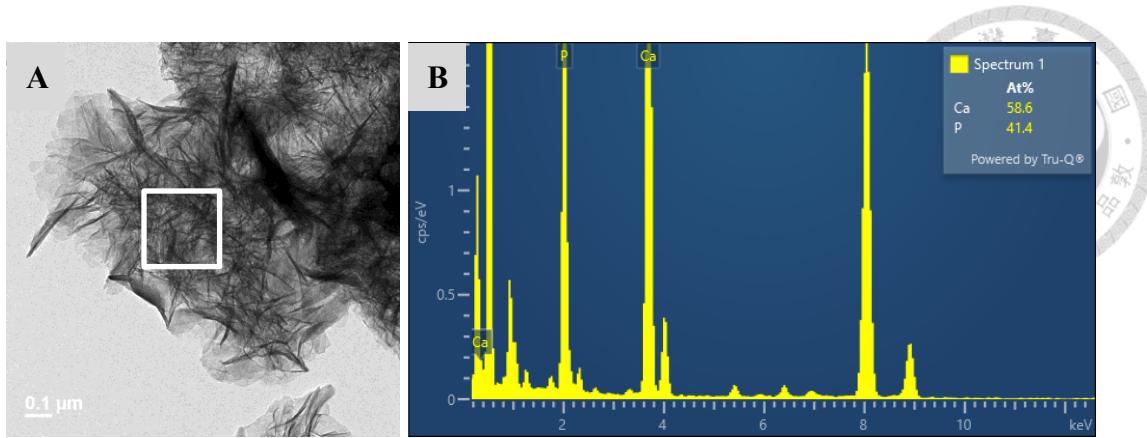


圖 12：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.1 M 氯化鈣反應 15 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之 TEM-EDS 分析，方框為 EDS 照射位置。(A) 結晶形態；(B) EDS 分析圖。

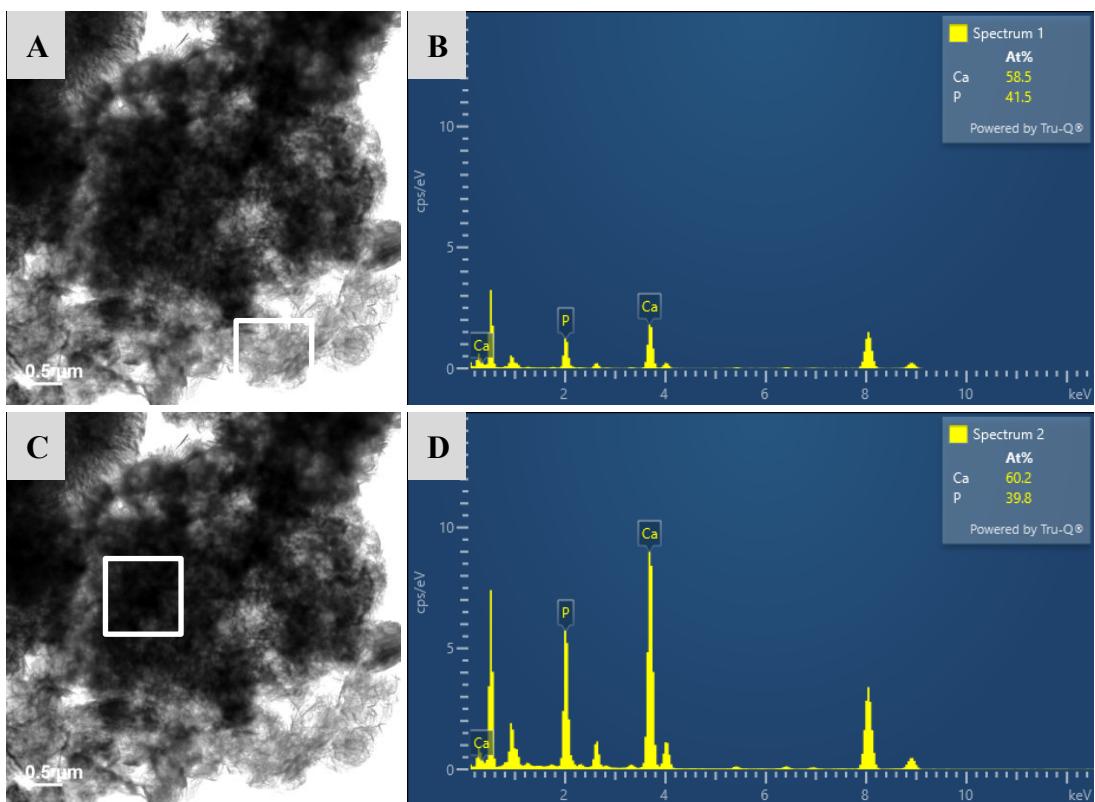


圖 13：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.1 M 氯化鈣反應 60 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之 TEM-EDS 分析，方框為 EDS 照射位置。(A)、(C) 結晶形態；(B)、(D) EDS 分析圖。

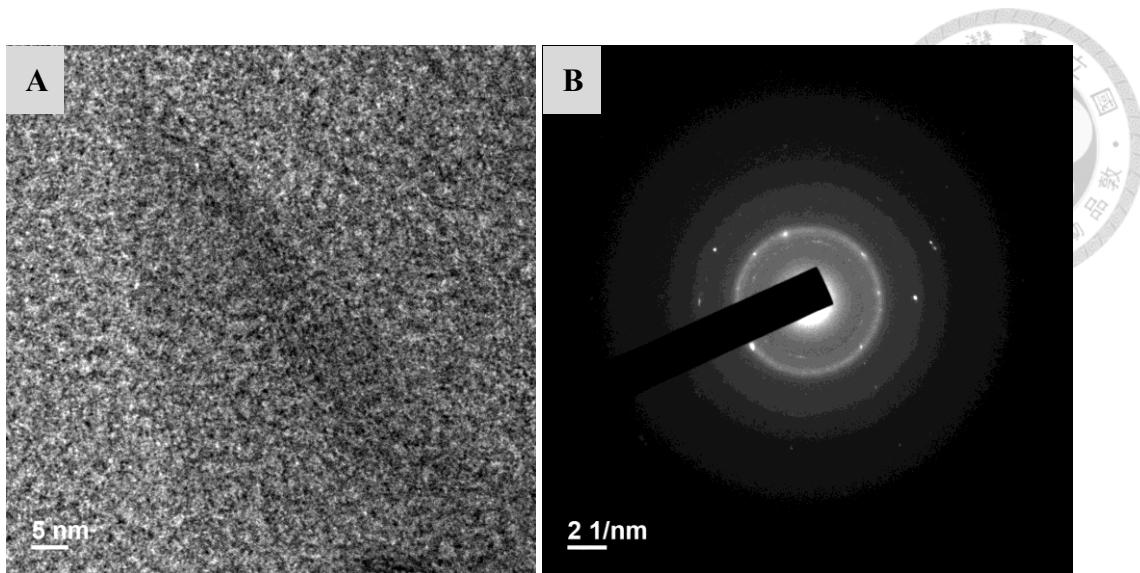


圖 14：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M 氯化鈣反應 15 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積之 TEM 結構形態分析。(A) 晶體結構形態；(B) SAED 圖。

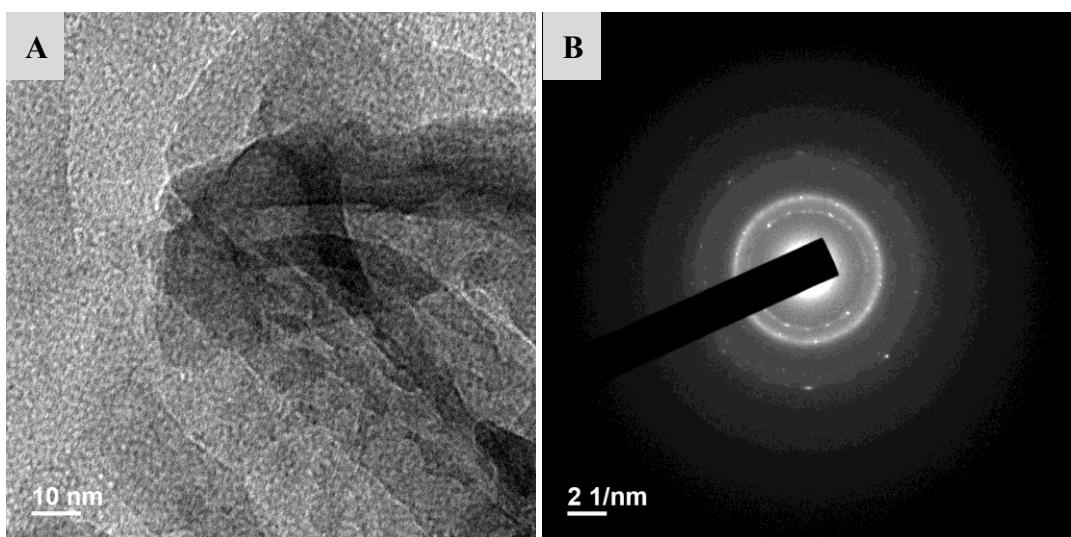


圖 15：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M 氯化鈣反應 60 分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積之 TEM 結構形態分析。(A) 晶體結構形態；(B) SAED 圖。

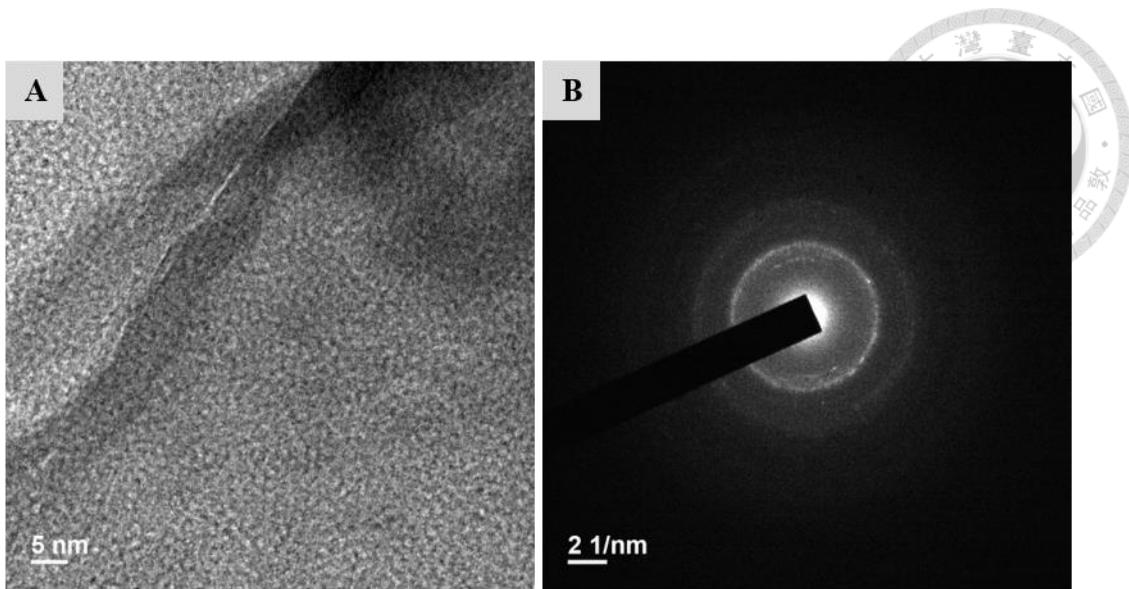


圖16：10%磷酸氫二鈉與0.1 M氯化鈣反應15分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積之TEM結構形態分析。（A）晶體結構形態；（B）SAED圖。

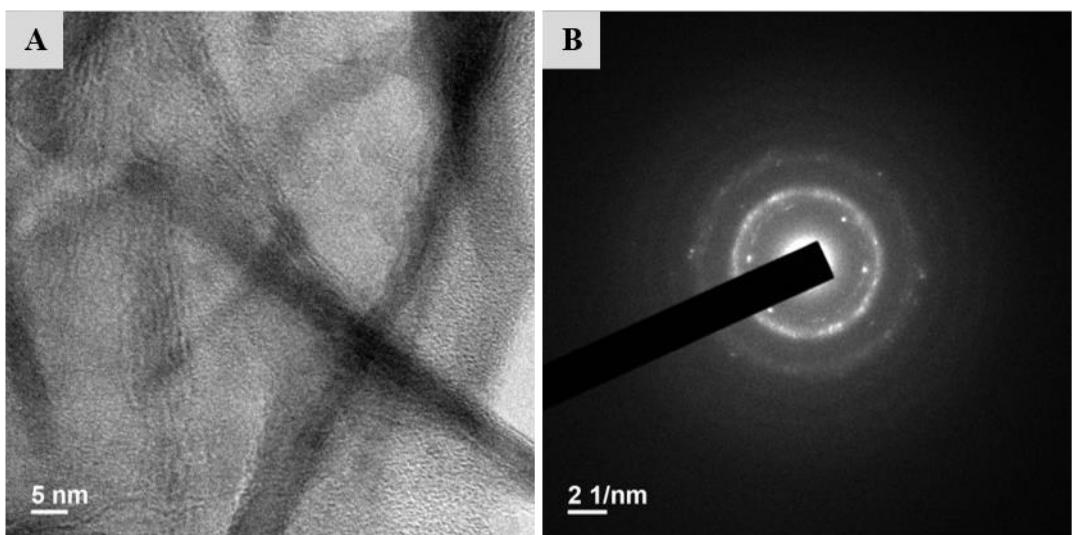


圖17：10%磷酸氫二鈉與0.1 M氯化鈣反應60分鐘於牙本質表面形成磷酸鈣沈積之TEM結構形態分析。（A）晶體結構形態；（B）SAED圖。

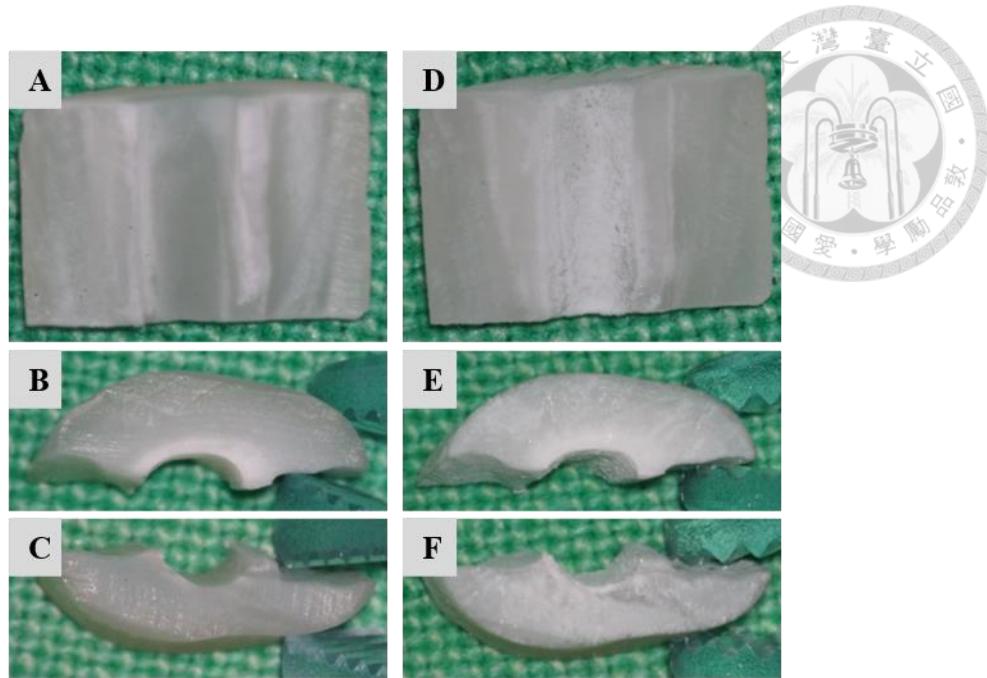


圖18：與反應前（左圖）相比較，牙本質樣本經0.7 M磷酸氫二鈉浸泡並與0.05 M氯化鈣反應15分鐘後（右圖），可觀察到明顯有白色結晶沈積於牙本質表面。

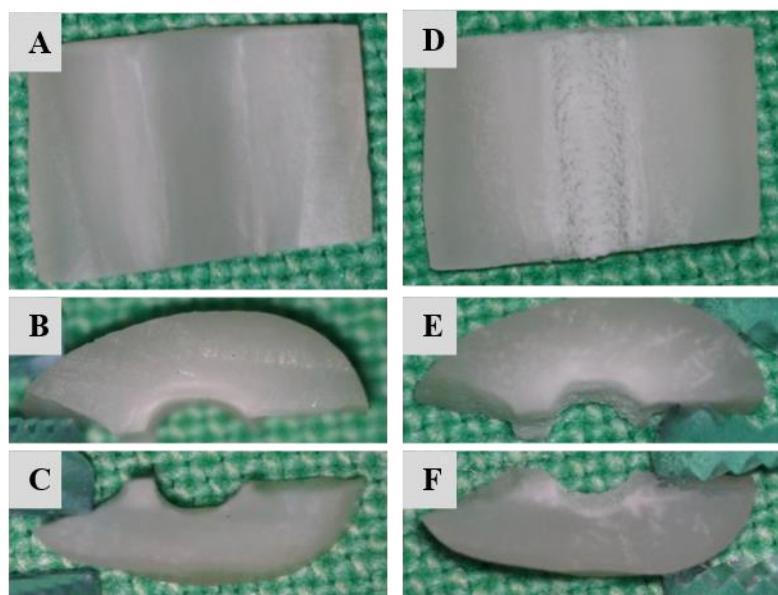


圖19：與反應前（左圖）相比較，牙本質樣本經0.7 M磷酸氫二鈉浸泡並與0.1 M氯化鈣反應15分鐘後（右圖），可觀察到明顯有白色結晶沈積於牙本質表面。

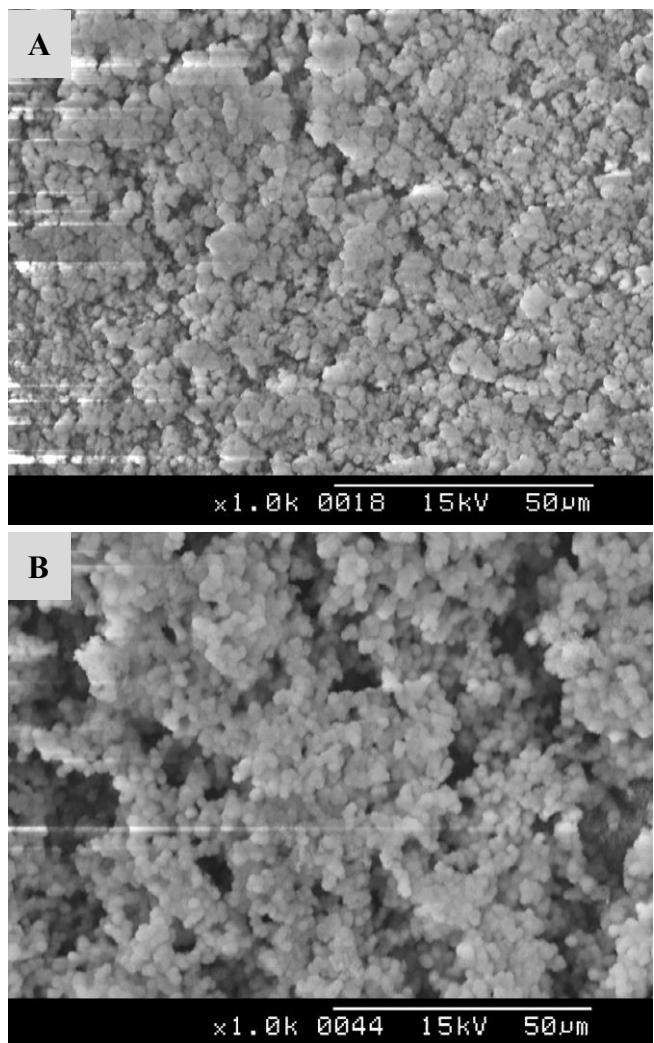


圖 20：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M (A) 和 0.1 M (B) 之氯化鈣反應
15 分鐘，於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之覆蓋情形。

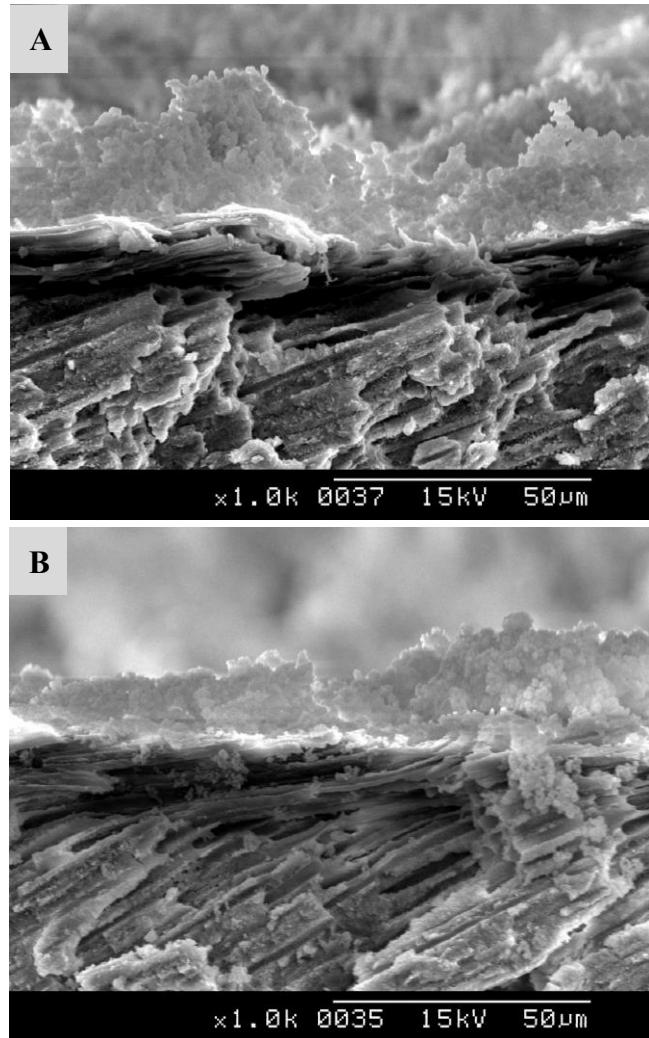


圖 21：0.7 M 磷酸氫二鈉與 0.05 M (A) 和 0.1 M (B) 之氯化鈣反應 15 分鐘，於牙本質表面形成磷酸鈣沈積物之厚度。

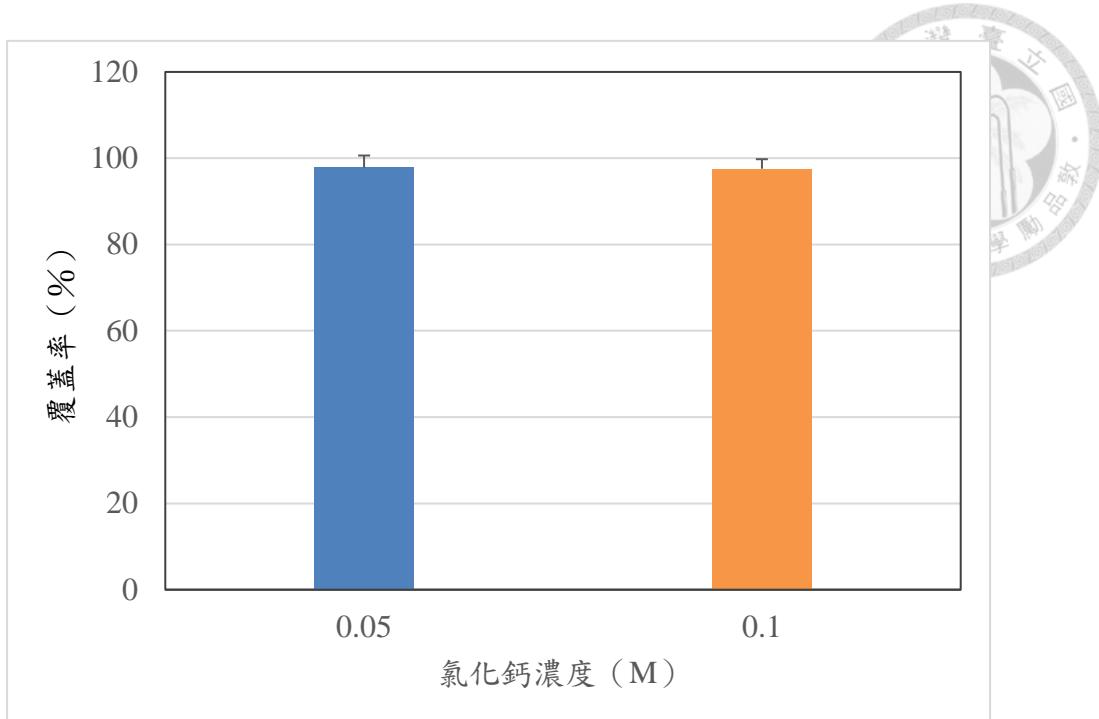


圖 22：不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙本質表面磷酸鈣沈積物覆蓋率分析（平均值+標準差）。

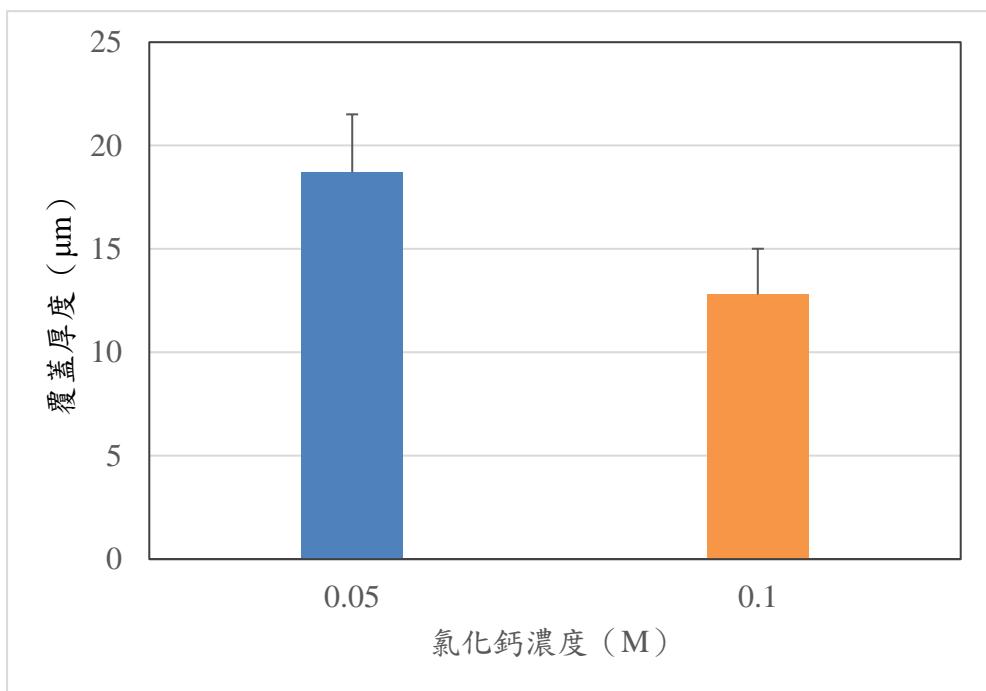


圖 23：不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙本質表面磷酸鈣沈積物覆蓋厚度分析（平均值+標準差）。

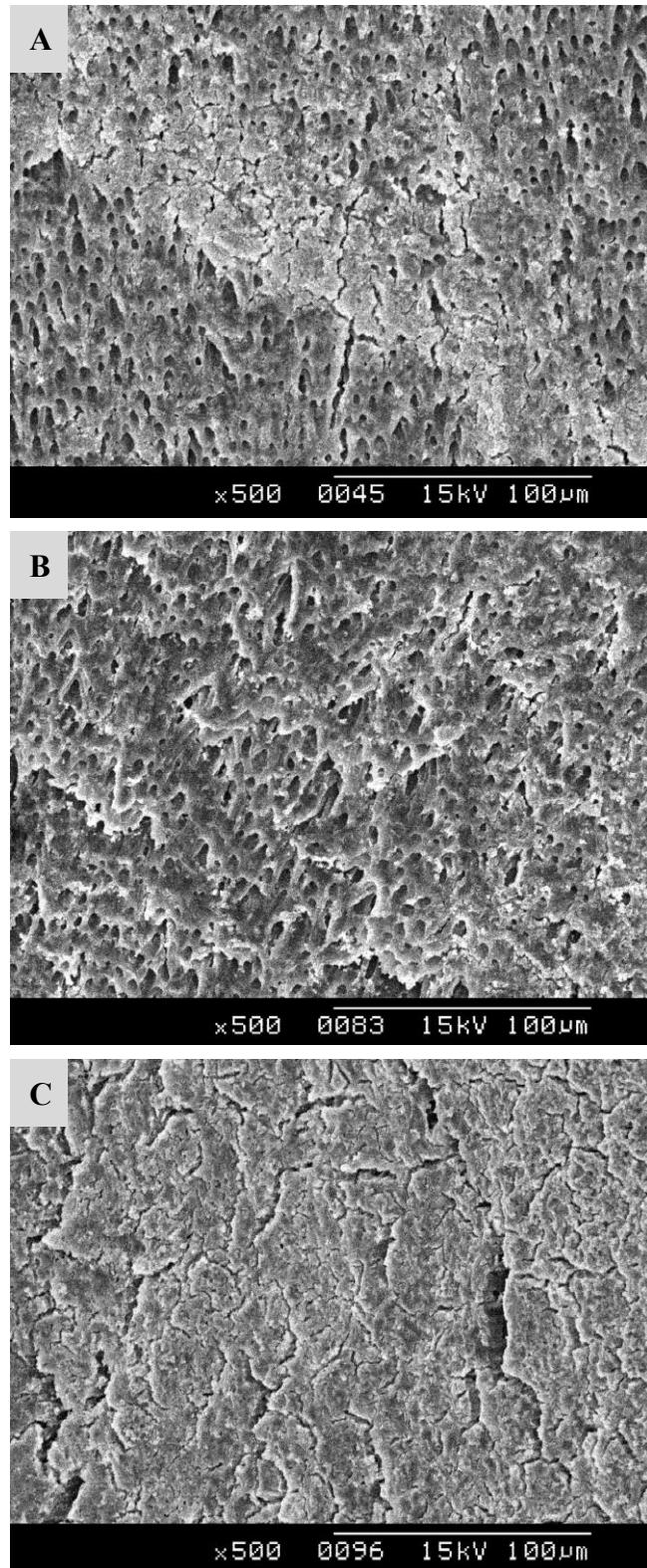


圖 24：在根管根尖處沖洗 0.05 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根上段 (A)、中段 (B)、下段 (C) 根管表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。

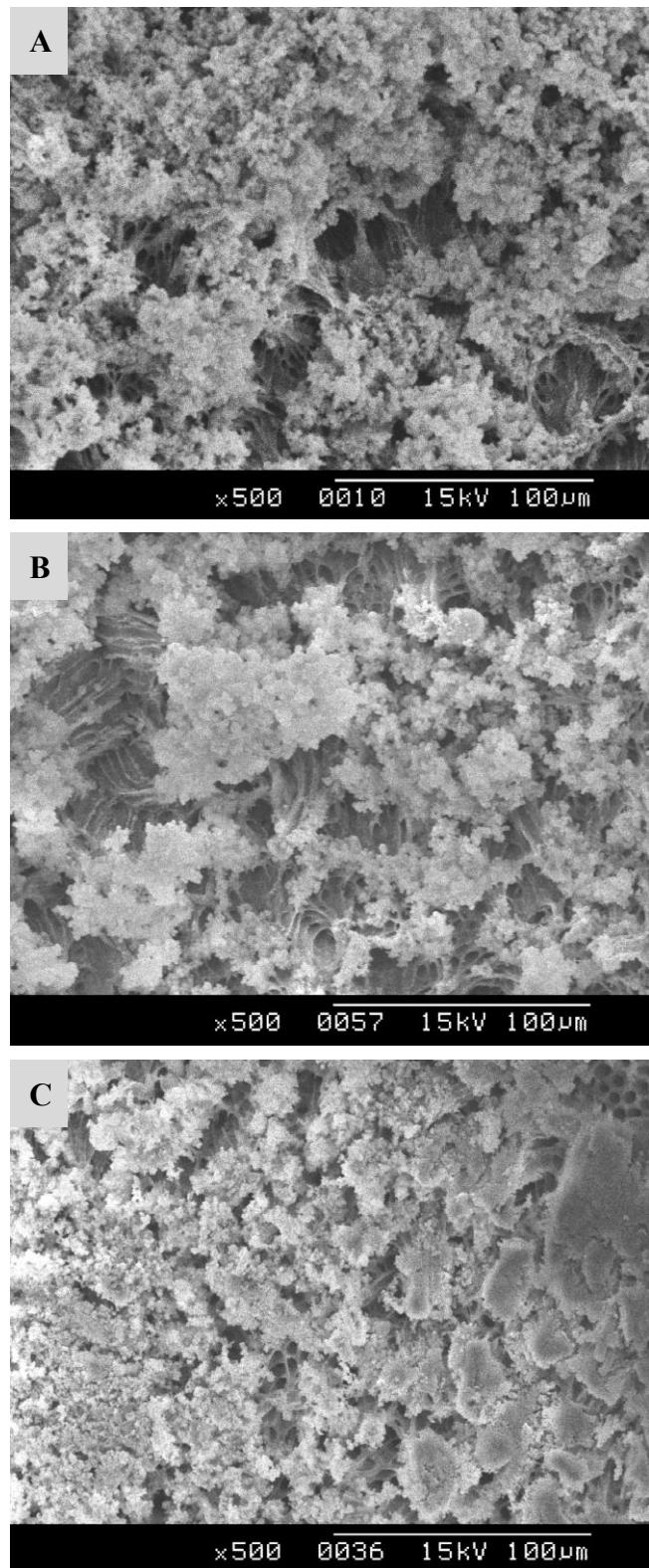


圖 25：在根管中段處沖洗 0.05 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根上段 (A)、中段 (B)、下段 (C) 根管表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。

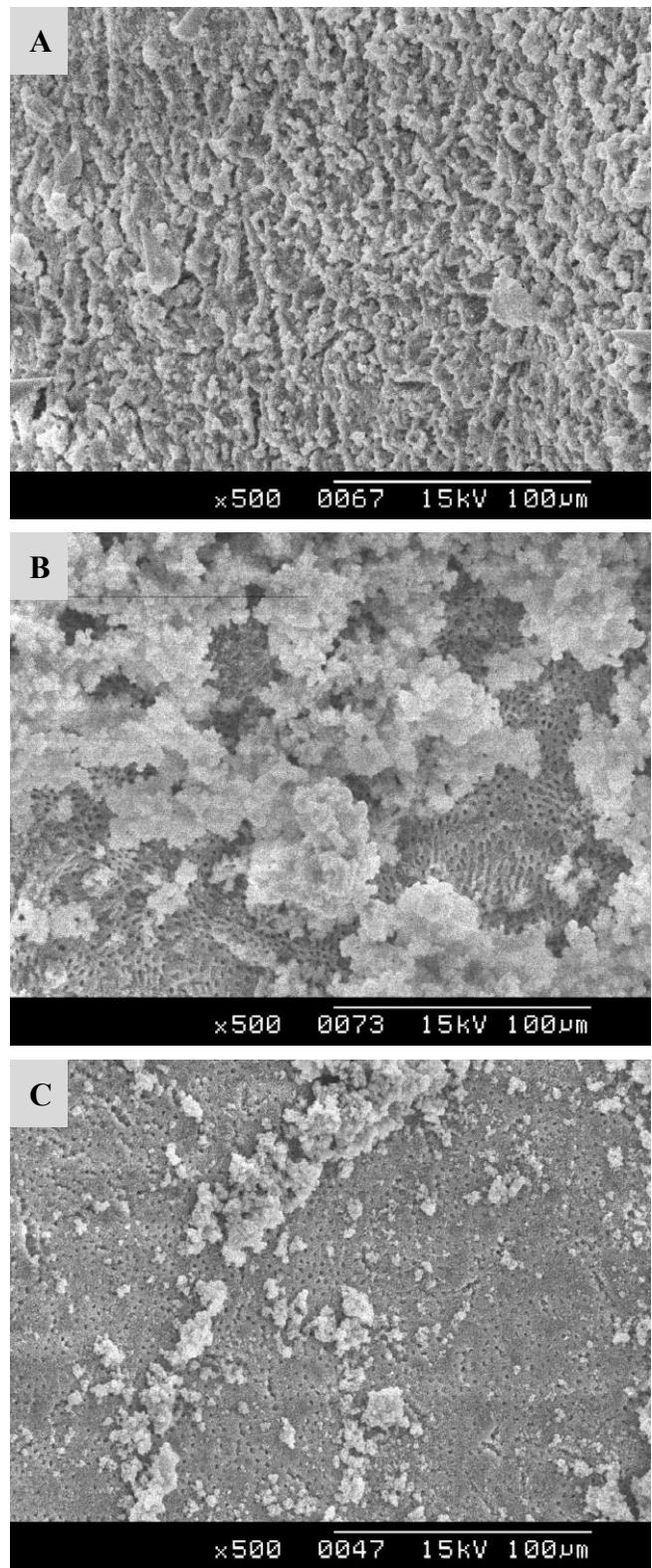


圖 26：在根管冠部處沖洗 0.05 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根上段 (A)、中段 (B)、下段 (C) 根管表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。

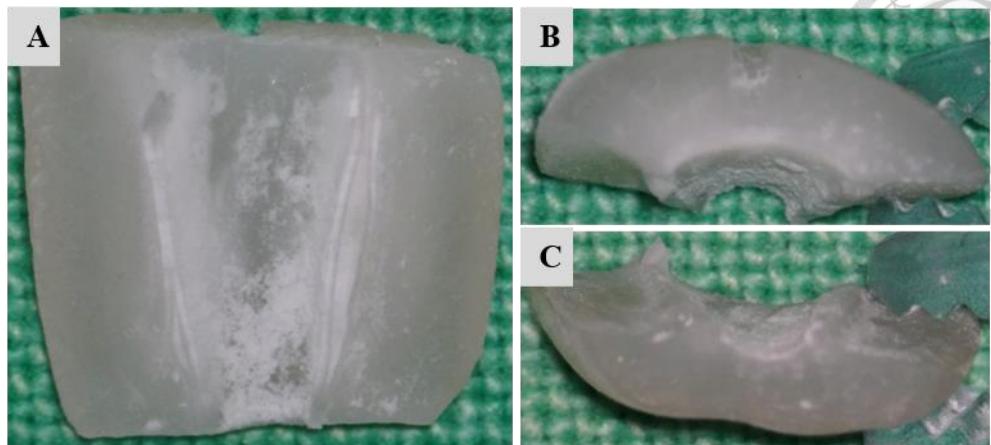
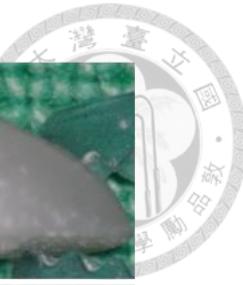


圖27：牙根根管樣本經0.7 M磷酸氫二鈉處理並於根管中段處沖洗0.05 M氯化鈣15分鐘，可見有明顯結晶沈積於牙本質表面。（A）縱切面觀；（B）、（C）剖斷面觀。

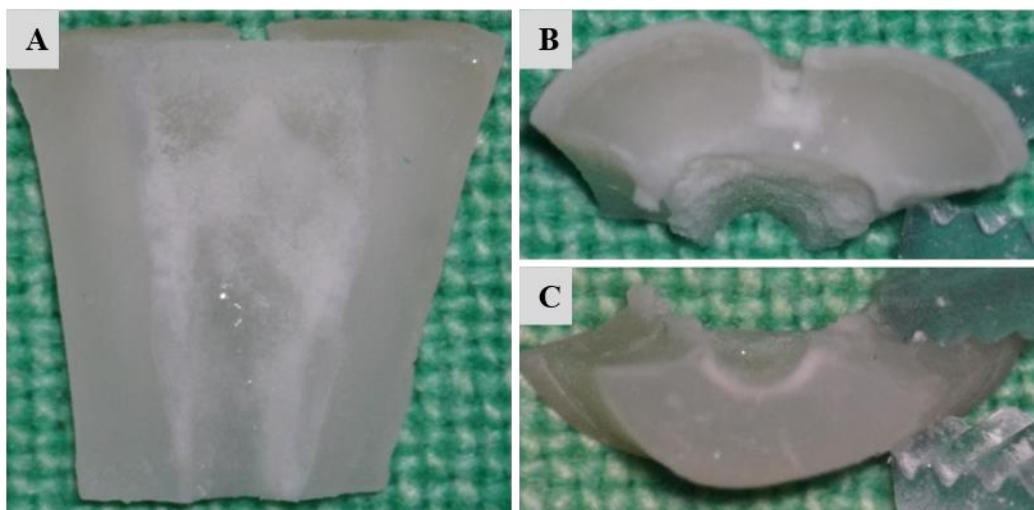


圖28：牙根根管樣本經0.7 M磷酸氫二鈉處理並於根管中段處沖洗0.1 M氯化鈣15分鐘，可見有明顯結晶沈積於牙本質表面。（A）縱切面觀；（B）、（C）剖斷面觀。

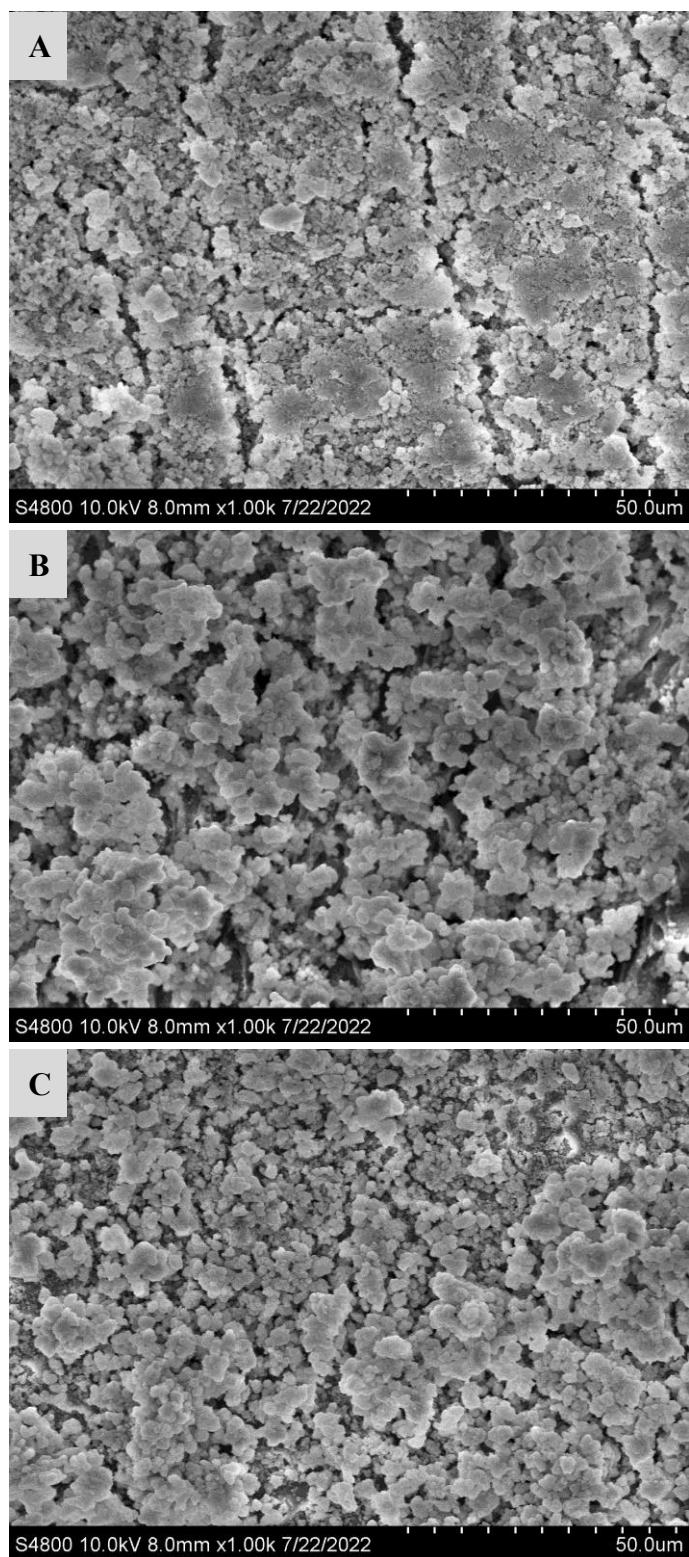


圖 29：在根管中段處沖洗 0.05 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根上段 (A)、中段 (B)、下段 (C) 根管表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。

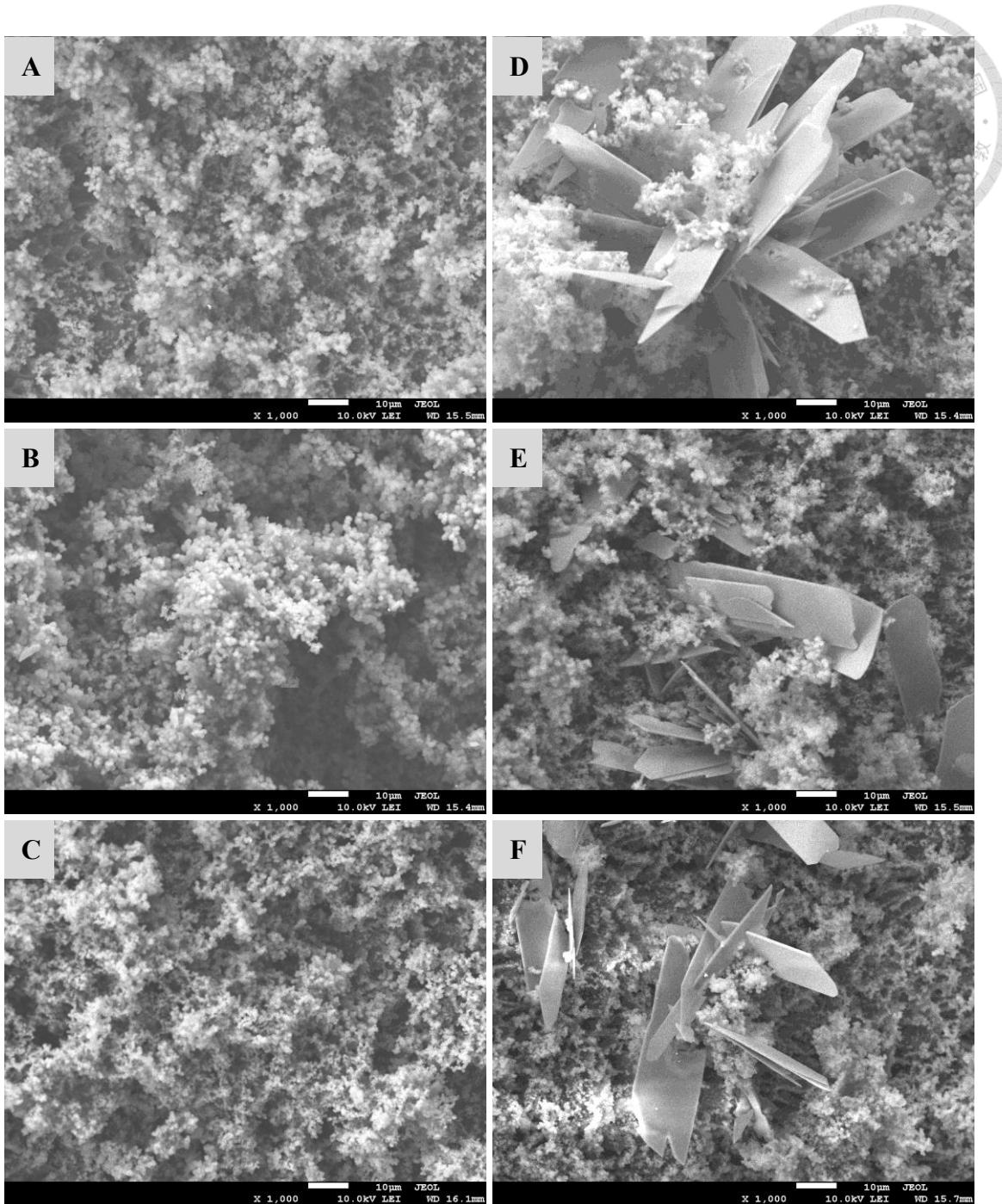


圖 30：在根管中段處沖洗 0.1 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根上段 (A、D)、中段 (B、E)、下段 (C、F) 根管表面形成磷酸鈣沈積物覆蓋情形。大部分區域之磷酸鈣沈積物呈現球狀結構形態 (左側圖)，少部分區域可在球狀結構中觀察到少量片狀晶體形成 (右側圖)。

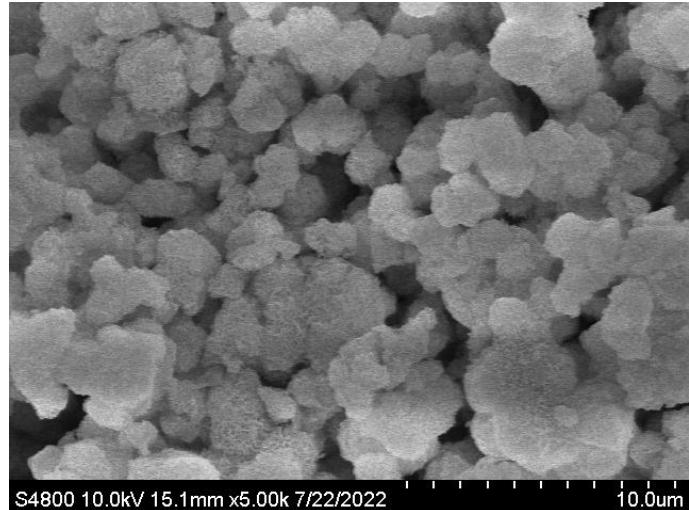


圖 31：在根管中段處沖洗 0.05 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根根管表面形
成磷酸鈣沈積物之球狀結構形態。

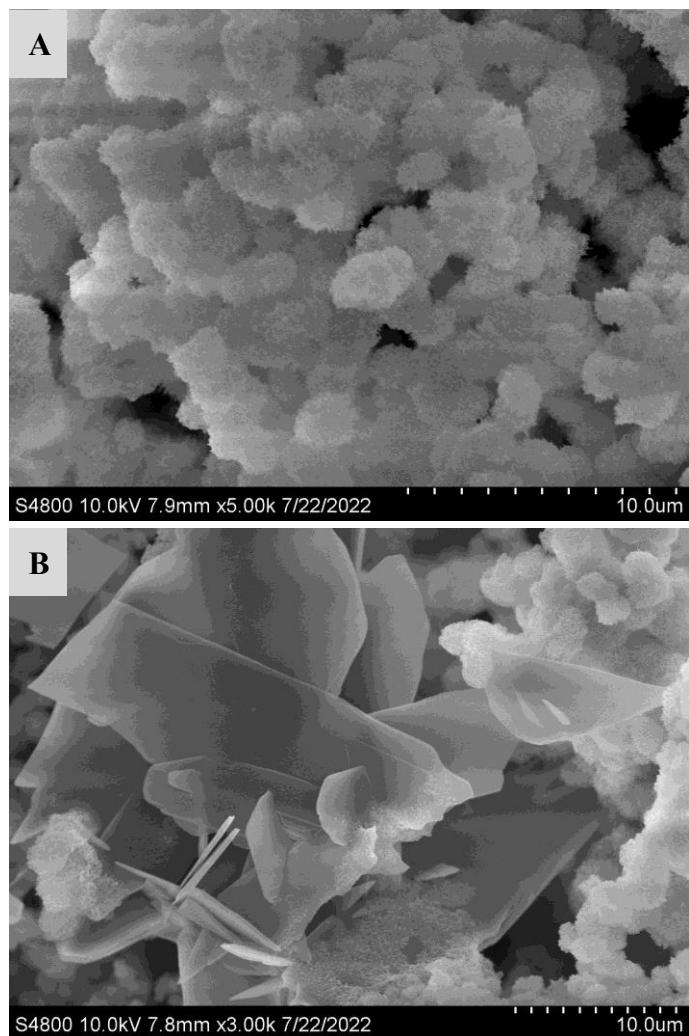


圖 32：在根管中段處沖洗 0.1 M 氯化鈣 15 分鐘，於牙根根管表面形
成磷酸鈣沈積物之球狀（A）、片狀（B）結構形態。

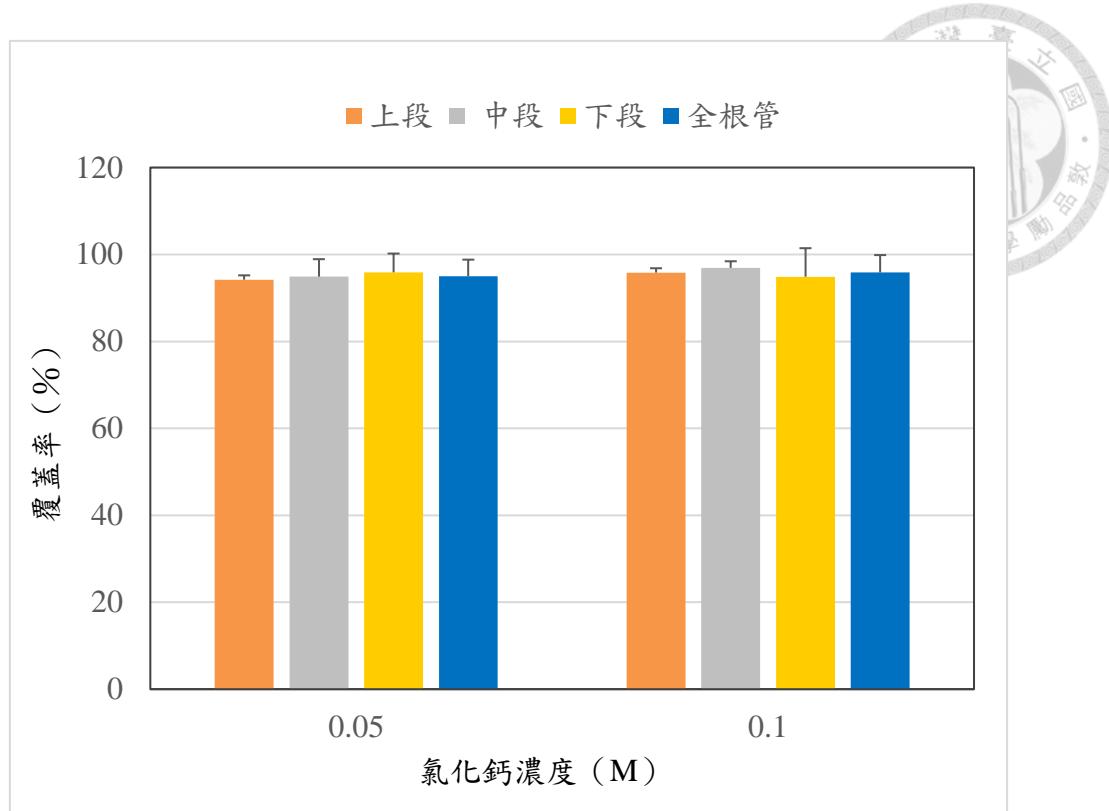


圖 33：不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙根根管表面上段、中段、下段磷酸鈣沈積物覆蓋率分析（平均值+標準差）。

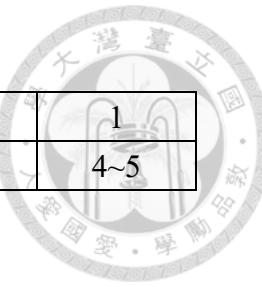


表 1：0.7 M 磷酸氫二鈉與不同濃度氯化鈣混合後之 pH 值

氯化鈣濃度 (M)	0.01	0.05	0.1	0.5	1
pH 值	8	7~8	7~8	6~7	4~5

表 2：不同氯化鈣濃度及反應時間於牙本質表面形成磷酸鈣沉積物之組成與晶體結構分析

氯化鈣濃度 (M)	反應時間 (min)	鈣磷比 (Ca/P)	晶面間距 (Å)	密勒指數 (h k l)
0.05	15	1.31	3.341	(0 0 2)
			2.742	(1 1 2)
			2.111	(3 1 0)
			1.848	(1 2 0)
	60	1.45	3.450	(0 0 2)
			2.753	(1 1 2)
			2.285	(3 1 0)
			1.800	(1 2 0)
0.1	15	1.39	3.377	(0 0 2)
			2.907	(1 2 1)
			2.189	(3 1 0)
			1.968	(2 2 2)
	60	1.47	3.408	(0 0 2)
			2.860	(1 2 1)
			2.364	(3 1 0)
			1.922	(2 2 2)



表 3：國際繞射資料中心 (ICDD) 之氫氧基磷灰石 (hydroxyapatite) 粉末
繞射主峰資料 (PDF : 84-1998)

繞射角度 (2θ)	晶面間距 (Å)	訊號強度 (f)	密勒指數 (h k l)
25.900	3.4372	35.9	(0 0 2)
31.790	2.8125	100	(1 2 1)
32.217	2.7762	52.3	(1 1 2)
32.922	2.7183	60.9	(3 0 0)
34.087	2.6281	21.2	(2 0 2)
39.822	2.2618	19.8	(3 1 0)
46.73	1.9423	27.9	(2 2 2)
49.526	1.839	30.5	(1 2 0)

ICDD : International Center for Diffraction Data



表 4：不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙本質表面磷酸鈣沈積物覆蓋率統計分析表

濃度 (M)	樣 本 數	平均值	標準差	95% 信賴區間		最小值	最大值
				下界	上界		
0.05	6	97.82	0.51	97.18	98.46	96.77	98.48
0.1	6	97.57	0.26	96.73	98.41	96.48	98.65

Mann-Whitney U test ; $\alpha=0.05$; P value=0.699

表 5：不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙本質表面磷酸鈣沈積物覆蓋厚度統計分析表

濃度 (M)	樣 本 數	平均值	標準差	95% 信賴區間		最小值	最大值
				下界	上界		
0.05	3	18.73	1.05	16.10	21.37	17.60	19.70
0.1	4	12.79	1.66	10.14	15.44	10.50	14.13

Mann-Whitney U test ; $\alpha=0.05$; P value=0.057



表 6：不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙根根管表面磷酸鈣沈積物覆蓋率統計分析表

濃度 (M)	樣 本 數	平均值	標準差	95% 信賴區間		最小值	最大值
				下界	上界		
0.05	6	93.39	4.84	92.80	98.96	87.56	98.62
0.1	6	95.88	1.44	89.56	97.23	90.28	98.19

Mann-Whitney U test ; $\alpha=0.05$; P value=0.240

表 7：不同氯化鈣濃度於反應 15 分鐘之牙根根管表面上段、中段、下段磷酸鈣沈積物覆蓋率統計分析表

濃度 (M)	位置	樣 本 數	平均 值	標準 差	95% 信賴區間		最小 值	最大 值	P value
					下界	上界			
0.05	上段		94.21	3.61	90.42	97.99	89.37	97.89	
	中段	6	94.90	4.02	90.69	99.12	89.09	99.67	0.796
	下段		95.90	4.32	91.37	100.43	87.30	99.24	
0.1	上段		95.84	2.46	93.25	98.42	92.16	98.73	
	中段	6	96.92	1.52	95.32	98.52	95.06	98.67	0.653
	下段		94.88	6.57	87.99	101.78	81.54	98.23	

Kruskal Wallis test ; $\alpha=0.05$