



中國醫藥大學  
牙醫學系碩士班  
碩士學位論文

評估氫氧化鈣對糞腸球菌的影響-臨床治療失敗的  
病例收集和實驗室分析

Effects of calcium hydroxide on *Enterococcus faecalis* in  
endodontic treatment failure cases - evaluation and analysis

指導教授：涂明君 副教授

共同指導教授：林靖婷 助理教授

研究生：廖宏修

中華民國一零二年六月

中國醫藥大學 牙醫學系碩士班

碩士班 學位考試

論文題目

中文：評估氫氧化鈣對糞腸球菌的影響-臨床治療失敗的  
病例收集和實驗室分析

英文：Effects of calcium hydroxide on Enterococcus  
faecalis in endodontic treatment failure cases –  
evaluation and analysis

本論文係 廖宏修 於中國醫藥大學牙醫學系  
碩士班完成之碩士論文，經考試委員審查及口試合  
格，特此證明。

考試委員

楊淑芬

吳禮亨

李如

吳翠雲

林瑋

所長：

李如

中華民國 102 年 06 月 19 日

## 摘 要

根管治療有相當高的成功率，但是偶發的失敗病例常常造成牙醫師和病患的痛苦和壓力，而糞腸球菌在失敗的病例中有很高的機會被分離出來，本研究企圖加入氫氧化鈣作為根管內敷藥來減少根管中糞腸球菌的數量以增加根管治療的成功率。

第一階段以氫氧化鈣分別和糞腸球菌、變異鏈球菌和綠膿桿菌做抗性分析比較；第二階段從根尖病變的病例沾取細菌樣本，分析其菌種並以氫氧化鈣做治療，追蹤其根管治療後的預後情形；第三階段將臨床分離出來的樣本於口外牙齒容器中培養，再進行氫氧化鈣的抗性分析。

第一階段的實驗結果發現氫氧化鈣對綠膿桿菌有很大的殺傷力；對糞腸球菌和變異鏈球菌也有殺菌效果，但是從兩者的存活率來看，其效果並無顯著的差異。第二階段的實驗結果發現十組有根尖病變且經過氫氧化鈣處理的病例，有五組治療是有效果的，其根尖病兆縮小或消失；有四組治療無效果，病兆持續；有一組因為觀察期太短，持續追蹤。第三階段的結果顯示十組的病例有七組有自根管分離出細菌，其中有六組為糞腸球菌。綜合以上鑑定結果和抗性分析，發現糞腸球菌確為根管治療失敗的主要元兇；而氫氧化鈣對它們的殺菌效果是顯著的。

## Abstract

Although endodontic treatment has a high success rate, but the failure cases cause pain and stress in dentists and patients. The *Enterococcus faecalis* usually isolate from the canals of endodontic failure cases. The objective of this study is to use calcium hydroxide in canals to decrease the quantity of *Enterococcus faecalis* and level up the success rate of treatment. Evaluation and analysis the bacteria samples isolating from the canal of failure cases.

The first stage is to evaluate the calcium hydroxide antimicrobial effect on *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* and *Pseudomona aeruginosa*. The second stage is to use calcium hydroxide treat failure cases and isolate the bacterial samples from root canals. The third stage is to analysis the calcium hydroxide antimicrobial effect on the isolated bacterial samples in ex vivo experiment.

The first stage results show calcium hydroxide has effective antimicrobial ability to *Pseudomona aeuginosa*; moderate antimicrobial ability to *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*.the second stage results show there are total ten failure endodontic cases which accepted endodontic retreatment and calcium hydroxide dressing. Five of ten are successful; four of ten are failure and one of ten are invalid because of the short follow time. The third stage results show there are seven cases we can isolate the bacterial samples. Six of seven are *Enterococcus faecalis* (via 16sRNA). We think *Enterococcus faecalis* is the main cause of failure cases and calcium hydroxide is antimicrobial effective to them in ex vivo experiment.

# 致謝

距離大學畢業已經有五年的时间，兩年前在診所林明毅醫師的鼓勵下報考了中國醫學大學的牙醫研究所，就此開始了我兩年研究所的日子，由衷的感激林醫師，否則我一定錯過這段人生難得的旅程。由於是以臨床醫師的身份來進修，必須在學業和診所的臨床工作上兩頭燒的情況下完成論文。

感謝涂明君老師兩年來的指導，不只是學術上的問題，臨床醫療方面也給予我很多的幫助，讓我對根管治療有更深刻的了解跟體認，希望老師您能永遠這麼有活力；感謝林靖婷老師的幫助，一般只從事臨床工作的我做起實驗來實在笨拙地可以，好在老師從不因此而發脾氣，在論文的修稿上更是給予我莫大的幫助，希望您事事順心、心想事成。

在此感謝黃恆立老師、許瑞廷老師的寬容與包含，常常為了我們的方便而更改上課的時間，否則我們大家的學分大概都修不滿吧！上課對於我們這些工程白癡也是不厭其煩的講解，其實我現在還是不知道那些東西到底在說什麼，實在愧對老師的苦心阿！



感激蕭裕源老師、張哲壽老師每周三特別自台北趕來台中的熱心指導，有您們的經驗傳授與修正，讓我的論文少走了很多彎路；感謝賴志河老師、林殿傑老師的課程教學，讓我對微生物和生醫材料有更深入的認識。

感謝口試委員楊淑芳老師、黃翠賢老師和吳禮字老師的蒞臨指導，讓我知道自己的論文還有很多需要修正和改進的地方，老師們的用心閱讀和細心校正讓我對做學問的態度有更深的認識。

感謝實驗室的小喬學長和義閔學姊，太多的實驗都是靠你們的幫忙；感謝系辦的雨潔和幸順，繁瑣的行政工作都是靠你們搞定；感謝中國附醫和民康診所同事的配合，讓兩年來的忙碌生活能熬得過來，特別感謝一職陪伴在我身邊的女友室瑋，能包容我報告前的焦慮和崩潰的情緒，沒有妳我可能早就休學了。

一本論文的完成要感謝的人好多，不如就謝天吧！感謝命運讓我們在彼此的生命相逢，感謝你們無私的幫助與照顧，希望未來的日子大家都能平安、幸福！

宏修

# 目錄

## 第一章 前言

|                 |    |
|-----------------|----|
| 1-1 研究背景        | P1 |
| 1-2 根管治療成功的要素   | P4 |
| 1-2.1 何謂根管治療    | P4 |
| 1-2.2 氫氧化鈣的作用   | P5 |
| 1-2.3 三氧化礦物的作用  | P6 |
| 1-2.4 塗抹層的作用    | P6 |
| 1-2.5 根管治療的成功與否 | P7 |
| 1-2.6 如何重新治療    | P8 |
| 1-3 研究的動機       | P8 |
| 1-4 研究的目的       | P9 |

## 第二章 材料與方法

|                 |     |
|-----------------|-----|
| 2-1 研究流程圖       | P10 |
| 2-2 口外牙齒容器的製作   | P10 |
| 2-3 氫氧化鈣的作用時間測試 | P11 |

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| 2-4 比較三種不同的根管內細菌對氫氧化鈣的反應 | P11 |
| 2-5 臨床病例的收集和分析           | P12 |
| 2-5.1 篩選病例               | P13 |
| 2-5.2 臨床治療步驟             | P13 |
| 2-6 實驗室分析                | P14 |
| 2-7 三氧化礦物抗菌分析            | P15 |
| 第三章 結果                   |     |
| 3-1 不同根管內細菌對氫氧化鈣的抗性分析    | P17 |
| 3-2 氫氧化鈣隨著時間 pH 值的變化     | P17 |
| 3-3 三氧化礦物(MTA)的抗菌性       | P18 |
| 3-4 臨床的病例收集和分析           | P18 |
| 3-4.1 臨床的病例收集            | P18 |
| 3-4.2 病例整理與細菌分析          | P25 |
| 3-5 臨床分離株在牙齒容器中的表現       | P26 |
| 第四章 討論                   | P27 |
| 4-1 糞腸球菌在試管中的表現          | P28 |



|                      |     |
|----------------------|-----|
| 4-2 氫氧化鈣隨著時間 pH 值的變化 | P28 |
| 4-3 臨床的病例分析          | P29 |
| 4-4 臨床分離株在牙齒容器中的表現   | P32 |
| 4-5 三氧化礦物的抗菌性分析      | P32 |
| 第五章 結論               | P34 |
| 第六章 未來工作             | P35 |
| 參考文獻                 | P72 |



# 表目錄

|      |                    |     |
|------|--------------------|-----|
| 表一   | 氫氧化鈣與三氧化礦物的抗菌性比較   | P37 |
| 表二   | 十組病例的資料整理          | P38 |
| 表三 A | 臨床分離株在潮濕牙齒容器中的生長情形 | P39 |
| 表三 B | 臨床分離株在乾燥牙齒容器中的生長情形 | P40 |



# 圖目錄

|        |                         |     |
|--------|-------------------------|-----|
| 圖一     | 橡皮障防濕工具                 | P43 |
| 圖二     | 清潔和修形的過程和目標             | P44 |
| 圖三     | 電子顯微鏡下比較塗抹層移除前後的差別      | P45 |
| 圖四     | 有無移除塗抹層和有無使用藥物處理比較圖片    | P46 |
| 圖五     | 臨床上收集的病例                | P47 |
| 圖六     | Protaper 修形工具           | P48 |
| 圖七     | 牙齒容器的製作                 | P49 |
| 圖八(A)  | 三種細菌在培養皿中與氫氧化鈣接觸三十分鐘的結果 | P50 |
| 圖八(B)  | 三種細菌在培養皿中與氫氧化鈣接觸五分鐘的結果  | P51 |
| 圖九     | 氫氧化鈣隨著時間 pH 值的變化        | P52 |
| 圖十     | 臨床治療步驟流程                | P53 |
| 圖十一    | 病例一 治療 X 光片             | P54 |
| 圖十二    | 病例二 治療 X 光片             | P55 |
| 圖十三    | 病例三 治療 X 光片             | P56 |
| 圖十四(A) | 病例四 治療 X 光片             | P57 |
| 圖十四(B) | 病例四 檢體塗盤                | P58 |

|        |                     |     |
|--------|---------------------|-----|
| 圖十四(C) | 病例四 術中照片            | P59 |
| 圖十五(A) | 病例五 治療 X 光片         | P60 |
| 圖十五(B) | 病例五 檢體塗盤            | P61 |
| 圖十六(A) | 病例六、七 治療 X 光片       | P62 |
| 圖十六(B) | 病例六、七 檢體塗盤          | P64 |
| 圖十七(A) | 病例八、九 治療 X 光片       | P65 |
| 圖十七(B) | 病例八、九 檢體塗盤          | P67 |
| 圖十八(A) | 病例十 治療 X 光片         | P68 |
| 圖十九    | 七種臨床分離株的 16sRNA 鑑定圖 | P71 |



## 縮寫表和說明

1. *E.f* : *Enterococcus faecalis*，格蘭氏陽性菌，兼性厭氧菌，在有病變的根管中被分離出來的機會非常大，為本篇論文的主角。
2. *S.mutans* : *Streptococcus mutans*，鏈球菌，格蘭氏陽性菌，兼性厭氧菌，為造成人類齲齒的主要病原菌，經由代謝多種醣類而產生酸，腐蝕牙齒表面物質，並且能在酸性環境生長。
3. *PA01* : *Pseudomonas aeruginosa*，綠膿桿菌，好氧，格蘭氏陰性菌，只有單向的運動性，分泌多種色素，曾經在有病變的根管中被分離出來。
4. GG drill : Gates Glidden Drill，用來修形根管的冠狀部(coronal third)和中間部(middle third)。
5. EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid，乙二胺四乙酸，用於移除牙本質的塗抹層，讓氫氧化鈣和次氯酸鈉更能有效的作用於牙本質小管。
6. MTA : Mineral trioxide aggregate，三氧化礦物，用於修補根管穿孔以及根尖逆充填手術。
7. BHI : Brain heart infusion broth，培養細菌生長的營養液。
8. paper point : 紙針，用於吸取根管中液體。
9. K file、H file : K 型根管銼、H 型根管銼針。

10. PBS：生理緩衝液。





# 第一章 前言

## 1-1 研究背景

人體的口腔中正常菌種約有 500~700 種，這些菌落有些可能因為蛀牙、斷裂等原因進入到牙髓中而造成齒內感染(Siqueira and Rocas 2008)。

由於生存環境時常劇烈的改變，細菌在口內需要面臨許多競爭或是合作，例如：造成牙周病的細菌和造成蛀牙的細菌所喜歡的生存環境就有明顯的不同，因此常看到有嚴重牙周病的患者口內卻無發現蛀牙；而造成蛀牙前期的細菌再深入牙齒的時候，也能面臨缺乏氧氣和營養來源的問題而無法生存。

適合在根管內生存的細菌需要有幾樣特性，首先要能適應氧氣缺乏的環境，再來要能適應營養來源只能從根尖組織和牙齒根管獲得，要能夠在這樣養分缺乏的環境生存，他們要衍生出不同的構造和生存機制，生物膜(biofilm)的形成便是不同細菌共同努力要在根管內存活的例子。

糞腸球菌(*Enterococcus faecalis*)是我們主要要探討的主角，它屬於革蘭氏陽性 [Gram(+)]、兼性厭氧菌(facultative anaerobe)的一種，為消化道和尿道中的正常菌種。

可以生長在攝氏 10 度至 45 度的範圍中，體型小，直徑大約只有

0.5~1.0 $\mu$ m，可以入侵至牙本質小管較深處的地方形成生物膜，附著在牙本質小管的膠原蛋白上，躲過機械性修形擴大和化學性藥劑沖洗，造成治療上的困難，我們認為和根管治療的失敗有莫大的關係 (Stuart, Schwartz et al. 2006)。

此外，即使在營養缺乏的環境中也可以以休眠的狀態存活，實驗證明他們可以在已經封填完成的根管內存活六至十二個月，一旦有了養分供應依舊可以恢復其活性(Dahlen, Samuelsson et al. 2000)。

另外，由於它是屬於消化道的正常菌種，所以他可以存活在高鹼性的環境中，這對於我們常使用氫氧化鈣來消毒根管的治療有很大的影響，氫氧化鈣可以藉由氫氧根離子的釋放，使細菌的酸鹼狀態失去平衡，對磷脂質、細胞膜以及DNA進行破壞，而達到殺菌的效果；但是在臨床治療上，氫氧化鈣對大多數的菌種有良好的抗菌性，但對糞腸球菌的效果卻強差人意(Delgado, Gasparoto et al. 2010)，經常在許多根管治療失敗的研究中(Williams, Trope et al. 2006) (Rocas, Siqueira et al. 2004) 都可以發現它的蹤跡；同時在許多有根尖病變(apical lesion)的根尖周圍炎(apical periodontitis)也被廣泛討論，目前認為它是根管治療失敗的一大元凶，因此了解它的致病因子、生存環境、以及如何消滅它對我們將來在根管治療的成功率上有相當的幫助，因此許多根管內敷藥的抗菌能力都是以它為主角(Han, Park et al. 2001,

Portenier, Waltimo et al. 2005, Schafer and Bossmann 2005)。

變形鏈球菌，*Streptococcus mutans*，格蘭氏陽性菌，兼性厭氧菌，為造成人類齲齒的主要病原菌，經由代謝多種醣類而產生酸，腐蝕牙齒表面物質，並且能在酸性環境生長。此外，也經常在受感染的根管中被發現(Dahlen, Samuelsson et al. 2000)，亦有實驗指出它是造成根尖牙周炎的最主要元兇(Jiang, Hoogenkamp et al. 2011)，常常被用來與糞腸球菌做抗菌性比較(Kreth, Kim et al. 2008)，因此我們選擇它作為本研究中的第二支標準菌株來和糞腸球菌比較。

綠膿桿菌，*Pseudomonas aeruginosa*，好氧，格蘭氏陰性菌，只有單向的運動性，分泌多種色素，曾經在有病變的根管中被分離出來(Siqueira and Rocas 2008)，由於它是嗜氧性桿菌，本研究選擇它作為第三支標準菌株來和前面兩隻兼性厭氧格蘭氏陽性球菌做區分。

綜合以上，本篇主要是探討三種曾經在文獻中被討論的標準菌株(糞腸球菌，變形鏈球菌，綠膿桿菌)對氫氧化鈣的抗性差異(Siqueira and Rocas 2008)，以及在臨床上有根尖病變的根管中所分離出來的糞腸球菌對氫氧化鈣的抗性研究以及實驗室分析。

## 1-2 根管治療成功的要素

藉由根管系統的徹底清潔與適當擴大、根管系統的消毒以及整體流程的感染控制〔橡皮障(圖一)的應用〕、根管系統的精密封填、治療後完善的牙冠密合度以避免唾液和口內細菌的侵入(Sjogren, Figdor et al. 1997)、以及患者自己的免疫系統能力來癒合，如果可以達到以上這些要素，我們可以大幅提升根管治療的成功率。

### 1-2.1 何謂根管治療

清潔(cleaning)和修形(shaping)是根管治療成功的基本要求，達到清潔乾淨並且給予根管適合接受封填的外型(如圖二)，是對減少根管中的微生物是非常有效率的方法。

清潔表示從根管中移除所有感染物質，包含牙髓組織、細菌及其產物、牙髓石、受感染的齲齒、汙染性的根管封填材料和其他引起發炎的物质、這些感染物質都可以藉由物理性器械(Matoss Neto, Santos et al. 2012)和化學性藥劑來清潔他們(Evans, Davies et al. 2002)。

修形則是創造特殊的髓腔形狀以方便根管封填，需要包含五個需求：

- a. 建立從根尖到冠部連續變寬的錐狀根管
- b. 在根尖結束的位置以最小直徑建立非常小的開口

- c.將彎曲根管分成三個部分：冠狀部(coronal third)、中間部(middle third)、根尖部(apical third)分別做修形
- d.不可以改變根尖孔洞的位置
- e.在器械操作期間盡可能保持最小的根尖孔洞

## 1-2.2 氫氧化鈣的作用

氫氧化鈣由於它的生物相容性和殺菌能力，因此為目前根管治療中最常使用的藥物(Kayaoglu, Omurlu et al. 2011)。由於高鹼性的特性可以溶解有機物質，使細菌的內毒素(endotoxin)失去活性，還可以吸收根間滲出液，創造有利於組織癒合的條件(Atila-Pektas, Yurdakul et al. 2013);而它的殺菌能力是建立在釋放出氫氧根離子(OH<sup>-</sup>)以提升pH值來破壞細胞膜和蛋白質結構使細菌無法生存(Siqueira and Lopes 1999, Fulzele, Baliga et al. 2011)，進一步促進硬組織的形成，由於有殺菌、抗發炎、促進組織鈣化的好處，氫氧化鈣廣泛被應用在如覆髓、根管治療、創傷齒處理或根尖成形術時的根管內置藥。

在抗菌方面，氫氧化鈣並不是對所有的根管內細菌都有效(Gomes, Ferraz et al. 2002)有學者以不同濃度的氫氧化鈣對不同種類的細菌作測試，發現濃度越高時殺菌效果也越好，但是 40%和 50%並沒有統計上的差異，而效果最好的為 60%、50%和Ultracal (35%但混合了aqueous methylcellulose)，因此除了濃度我們也懷疑配合著使



用的混合物使否對藥物的作用也有很大的影響，本實驗採用 50%濃度的氫氧化鈣來做研究。

### 1-2.3 三氧化礦物的作用

三氧化礦物在臨床上我們藉由它在潮濕的環境中(血液，組織液)依舊能夠完美聚合的特性來使用它來修補根管破洞已及根尖手術後的逆充填(Fulzele, Baliga et al. 2011)，在聚合的時候也會如同氫氧化鈣般釋放出氫氧根離子來達到抗菌的效果，因此我們也使用三氧化礦物來和糞腸球菌(ATCC 29212)來進行抗菌性分析，來觀察三氧化礦物是是否如同氫氧化鈣般對糞腸球菌有殺菌效果。

### 1-2.4 塗抹層的作用

塗抹層(Smear layer)為牙本質被器械切割摩擦後形成的物質，裡面包含磨碎的牙本質和牙髓組織殘餘物以及少量的細菌(如圖三所示)，它會導致牙本質小管開口(dentinal tubule orifices)的阻塞，可減少牙本質的穿透度達25~30%，如果移除塗抹層，根管內敷藥的藥效較能擴散到根管的牙本質，可以增加抗菌的效果(Lui, Sae-Lim et al. 2004)，因此以EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)做最後的沖洗液，可以完全移除塗抹層，使根管充填更加緻密；然而近來有研究指出(Yang, Cha et al. 2006)，溶解掉塗抹層反而會使細菌更加深入，穿透至鄰近的牙本質來降低治療的成功率；而未移除塗抹層的組別，細




菌只會見於牙本質的表面，所以完整的塗抹層可以增加細菌的附著和穿透的難度(如圖四所示)。

### 1-2.5 根管治療的成功與否

在根管治療完成後，如果我們在臨床上或是 X 光片上發現到某些症狀，我們會建議重新根管治療，以達到較佳的預後。

若有以下的臨床症狀，我們便會判定根管治療是不成功的：(Ng, Mann et al. 2011)

- 
- a. 持續性的著述不適
  - b. 常有膿包或腫脹出現
  - c. 敲診或觸診皆有不適,
  - d. 持續性的牙周破壞且牙齒動搖
  - e. 無法用牙齒去咀嚼

而在 X 光片下觀察到以下症狀,我們也判定治療是不成功的：

- a. 增厚的牙周膜寬度(lamina dura)
- b. 放射線透射區(radiolucent area)無修復現象或是更加擴大
- c. 原本沒有，但是治療後出現放射線透射區(radiolucent area)
- d. 明顯的空洞或是未封填到的根管空間(under filling)
- e. 持續性的根尖吸收狀況(root resorption)

## 1-2.6 如何重新治療

重新根管治療有幾個步驟：

- a. 移除舊有的封填材料
- b. 重新擴大修形
- c. 2.5~5.25% 次氯酸鈉沖洗
- d. 建議置放氫氧化鈣兩周以上
- e. 假如沒有臨床症狀，予以根管封填

重新治療的成功率取決於是否將微生物等汙染物質清潔乾淨，封填的緻密度和封填的長度是否適當。

## 1-3 研究的動機

在許多根管治療失敗的病例中，臨床上會使用氫氧化鈣加強根管內的清潔效果，以希望能增加根管治療成功的機率，但是在治療失敗的病例裡，卻經常發現糞腸球菌的蹤跡，本實驗想了解

1. 氫氧化鈣對糞腸球菌、變形鏈球菌及綠膿桿菌的殺菌能力是否有所差別
2. 藉由實驗室分析和 X 光片觀察追蹤來了解使用氫氧化鈣是否能提高根管治療的成功率。

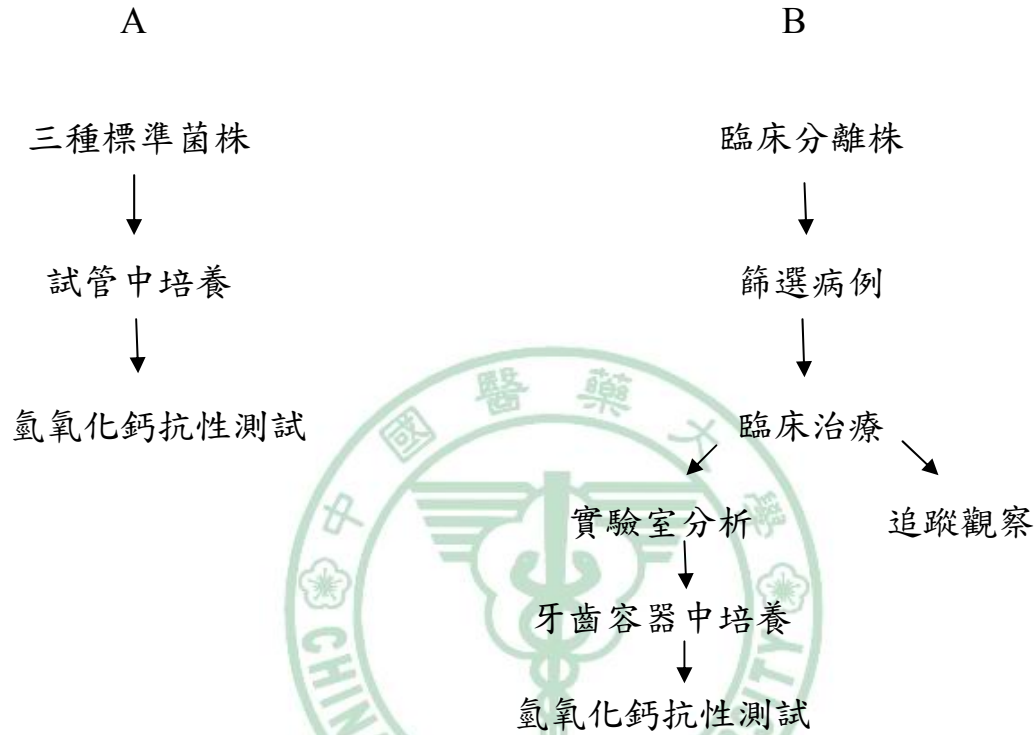
## 1-4 研究的目的

本篇的主要研究目的如下列：

- a. 比較氫氧化鈣對糞腸球菌，變異鏈球菌，和綠膿桿菌三種細菌的抗菌性。
- b. 觀察臨床分離株對氫氧化鈣處理前後的差別
  - b-1. 於口外實驗中，以臨床分離株分別培養於配製好的牙齒中，置入氫氧化鈣，觀察糞腸球菌的存活率是否高於其他兩種細菌。
  - b-2. 於臨床上，比較氫氧化鈣的置放前後，牙齒中糞腸球菌的量是否有所差異，並且持續觀察病人的 X 光片追蹤根尖病兆是否縮小或消失。

## 第二章 材料與方法

### 2-1 研究流程圖



### 2-2 口外牙齒容器的製作

→收集單牙根牙齒，從根尖往上 15 公厘處做記號，以鑽石鑽針

(diamond bur)切除

→以 10 K 型根管銼針(K file)、15 K 型根管銼針(K file)，確定能穿

過根間孔

→以電力驅動鎳鈦合金(NiTi rotary system) Protaper 系統依序由

S1、S2、F1、F2 進行擴大及修形(見圖六)

→根尖孔區以樹脂封閉

→牙齒周圍以環氧樹脂(epoxy resin)封閉

→以高溫高壓蒸氣消毒

(如圖七所示)

## 2-3 氫氧化鈣的作用時間測試

以 400 毫克的氫氧化鈣加蒸餾水達到 800 微升，配製濃度為 50% 的氫氧化鈣溶液，與隔夜培養的菌液以 1:1 的比例混合後，在特定的時間於 pH 儀底下測試其鹼度的變化，藉此推斷臨床上應該置放多久才能達到理想的殺菌效果。

## 2-4 比較三種不同的根管內細菌對氫氧化鈣的反應

實驗會分為在試管內和在牙齒內兩個部分

### A. 試管內

- a. 將三種細菌分別放至 3 ml BHI 溶液中培養 16 小時
- b. 將此前一天配製的 BHI 菌液取 20  $\mu$ L 加至 3 mL BHI 菌液
- c. 將 50% 的氫氧化鈣與稀釋過的菌液 1:1 混合，分別反應五分鐘和三十分鐘
- d. 進行序列性稀釋，並進行塗盤。

## B.牙齒內

- 將牙齒送入高壓滅菌鍋作無菌消毒
- 將消毒過的牙齒容易以 EDTA 做處理
- 將三種細菌置入牙齒容器中培養 7 天 (牙齒中充滿 BHI 營養液)
- 以紙針置入根管中沾取細菌，於 BHI 培養皿中做第一次細菌培養 (S1)
- 將氫氧化鈣置入牙齒容器中 7 天
- 將氫氧化鈣移除，以紙針置入根管中沾取細菌，於 BHI 培養皿中做第二次細菌培養 (S2)
- 將已經移除氫氧化鈣的牙齒放至七天 (保持乾燥)
- 以滴管吸取生理食鹽水，沖洗後回抽，於 BHI 培養皿中做第三次細菌培養 (S3)

## 2-5 臨床病例的收集

可以分成三個步驟

- 篩選病例
- 臨床治療步驟
- 實驗室分析



## 2-5.1 篩選病例：

從中國附醫根管科就診的病人中，選取在根尖片(periapical film)下，根尖病變大於 1mm x 1mm 以上的病例來做分析。(如圖五)

## 2-5.2 臨床治療步驟

- a. 如果牙齒曾接受過根管治療，移除舊有的馬來膠：以 GG drill、H file、K file 搭配尤加利油，移除舊有污染的馬來膠，使 file 可以穿過根尖狹窄區(apical constriction)，再以生理食鹽水充滿牙髓腔一分鐘，接著以紙針置入根管腔中沾取作為第一次樣本(S1)
- b. 如果牙齒從未接受過根管治療，則在根管開擴後以生理食鹽水充滿牙髓腔一分鐘，接著以紙針沾取作為第一次樣本(S1)
- c. 修形與擴大：以手動 protaper 系統進行操作，依序為 Sx、S1、S2、F1、F2，期間每換一次器械就以 NaOCl 進行沖洗。
- d. 第二次收集樣本：此時以紙針置入根管內至根尖處，置放一分鐘後取出，放至收集瓶。(S2)
- e. 置放氫氧化鈣：將針頭置入離根尖 1mm 處，把氫氧化鈣擠出，回填至根管入口。
- f. 第三次收集樣本：根據病人配合情形，一周或兩周後回診，以 file 和次氯酸鈉移除氫氧化鈣，接著使用生理食鹽水充滿根管一分鐘，同樣以紙針置入根管內至根尖處，放至收集瓶。(S3)

g. 根管封填

h. 回診觀察：期間為一個月、三個月、六個月、一年請病人回診拍攝根尖片，觀察根尖病變是否縮小或消失。

## 2-6 實驗室分析

a. 菌種分離：每個病例會有三組樣本

第一次為進行牙髓腔開擴後,沒有經過任何物理或化學性的治療

介入前索取的樣本(S1)

第二次為物理和化學性治療後,但在氫氧化鈣置入前取的樣本

(S2)

第三次為氫氧化鈣置入後一周要封填前所取的樣本(S3)

並以特殊球菌培養皿及微生物方法分離出糞腸球菌

接著比較前中後三組的序列或是菌量是否不同。

b. 牙齒容器配製

c. 氫氧化鈣抗性比較：

→將牙齒送入高壓滅菌鍋作無菌消毒

→將分離出的菌種樣本 S1 或是 S2 (取決於 S2 是否有細菌生

長, S2 有細菌則取 S2 樣本; S2 無細菌生長則取 S1 樣本)置入

牙齒容器中培養 7 天

→以紙針置入根管中沾取細菌,於 BHI 培養皿中做第一次細菌

培養 (T1)

→將氫氧化鈣置入牙齒容器中 7 天

→將氫氧化鈣移除，以紙針置入根管中沾取細菌，於 BHI 培養皿中做第二次細菌培養 (T2)

→將已經移除氫氧化鈣的牙齒放至七天 (保持乾燥)

→以滴管吸取生理食鹽水，沖洗後回抽，於 BHI 培養皿中做第三次細菌培養 (T3)

→取出前後三組臨床分離株 T1,T2,T3 作序列性稀釋，比較 T2,T3 兩組細菌的差異來了解氫氧化鈣的影響力(T1 為控制組)

## 2-7 三氧化礦物的抗菌性分析

→將 *E. faecalis* 放置 3 ml BHI 溶液中培養 16 小時

→將 0.1g 的三氧化礦物和 200 mL 的生理緩衝液混合,配置出 50%的 MTA 溶液，和 BHI 菌液 1:1 混合，在反應三分鐘，三十分鐘，七天後，進行序列性稀釋來觀察糞腸球菌的存活情形

→以 400 毫克的氫氧化鈣加蒸餾水達到 800 微升，配製濃度為 50%的氫氧化鈣溶液，和 BHI 菌液 1:1 混合，在反應三分鐘，三十分鐘，七天後，進行序列性稀釋來觀察糞腸球菌的存活

情形

(培養期間將試管溶液置於 37 度 C 微氧環境中)



## 第三章 結果

### 3-1 不同的根管細菌對於氫氧化鈣的抗性分析

根據試管內的研究結果指出，*Enterococcus faecalis*，*Streptococcus mutans*，*Pseudomonas aeruginosa* 與 50% 的氫氧化鈣做混合，接觸 30 分鐘後觀察三種細菌的存活率，發現三種細菌幾乎都死亡殆盡；縮短接觸時間來比較何種細菌的抗性較強，因此改以接觸 5 分鐘來進行試驗，則發現 *Pseudomonas aeruginosa* 依舊無法存活，而 *Enterococcus faecalis*，*Streptococcus mutans* 到  $10^{-5}$  濃度下可以發現細菌的蹤跡，但是兩者之間的存活率並沒有顯著的差別，因此得到結論，在 50% 的氫氧化鈣濃度下，作用時間超過了 30 分鐘，幾乎可以殺死大部分的細菌，而即使作用時間只有 5 分鐘，對於 *Pseudomonas aeruginosa* 的殺菌力依然很有效，但是 *Enterococcus faecalis* 的存活率並沒有比 *Streptococcus mutans* 來的高(見圖八)

### 3-2 氫氧化鈣隨著時間 pH 值的變化

為了評估氫氧化鈣應該在病人牙齒中置放多久時間，我們測量了不同的細菌在 50% 的氫氧化鈣 pH 值和時間的變化，如圖九所示，50% 的氫氧化鈣與三種細菌共同培養下，一開始的 pH 值可以達到 11.6，隨著時間 pH 值逐漸升高，到 14 天達到最高峰(約 12.28)，之後開始

有下降的趨勢，因此可以知道在病人的牙齒中置放氫氧化鈣的時間約 14 天可以達到最好的殺菌效果，之後氫氧化鈣的 pH 值隨著時間逐漸下(見圖九)，而且不同的細菌和氫氧化鈣共同培養，並不會影響其 pH 值的改變。

### 3-3 三氧化礦物(MTA)的抗菌性

臨床上一般使用三氧化礦物為和蒸餾水 1:1(50%)的混合，當 MTA 與 *Enterococcus faecalis* 接觸時間達到 30 分鐘以上，則細菌無法存活，表示在修補破洞或是逆充填手術的時候，MTA 亦有抗菌的效果(如表一所示)；但當與 MTA 接觸時間只有三分鐘的時候，則在塗盤時可以發現細菌的蹤跡

### 3-4 臨床的病例收集和分析

#### 3-4.1 臨床的病例收集

自中國附醫根管治療科的門診中收集到了十個病例(總共有七位病人，其中一位病人四顆門牙皆收做實驗對象)，有五個病例曾接受過根管治療但有臨床症狀，另外有五個病例從未接受根管治療，本研究針對在根尖片下根尖病兆大於 1mm x 1mm，依臨床治療步驟依序完成治療，確認無臨床症狀且完成根管封填，在封填後於一個月後、三個月後、六個月後以及一年後分別請病人回來拍攝根尖片做後續追



蹤，觀察病兆的大小是否改變。

此外，每個病人會取三次檢體來進行細菌培養(如圖十所示)，第一次為未接受物理或化學性治療前(S1)，第二次為物理性修形和化學性藥物沖洗後,但在放置氫氧化鈣之前(S2)，第三次為放置氫氧化鈣一周後,移除氫氧化鈣後得到的樣本(S3)，分別送往實驗室進行細菌的培養和鑑定。十個病例中,只有七個病例有三次檢體的細菌培養結果，而 X 光片的治療過程與後續追蹤，如圖十至圖十八所示。

### 其詳細的分析結果如下所述

病例一 朱○彰 (男性，60/8/18)(牙位 44)

症狀描述：患者在 100/12/26 因為右下牙齦腫脹因此來中國醫學大學門診求診，可以看見根管經過封填且根尖有個 1x1 cm 大小的病兆。

治療過程：(如圖十一所示)在 101/1/4 完成馬來膠清，101/3/4 確定工作長度並置放氫氧化鈣，於 101/3/28 完成根管封填，經過四個月的觀察 (至 101/7/25)，可以看到根尖病兆明顯縮小，但病人因為工作忙碌且毫無症狀，拒絕回診間持續察。

檢體培養：此病例由於一開始就以次氯酸鈉沖洗，之後收集檢體發現完全沒有細菌生長，推測可能由於次氯酸鈉強勢的殺菌效果，導致細菌培養塗盤時完全沒有菌落的產生。

病例二 鍾○璇(女性，77/5/23)(牙位 22)

症狀描述：患者在 101/3/16 因為上顎門牙顎側發生腫脹而來到診間求診，可以看見右上側門牙接受過根管治療且根尖有個 1.5x1.5cm 的根尖病兆。

治療過程：(如圖十二所示)於 101/3/16 當下立刻移除馬來膠從齒內引流，並給予病人抗生素治療，在 101/3/23 完成馬來膠清除並置放氫氧化鈣，一周後完成根管封填，經過 4 個月觀察，可以觀察到根尖病兆明顯縮小。

檢體培養：此病例由於一開始就以次氯酸鈉沖洗，之後收集檢體發現完全沒有細菌生長，推測可能由於次氯酸鈉強勢的殺菌效果，導致細菌培養塗盤時完全沒有菌落的產生。

病例三 沈○鋒 (男性，48/1/7)(牙位 34)

症狀描述：患者於 100/10/29 來到中國醫藥大學附設醫院牙科作牙周病治療，拍攝 X 光片診斷時發現左下第一小白齒根尖區有病變，但病人無任何不適症狀；到了 101/3/23，病人因為要製作新的假牙，因此願意接受根管重新治療。

治療過程：(如圖十三所示) 在 101/4/9 移除舊有的馬來膠，確定根管長度並置放氫氧化鈣，於 101/5/4 完成根管封填；在

101/6/22 經過一個月觀察無任何不適，開始製作新的假牙，於 101/7/23 完成假牙製作；到了 101/9/17 經過三個月觀察，發現根尖病變消失。

檢體培養：此病例由於一開始就以次氯酸鈉沖洗，之後收集檢體發現完全沒有細菌生長，推測可能由於次氯酸鈉強勢的殺菌效果，導致細菌培養塗盤時完全沒有菌落的產生。

病例四 杜○芳 (女性，57/12/27)(牙位 12)

症狀描述：病人於 101/8/6 因為在診所做定期檢查發現門牙根尖區有病變，轉診制中國醫藥大學牙科部根管治療科。

治療過程：(如圖十四 A 所示) 101/8/20 開始治療，測量工作長度，並置放氫氧化鈣，在 101/9/3 完成根管封填；但經過了四個月觀察，發現病兆並未縮小或消失，因此於 102/3/1 進行根尖切除手術和逆充填，並將病兆送往口腔病理科做切片檢查。

檢體培養：(如圖十四 B 所示)可以看到未經過任何治療處理的 S1 樣本有大量的細菌生長；經過物理性清潔和次氯酸鈉沖洗的 S2 樣本細菌明顯減少，但是依然可以看到細菌生長的蹤跡；而接受氫氧化鈣置放過後的 S3 樣本，則在塗盤的時候

未見到任何菌落的生長。

術中照片：(如圖十四 C 所示)

#### 樣本報告

- **Interrupted stratified squamous epithelial lining** found in some area in the connective tissue. Based upon the above findings, it shows radicular cyst
- The slide consists of two identical groups of irregular shaped soft tissue specimens . Microscopically, it is characterized by a **cyst wall like structure** with proliferation of small blood vessels and infiltration of chronic inflammatory cells . **Cholesterol clefts** are with a foreign body giant cell reaction. Based upon the above findings , it shows cystic wall of radicular cyst
- 術中取下的檢體除了送病理切片，我們在實驗室做了菌種分析，發現並不是預料中的糞腸球菌，至於是何種細菌，要等待進一步的分析。

病例五 廖○華 (女性，68/8/1)(牙位 12)

症狀描述：病人於 101/8/6 由診轉診來根管治療科要求治療牙上門牙區的根尖病變。

治療過程：(如圖十五 A 所示) 於 101/9/12 拆除釘柱，但懷疑#11 有牙根斷裂的問題，因此只取了#12 作為檢體，當天清潔修形並置放氫氧化鈣，在 101/9/19 完成根管封填，經過三個月觀察，發現#12 根尖病變有縮小，但#11 症狀持續，建議持續觀察。

## 檢體培養

檢體塗盤：(如圖十五 B 所示)可以看到未經過任何治療處理的 S1 樣本有大量的細菌生長；經過物理性清潔和次氯酸鈉沖洗的 S2 樣本細菌明顯減少，但是依然可以看到細菌生長的蹤跡；而接受氫氧化鈣置放過後的 S3 樣本，則在塗盤的時候未見到任何菌落的生長。

病例六七 鄭○姬 (女性，53/1/26)(牙位 12, 11,21,22)

症狀描述：病人於 101/6/27 因為門牙不適來牙科部求診，發現上顎四顆門牙不當封填且有根尖病變，因此建議拆除釘柱後接受根管重新治療。

治療過程：(如圖十六 A 所示) 101/10/29 進行右邊兩顆門牙長度測量，清潔修形並置放氫氧化鈣，三周後於 101/11/21 進行根管封填，經過三個月觀察，發現兩顆牙齒的根尖病兆並未消失，建議持續觀察。

檢體塗盤：(如圖十六 B 所示)可以看到未經過任何治療處理的 S1 樣本有大量的細菌生長；經過物理性清潔和次氯酸鈉沖洗的 S2 樣本細菌明顯減少，但是依然可以看到細菌生長的蹤跡；而接受氫氧化鈣置放過後的 S3 樣本，則在塗盤的時候



未見到任何菌落的生長。

病例八,九 鄭○姬 (女性,53/1/26)(牙位 21,22)

症狀描述：病人於 101/6/27 因為門牙不適來牙科部求診，發現上顎四顆門牙不當封填且有根尖病變,因此建議拆除釘柱後接受根管重新治療。

治療過程：(如圖十七 A 所示)在 101/10/15 移除釘柱並清潔修形和置放氫氧化鈣，分別於六、七周後 101/11/28、101/12/5 進行根管封填，到了 102/2/27 經過三個月觀察，發現根尖病兆消失。

檢體塗盤：(如圖十七 B 所示)可以看到未經過任何治療處理的 S1 樣本有大量的細菌生長；經過物理性清潔和次氯酸鈉沖洗的 S2 樣本細菌明顯減少，但是依然可以看到細菌生長的蹤跡；而接受氫氧化鈣置放過後的 S3 樣本，則在塗盤的時候未見到任何菌落的生長。

病例十 胡○嵐 (女性,75/12/21)(牙位 12)

症狀描述：病人於 102/1/31 因為門牙根尖腫脹至根管治療科求診。

治療過程：(如圖十八 A 所示)在 102/2/6 移除馬來膠，於 102/2/27 確定工作長度並進行清潔和修形以及至放氫氧化鈣，經過三



周在 102/3/20 完成根管封填。

檢體塗盤：(如圖十八 B 所示)可以看到未經過任何治療處理的 S1 樣本有大量的細菌生長；經過物理性清潔和次氯酸鈉沖洗的 S2 樣本細菌明顯減少，但是依然可以看到細菌生長的蹤跡；而接受氫氧化鈣置放過後的 S3 樣本，則在塗盤的時候未見到任何菌落的生長。

### 3-4.2 病例整理與細菌分析

收集的十組病例，有兩位男性，五位女性(有一位女性收取了四個病例)，年齡分布從 25 到 54 歲，有五例有接受過根管治療，有五例為沒有接受過根管治療，而它們的根尖區都有根尖病變。

治療過程的前後，前三組病例由於一開始就以次氯酸鈉沖洗，無法得知一開始的菌量和菌種，而經過治療和氫氧化鈣處理後，沒有任何細菌生長；另外七組病例，一開始是以生理食鹽水浸泡根管腔再取樣本，因此可以得到治療前的樣本(S1)，而且這七組細菌經過鑑定皆為 *Enterococcus faecalis*(如圖十九所示)(黃色部分我們切取的 RNA 片段，前後為載體，黃色部分中的藍色為七組臨床分離株與標準菌株 *Enterococcus faecali* (ATCC29212)不同的部分，由此可以判斷這七組臨床分離株與標準菌株的 RNA 有很高的相似處，因此認定它們為糞腸球菌。)在塗盤後可以見到大量的菌落生長，而治療後明顯減少

(S2)，在氫氧化鈣作用後幾乎看不到菌落生存(S3)。

治療結果有五組病例病兆縮小或消失，成功率為 50%；有四組病例病兆持續，失敗率為 40%；有一組病例由於治療時間太短，尚未能得知治療結果。(如表二所示)

### 3-5 臨床分離株在牙齒容器中的表現

將分離出來的七組 *Enterococcus faecalis* 在我們所製作的牙齒容器中作培養，並模擬臨床的治療方式做處理，發現氫氧化鈣處理前後的結果和臨床上表現雷同；將氫氧化鈣處理後的牙齒容器每兩天滴入生理緩衝液，則在一周後又可以沾取到細菌樣本(如表三 A 所示)；而如果經過氫氧化鈣處理過的牙齒容器，我們不給予生理緩衝液來保持乾燥，則在一周後無法沾取到任何細菌(如表三 B 所示)。

## 第四章 討論

在一系列的臨床病例收集和治療以及實驗室的分析，我們針對以下幾個主題有了初步的結果：

### 1. 糞腸球菌於試管中的表現

*Enterococcus faecali* 對氫氧化鈣的抗性能力與 *Streptococcus mutans* 並無顯著差別。

### 2. 氫氧化鈣隨著時間 pH 值的變化

置放了 14 天的氫氧化鈣 pH 值達到最高(pH=12.28)。

### 3. 臨床的病例分析

氫氧化鈣能有效地殺死根管內的細菌，但這與根尖病兆的消失並沒有絕對的關聯性。

### 4. 臨床分離株在牙齒容器中的表現

在實驗室進行體外的臨床分離株操作，氫氧化鈣對分離出來的樣本殺菌能力一樣有效，但移除了氫氧化鈣後保持乾燥或潮濕，對之後沾取的菌量有很大的差異。

### 5. 三氧化礦物的抗菌性分析

50% 的 MTA 溶液只和細菌接觸三分鐘的話，其殺菌能力是不足的；但如果可以有效的接觸三十分鐘以上，其殺菌效果和氫氧化鈣一樣是可預期的。

## 4-1 糞腸球菌於試管中的表現

將糞腸球菌、鏈球菌和綠膿桿菌放置於培養皿中，以 50% 氫氧化鈣對他們進行抗菌性分析，發現作用了三十分鐘後，三種標準菌株皆會死亡；即使是只接觸了五分鐘，可以發現綠膿桿菌幾乎無法生存，而鏈球菌和糞腸球菌兩者可以暫時存活，而存活率方面我們並無法發現很顯著的差異(存活率 *Enterococcus faecali* 對 *Streptococcus mutans* 為 1.1 : 1) ，也就是如果氫氧化鈣能充分的接觸的細菌，則殺菌的效果是可預期的，但糞腸球菌似乎沒有相對較強的抗性，這與我們一般的認知不盡相同(Atila-Pektas, Yurdakul et al. 2013)。

## 4-2 氫氧化鈣隨著時間 pH 值的變化

氫氧化鈣在臨床上的運用是在充分的清潔和修形後，依舊擔心有相當的菌量未被移除，所以置入氫氧化鈣於根管中作為管內敷藥 (Bidar, Disfani et al. 2011)。一般的置放時間建議為兩周左右，但是因為病人的時間很難配合剛好兩周的時間來做治療，我們擔心會因此影響治療的結果，因此對氫氧化鈣的 pH 值隨著時間做了測量，發現剛置放時 pH 值約 11.64，隨著時間會逐漸上升，表示氫氧根離子逐漸增加，到 14 天左右達到最高(約 12.28)，之後隨著時間 pH 值逐漸下降，表示藥效開始減弱，由此可以得知置放了兩周確實可以讓氫氧化鈣充

分的發揮它的效果。

只是根據標準菌株在培養皿中我們所做的實驗，在有效的接觸下，其實只要三十分鐘的作用時間，細菌的存活率就接近到零，延長時間似乎意義不是這麼的大，反而是想辦法讓氫氧化鈣能有效的接觸到細菌，才是我們應該考慮的議題。

所以在臨床治療上,在清潔修形後，置放氫氧化鈣之前，我們會使用EDTA充滿根管腔一分鐘，藉此移除塗抹層(smear layer)，讓氫氧化鈣能更深入牙本質小管，達到加強殺菌的目的(Yang, Cha et al. 2006)。

### 4-3 臨床的病例分析

在收集的十個病例中，十個病例有三個缺少了 S1 樣本，我們無法確定這三組病例一開始是否有細菌以及菌種為何，缺少的原因是在取樣本的時候沒有用生理食鹽水先置放一分鐘，而是直接以次氯酸鈉作為沖洗，所以推測由於次氯酸鈉的殺菌作用，紙針無法沾取到足夠的細菌量來進行培養，而這三組的 S2 樣本和 S3 樣本細菌培養皆為無菌。

剩餘的七組病例一開始在未做任何處置前，都有先以生理食鹽水浸泡根管一分鐘再以無菌紙針沾取，因此 S1 在抹盤上七組都是有細



菌存活的。

七組病例的 S2 菌量皆比 S1 還要來的少，我們想知道是何種菌種有較強的環境抵抗力，可以抵抗根管戳清潔修形和次氯酸鈉的沖洗，經過檢測(16sRNA)，七組中有六組的細菌為糞腸球菌，因此我們可以證明糞腸球菌確實可以生存在較惡劣的環境中，而一般使用的物理性和化學性的清潔方法也可以讓細菌有效的減少，但還是會有殘餘的細菌被我們沾取到；本研究在沾取樣本時並未以次氯酸鈉中和劑作沖洗，懷疑可能因為次氯酸鈉的作用使我們紙針沾取不到細菌，而造成偽陰性反應，這可能是許多病例的治療結果不如預期的因素之一。

而S3 是置放氫氧化鈣後才沾取的樣本，七組都沒有任何的細菌生長，可見氫氧化鈣確實可以有效的減少細菌在根管中的生存，建議在根管封填前，在診與診之間的空檔都置放氫氧化鈣以減少微生物生存的機率(Delgado, Gasparoto et al. 2010)。

在根管封填後，我們持續的對病人做術後追蹤，以根尖片(periapical film)做觀察，來確定治療是否有效。到 102/4/30 為止，十組病例中有五組(一、二、三、八、九)的治療是有效果的，它們的根尖病兆有明顯的縮小或消失，這跟我們實驗室的結果是相符的，也就由糞腸球菌引起的根尖病變，在經過治療和氫氧化鈣的置放，確實讓菌量減少到組織可以恢復的程度。



有一組病例(第十組)由於四月初才完成治療，觀察期太短所以暫時不列入討論，但這組病例特殊的是它所培養出來的細菌並不是糞腸球菌，而它到底屬於何種菌種還有待進一步鑑定。

還有四組的根尖病變並沒有隨著治療而縮小或消失，我們納悶其原因，其中第四組的病例，在病人的要求下我們進行了根尖手術，病理切片報告顯示其病兆為根尖囊腫(radicular cyst)，這可以解釋為什麼我們傳統治療沒有效果。

而剩下的三種未癒合的病例，第七、八組我們可以觀察到其根管封填有過長封填(overfilling)的現象，可能因此導致封填不緻密而造成治療失敗；另一個原因可能此兩病例為實習醫師所操作，由於不熟練和經驗不足導致治療無效果，建議病人持續觀察，如果病兆持續或有臨床症狀再以手術方式處理。

病例五也是沒有痊癒的病例，治療過程中因為有不正常的滲出液而懷疑有牙根斷裂，但因為病人堅持保留，所以依舊接受根管治療，並持續觀察，如果病兆和症狀持續,建議手術治療或拔除。

總結十組病例有一組觀察時間不足，五組病例治療成功，成功率為 50%；四組治療無效，失敗率為 40% ；而根據所選取的樣本，無論 X 光片上病兆消失與否，檢體的塗盤再經過氫氧化鈣處理後皆不會有細菌生長，所以沒有細菌生長並不代表治療會成功，可能跟根管

的封填是否緻密，牙根是否斷裂等其他外在因素有關係。

#### 4-4 臨床分離株在牙齒容器中的表現

將七組從病人牙齒中取出的細菌塗盤(病例一、二、三沒有沾取到細菌)，並將此臨床分離株置於口外牙齒容器中進行培養，再以氫氧化鈣處理，觀察分離株的生長情形。

在牙齒容器中培養七天後，細菌的生長情況會很好(S1)；而置放氫氧化鈣七天後，細菌量會減少到無法沾取到(S2)；如果此時每兩天給予生理緩衝液來維持根管內的濕潤，則在潮濕的環境下靜置七天後(S3)，細菌會重新生長，塗盤發現細菌的數量會跟置放氫氧化鈣前一樣多，表示根管封填後維持乾燥是非常重要的，無論是根尖的組織液或是冠狀部的滲漏都可能使根管潮濕而導致細菌再次生長；而如果不給予生理緩衝液，保持根管的乾燥，再過七天後，細菌並不會有生長的現象，因此緻密的封填而使根管保持乾燥的環境是根管治療要成功一個很重要的關鍵。

#### 4-5 三氧化礦物的抗菌性分析

50% MTA與*Enterococcus faecalis*接觸時間達到 30 分鐘以上，則細菌無法存活，表示在修補破洞或是逆充填手術的時候，MTA除了可以有良好的封閉性以外，亦有相當的抗菌的效果；目前臨床在置放

MTA之前，學者建議使用氫氧化鈣先於根管中置放一周之後再以 MTA填補，這樣可以使MTA更容易凝固和有更好的根尖密閉性，但亦有學者指出放置氫氧化鈣與否並不影響其最後的密閉性 (Bidar, Disfani et al. 2011)；而本實驗結果顯示在抗菌性方面來說，MTA已經有和氫氧化鈣一樣良好的抗菌效果。



## 第五章 結論

氫氧化鈣的置放時間建議在十四天(約兩周)可以讓其 pH 值達到最大(約 12.28)以達到更好的殺菌效果,之後 pH 值開始下降讓殺菌效果減少;氫氧化鈣如果在置放的時候能克服複雜的根管環境使藥物有效的接觸到根管中的微生物,則殺菌效果是可以預期的;但根管內細菌量的減少和根尖病兆是否痊癒並沒有絕對的正相關,病患的身體狀況、根管的封填是否緻密、橡皮帳的使用與否以及之後補綴物的冠狀部封閉性也是可能的影響要素。



## 第六章 未來工作

以此治療模式繼續收集病例，並收集根管內的檢體，擴大樣本數；持續觀察病人的恢復狀況，如果還是沒有痊癒的趨勢，建議病人接受手術治療並收集切片樣本以討論失敗原因。



## 表目錄

|      |                    |     |
|------|--------------------|-----|
| 表一   | 氫氧化鈣與三氧化礦物的抗菌性比較   | P37 |
| 表二   | 十組病例的資料整理          | P38 |
| 表三 A | 臨床分離株在潮濕牙齒容器中的生長情形 | P39 |
| 表三 B | 臨床分離株在乾燥牙齒容器中的生長情形 | P40 |





表一、氫氧化鈣與三氧化礦物的抗菌性比較

用糞腸球菌分別在 50%的氫氧化鈣和 50%的三氧化礦物中作培養，以生長的情況來判斷兩種藥物的殺菌效果，發現接觸時間達到三十分鐘的話，兩種藥物都可以殺死糞腸球菌；但如果三氧化礦物只接觸了三分鐘，則會有細菌存活，而氫氧化鈣只需要接觸三分鐘則細菌會無法存活

MTA : Mineraltrioxideaggregate ，三氧化礦物

|                           | 3min     | 30min | 7days |
|---------------------------|----------|-------|-------|
| MTA ( 50%)                | survival | dead  | dead  |
| Ca(OH) <sub>2</sub> (50%) | dead     | dead  | dead  |

表二、十組病例的資料整理

\* 病例四後續處理為手術，原因除了症狀持續以外，另一個因素是病人轉診來本院的目的就是接受根尖手術，只是我們建議先以傳統方式治療，若無效果再進行手術會比較好。

\*\*病歷十由於根管封填時間(102/4/3)還太短，尚未知道治療結果如何。

|     | 性別 | 年齡 | 治療前菌量  | 治療後菌量 | 結果    | 後續處理 |
|-----|----|----|--------|-------|-------|------|
| 病例一 | 男  | 42 | 未知     | 無     | 病兆縮小  | 持續觀察 |
| 病例二 | 女  | 25 | 未知     | 無     | 病兆縮小  | 持續觀察 |
| 病例三 | 男  | 54 | 未知     | 無     | 病兆縮小  | 持續觀察 |
| 病例四 | 女  | 45 | 有(E.f) | 無     | 病兆持續  | *手術  |
| 病例五 | 女  | 34 | 有(E.f) | 無     | 病兆持續  | 持續觀察 |
| 病例六 | 女  | 49 | 有(E.f) | 無     | 病兆持續  | 持續觀察 |
| 病例七 | 女  | 49 | 有(E.f) | 無     | 病兆持續  | 持續觀察 |
| 病例八 | 女  | 49 | 有(E.f) | 無     | 病兆縮小  | 持續觀察 |
| 病例九 | 女  | 49 | 有(E.f) | 無     | 病兆縮小  | 持續觀察 |
| 病例十 | 女  | 27 | 有(?)   | 無     | **觀察中 | 持續觀察 |

表三 A、臨床分離株在潮濕牙齒容器中的生長情形

(++ 表示細菌量多；- 表示沒有細菌生長)

T2 樣本幾乎沒有細菌生長，可以推斷氫氧化鈣的殺菌能力是有效果的；但再置放七天後，每兩天給予生理緩衝液保持根管潮濕，卻發現 T3 樣本有大量的細菌生長，因此認為環境的潮濕與否與細菌的生存有莫大的關聯。

| 潮濕環境 | 細菌培養七天後<br>T1 | 氫氧化鈣置放七天後<br>T2 | 移除氫氧化鈣，再置放七天後<br>T3 |
|------|---------------|-----------------|---------------------|
| 病例四  | ++            | -               | ++                  |
| 病例五  | ++            | -               | ++                  |
| 病例六  | ++            | -               | ++                  |
| 病例七  | ++            | -               | ++                  |
| 病例八  | ++            | -               | ++                  |
| 病例九  | ++            | -               | ++                  |
| 病例十  | ++            | -               | ++                  |

表三 B、 臨床分離株在乾燥牙齒容器中的生長情形

(++ 表示細菌量多； -表示沒有細菌生長)

T2 樣本幾乎沒有細菌生長，可以推斷氫氧化鈣的殺菌能力是有效果的；但再置放七天後，保持根管的乾燥卻發現 T3 完全沒有細菌的生長，因此認為環境的潮濕與否與細菌的生存有莫大的關聯。

| 乾燥環境 | 細菌培養七天後 | 氫氧化鈣置放七天後 | 移除氫氧化鈣，再置放七天後 |
|------|---------|-----------|---------------|
|      | T1      | T2        |               |
| 病例四  | ++      | -         | -             |
| 病例五  | ++      | -         | -             |
| 病例六  | ++      | -         | -             |
| 病例七  | ++      | -         | -             |
| 病例八  | ++      | -         | -             |
| 病例九  | ++      | -         | -             |
| 病例十  | ++      | -         | -             |

# 圖目錄

|        |                         |     |
|--------|-------------------------|-----|
| 圖一     | 橡皮障防濕工具                 | P43 |
| 圖二     | 清潔和修形的過程和目標             | P44 |
| 圖三     | 電子顯微鏡下比較塗抹層移除前後的差別      | P45 |
| 圖四     | 有無移除塗抹層和有無使用藥物處理比較圖片    | P46 |
| 圖五     | 臨床上收集的病例                | P47 |
| 圖六     | Protaper 修形工具           | P48 |
| 圖七     | 牙齒容器的製作                 | P49 |
| 圖八(A)  | 三種細菌在培養皿中與氫氧化鈣接觸三十分鐘的結果 | P50 |
| 圖八(B)  | 三種細菌在培養皿中與氫氧化鈣接觸五分鐘的結果  | P51 |
| 圖九     | 氫氧化鈣隨著時間 pH 值的變化        | P52 |
| 圖十     | 臨床治療步驟流程                | P53 |
| 圖十一    | 病例一 治療 X 光片             | P54 |
| 圖十二    | 病例二 治療 X 光片             | P55 |
| 圖十三    | 病例三 治療 X 光片             | P56 |
| 圖十四(A) | 病例四 治療 X 光片             | P57 |
| 圖十四(B) | 病例四 檢體塗盤                | P58 |

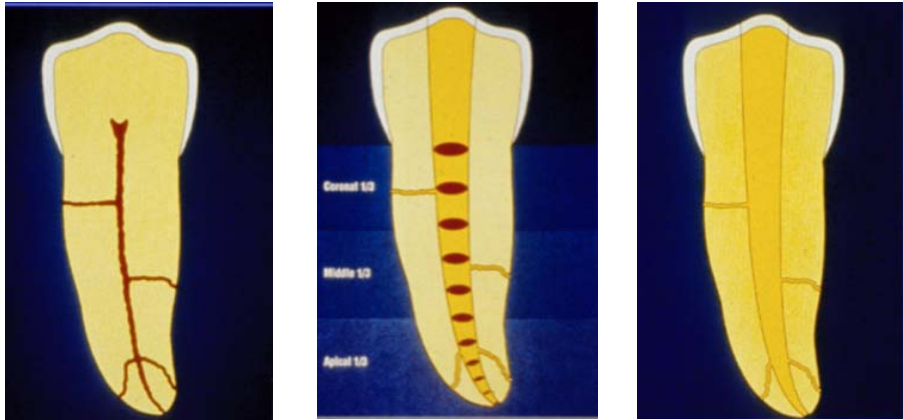
|        |                     |     |
|--------|---------------------|-----|
| 圖十四(C) | 病例四 術中照片            | P59 |
| 圖十五(A) | 病例五 治療 X 光片         | P60 |
| 圖十五(B) | 病例五 檢體塗盤            | P61 |
| 圖十六(A) | 病例六、七 治療 X 光片       | P62 |
| 圖十六(B) | 病例六、七 檢體塗盤          | P64 |
| 圖十七(A) | 病例八、九 治療 X 光片       | P65 |
| 圖十七(B) | 病例八、九 檢體塗盤          | P67 |
| 圖十八(A) | 病例十 治療 X 光片         | P68 |
| 圖十九    | 七種臨床分離株的 16sRNA 鑑定圖 | P71 |







圖一、橡皮障防濕工具 (rubber dam) ，用來防止口中的微生物進入根管中，降低根管治療的成功率。

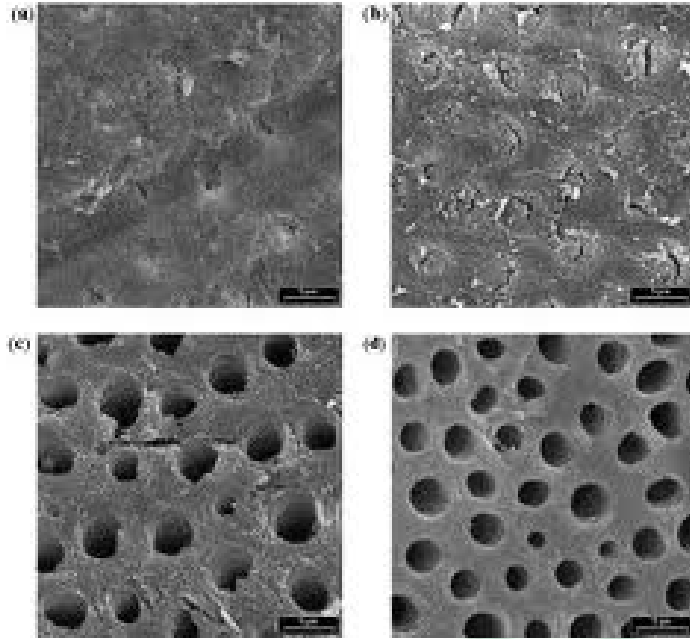


From: [www.drpratibhadentalblog.tw](http://www.drpratibhadentalblog.tw)

## 圖二、清潔和修形的過程和目標

原本狹窄且彎曲的根管，在經過清潔修形後，形成適當的外型和錐度，才有機會達到緻密的根管封填潔管。





From: Dental Materials volume 19, issue 8 2003, 758-767

### 圖三、電子顯微鏡下比較塗抹層移除前後的差別

牙本質一旦經過磨擦，則會在表面形成塗抹層(smear layer)，由牙本質屑和細菌組成。塗抹層除了是細菌的來源也會造成牙本質小管阻塞，使次氯酸鈉和氫氧化鈣等根管用藥物無法有效的作用到根管中的微生物。

### Group1

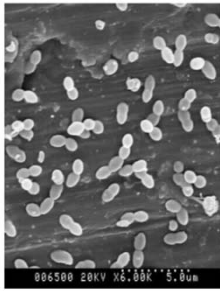


Figure 2. Many bacterial cells are seen on the dentin covered with a smear layer (group 1, original magnification  $\times 6000$ ).

### Group2

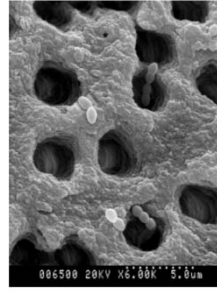
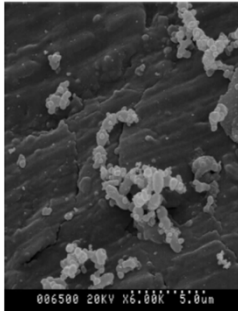


Figure 3. Smear layer was removed in the samples of group 2. Some cells are penetrating into dentinal tubules (original magnification  $\times 6000$ ).

### Group3



### Group4

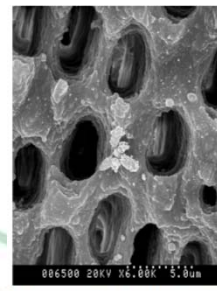


Figure 6. Cells are hardly seen in the samples of group 4 (original magnification  $\times 6000$ ).

Seung-Eun Tang et al,2006

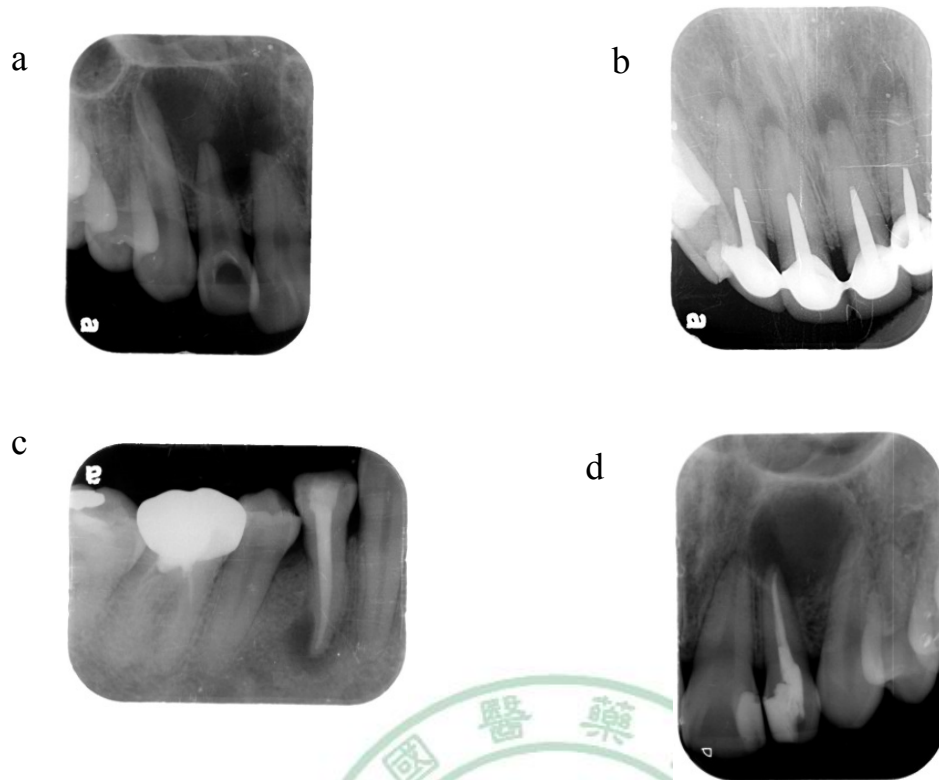
### 圖四、有無移除塗抹層和有無使用藥物處理的比較圖片

Group1：在 6000 倍的倍率下，未做任何藥物處理的組別，可以看到許多細菌在牙本質的塗抹層上生長的情形。

Group2：在 6000 倍的倍率下，使用 EDTA 將塗抹層移除的組別，可以看到露出牙本質小管且細菌減少的情形，注意到有少部分的細菌進入了牙本質小管中。

Group3：在 6000 倍的倍率下，細菌被 CHX 處理過後但未使用 EDTA 來移除塗抹層，可以看到細菌破裂的情形。

Group4：在 6000 倍的倍率下使用 EDTA 移除塗抹層且 CHX 處理過後的情況，可以看到牙本質小管的露出且細菌破裂的情形。



圖五、臨床上收集的病例

未曾接受過根管治療的病例，圖四 a

曾經接受過治療，而沒有充填材料的病例，圖四 b

接受過治療，有充填材料卻依舊有根尖病變病例，圖四 c，d





From: shenzhenrogin.en.made-in-china.com

圖六、Protaper 修形工具

由左至右依序為 Sx、S1、S2、F1、F2 以及 F3，本研究僅使用 S1、S2、F1、F2 四支器械作為修形。

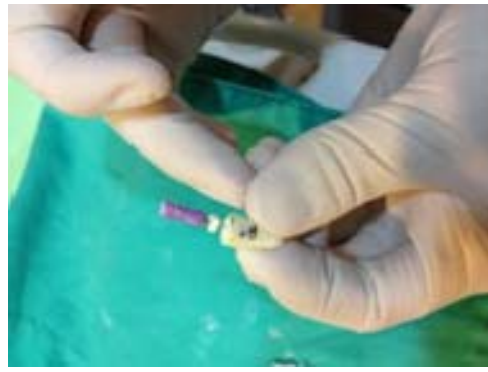




A



B



C

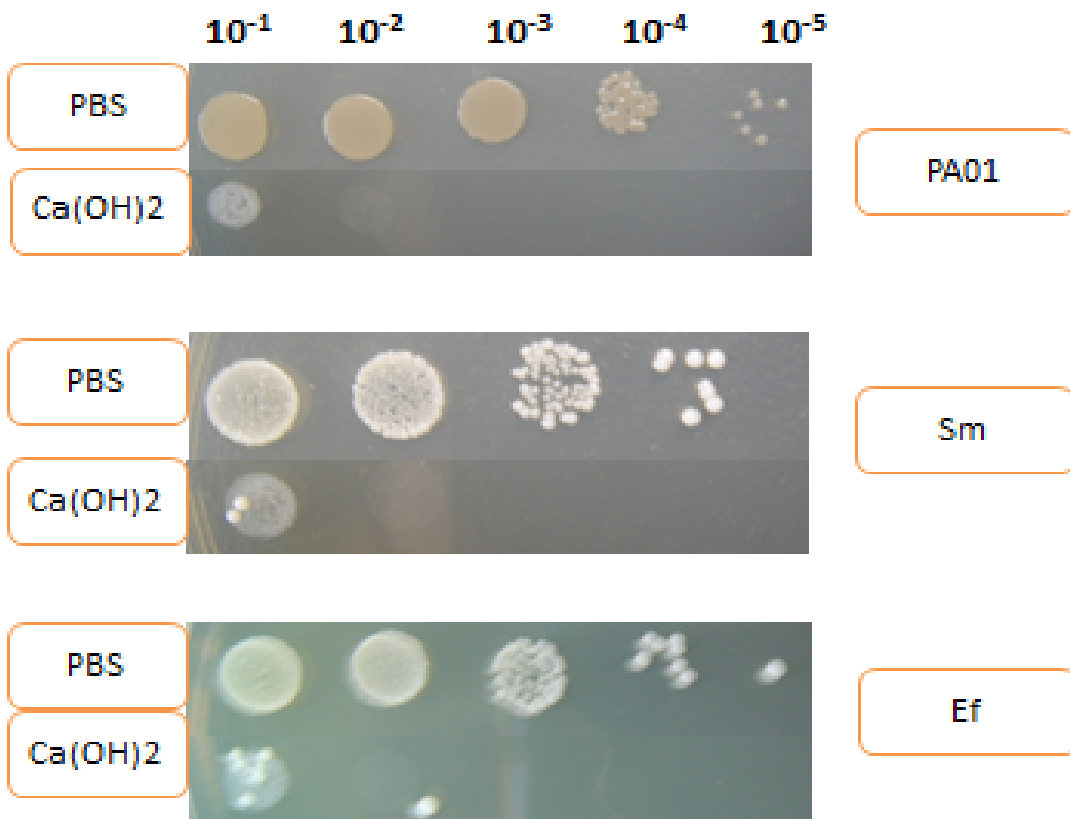


D

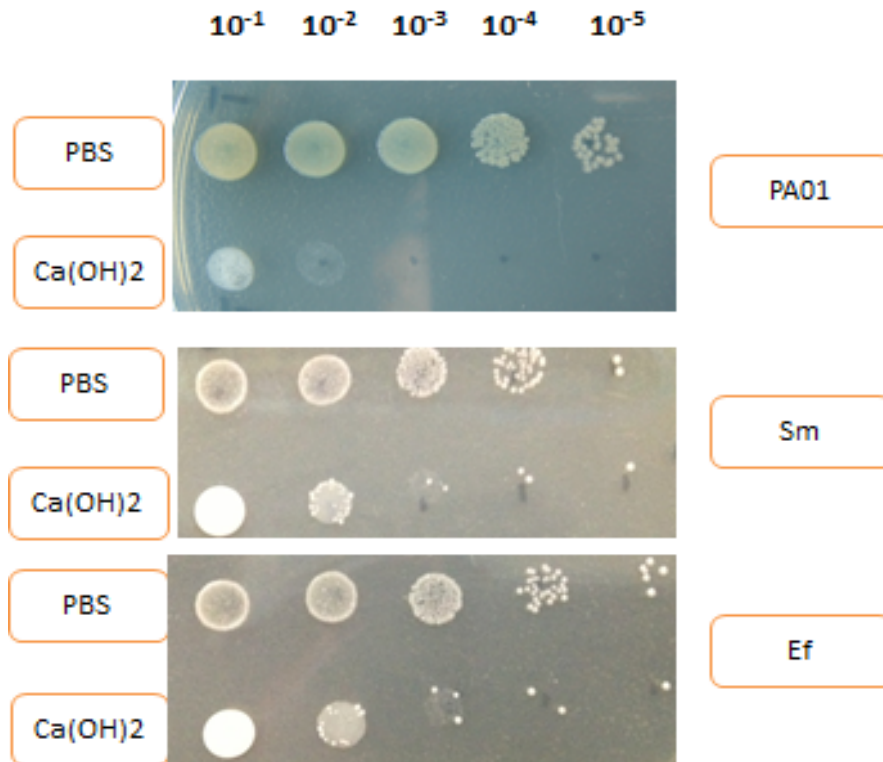


圖七、牙齒容器的製作

- A. 樣本牙齒,從根尖往上算 15 公厘
- B. 10 號 K 型根管銼可穿過根尖狹窄區( apical constriction)
- C. Protaper 系列, 圖中包含了 Sx、S1、S2、F1、F2
- D. 每次更換器械皆以生理食鹽水沖洗, 並確保根尖孔通暢

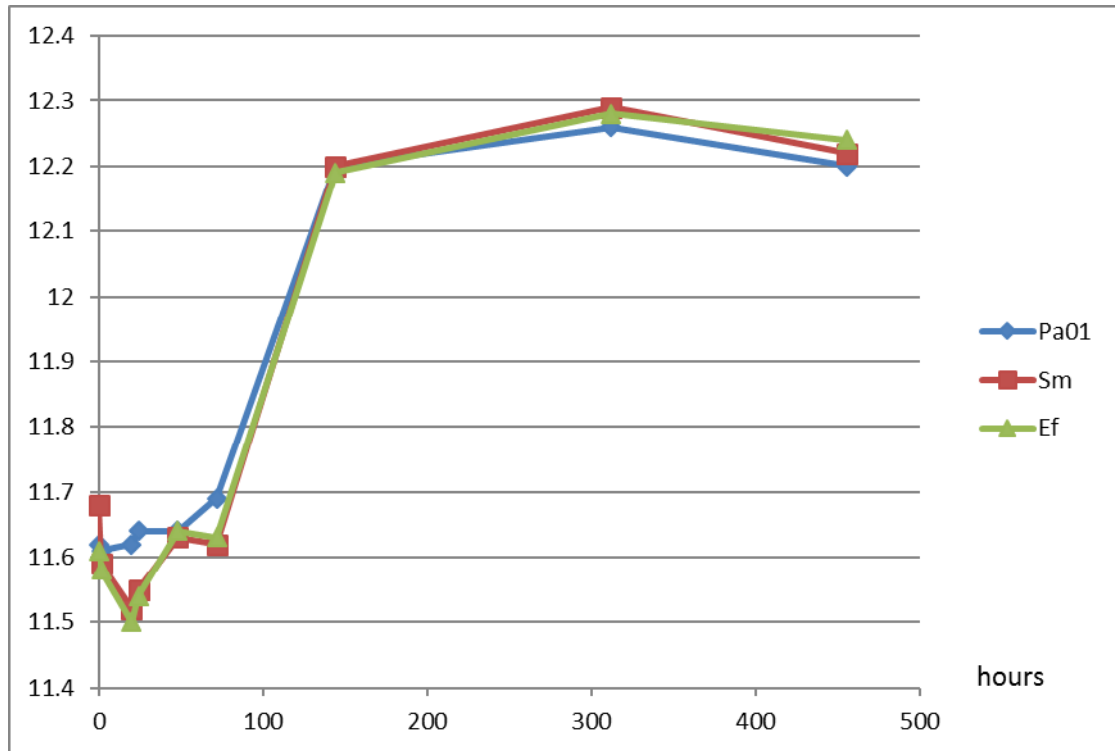


圖八(A)、三種細菌在培養皿中與氫氧化鈣接觸三十分鐘的結果  
 可以發現接觸三十分鐘的氫氧化鈣後，三種細菌皆無法存活，而對照  
 組生理緩衝液組可以存活。



圖八(B)、三種細菌在培養皿中與氫氧化鈣接觸五分鐘的結果

可以發現接觸五分鐘後，綠膿桿菌無法存活而其他兩種細菌可以存活；而糞腸球菌和鍊球菌的生長現象並無顯著的差異；而對照組生理緩衝液組可以存活。



圖九、氫氧化鈣隨著時間 pH 值的變化

50%氫氧化鈣的 pH 值隨著時間的變化，一開始測量的 pH 值為 11.6，之後隨著時間逐漸升高，在第 14 天(約 336 小時)達到最高峰，之後 pH 值逐漸下降。

## 臨床治療步驟

初診

根管開闢 → S1

清潔及修形 → S2

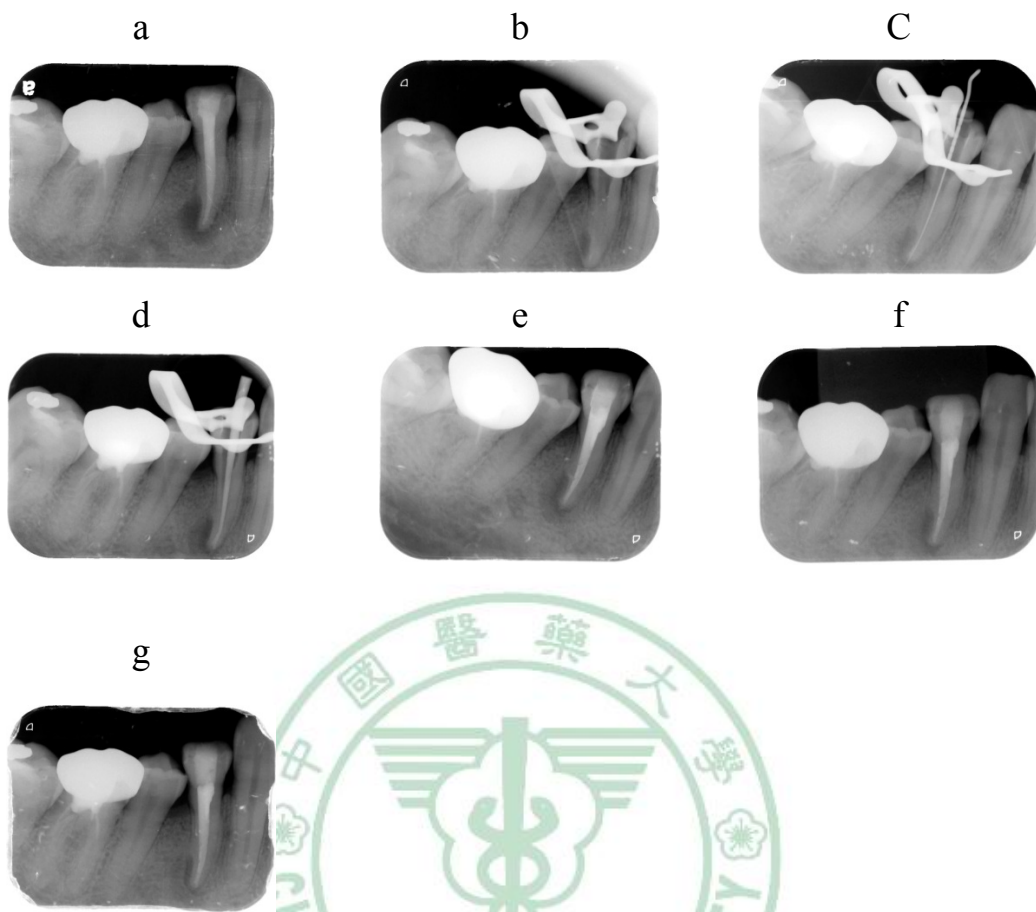
置放氫氧化鈣 → S3

根管封填

術後觀察

圖十、臨床治療步驟流程



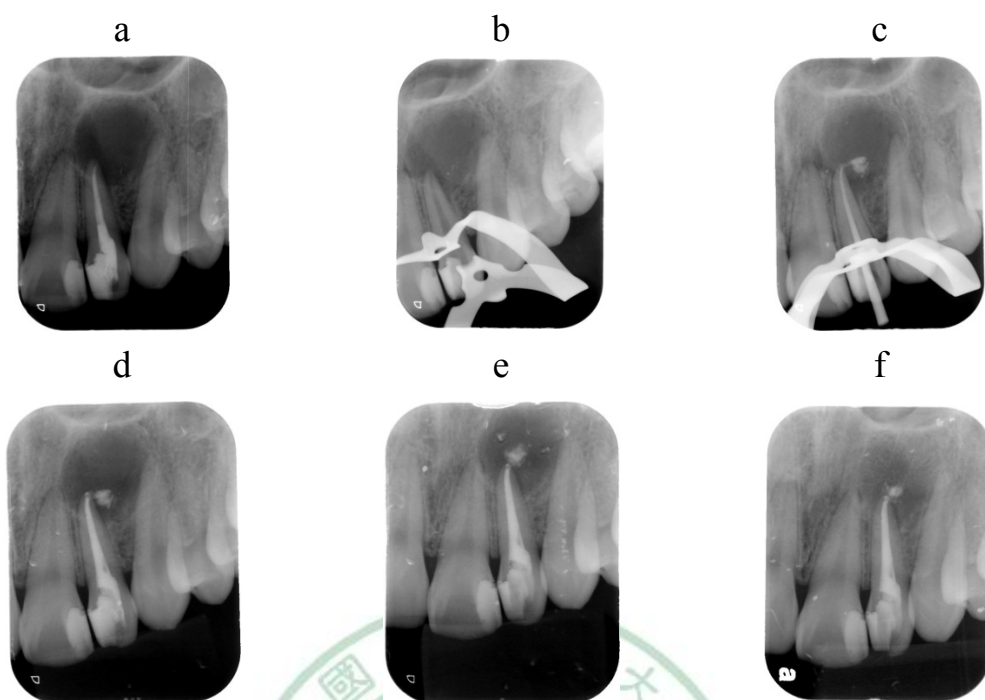


圖十一、病例一 治療 X 光片

病例一 朱○彰 (男性,60/8/18)(牙位 44)

- |                       |                     |
|-----------------------|---------------------|
| a. 初診 X 光片(100/12/26) | b. 舊有馬來膠移除(101/1/4) |
| c. 工作長度測量(101/3/14)   | d. 主膠針測量(101/3/28)  |
| e. 根管封填(101/3/28)     | f. 一個月觀察(101/4/25)  |
| g. 三個月觀察(101/7/25)    |                     |

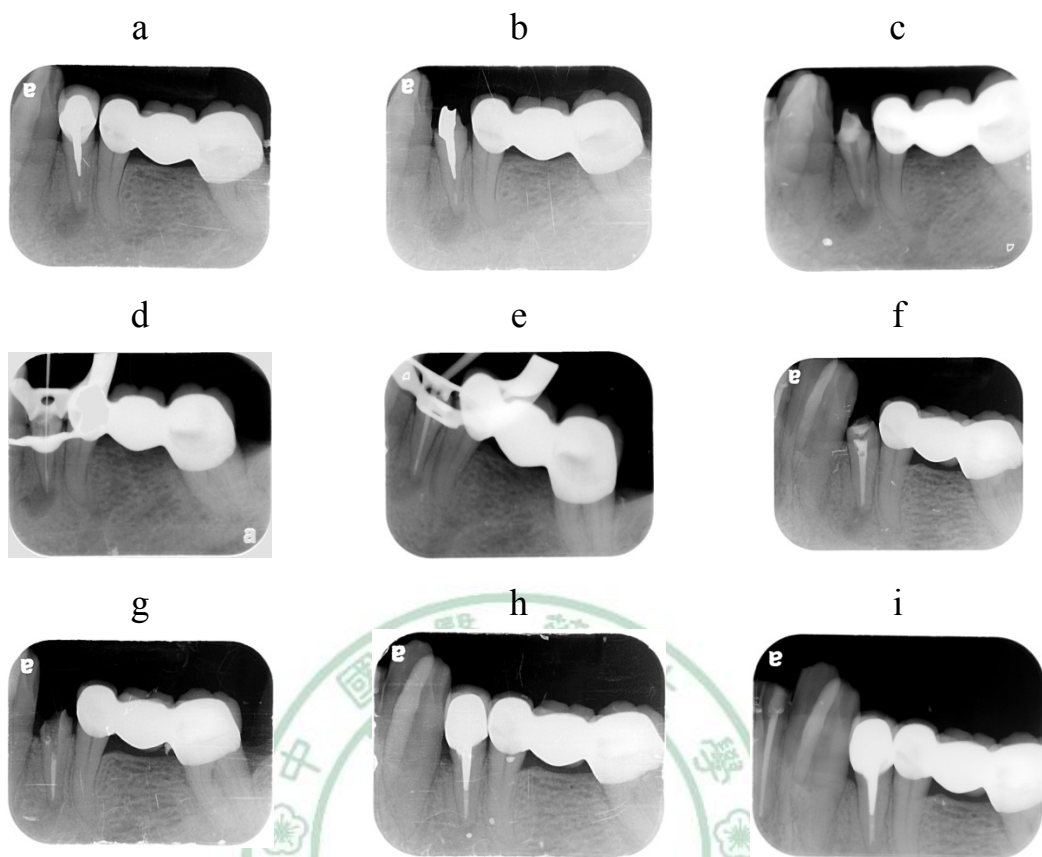




圖十二、病例二 治療 X 光片

病例二 鍾○璇(女性, 77/5/23)(牙位 22)

- a. 初診 X 光片 (101/3/16)
- b. 馬來膠移除 (101/3/23)
- c. 主膠針測量 (101/3/30)
- d. 根管封填 (101/3/30)
- e. 一個月觀察 (101/5/4)
- f. 三個月觀察 (101/8/10)



圖十三、病例三 治療 X 光片

病例三 沈○鋒 (男性, 48/1/7)(牙位 34)

a. 初診 X 光片(100/10/29)

b. 假牙移除 (101/3/23)

c. 柱釘, 馬來膠移除(101/4/9)

d. 工作長度測量 (101/4/9)

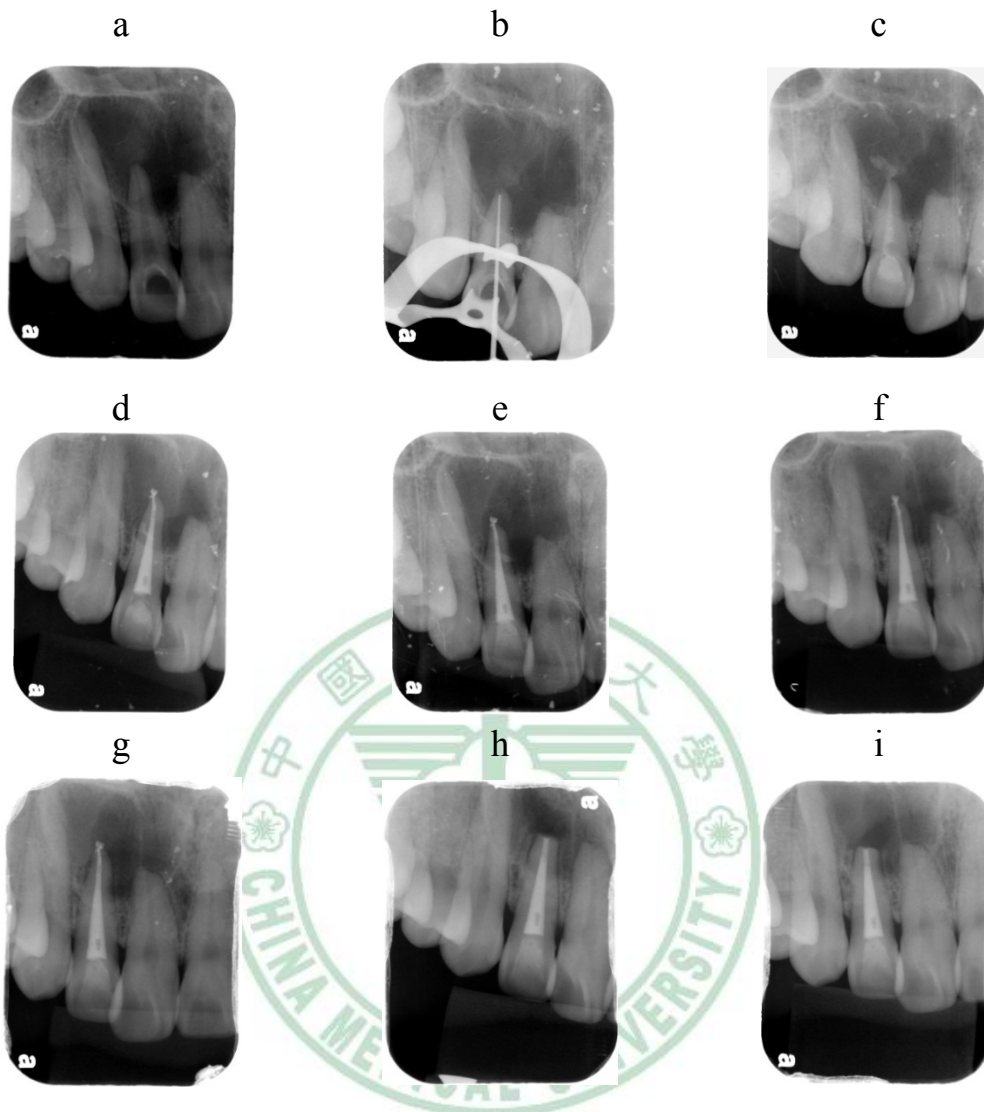
e. 主膠針測量 (101/5/4)

f. 根管封填 (101/5/4)

g. 一個月觀察(101/6/22)

h. 假牙製作 (101/07/23)

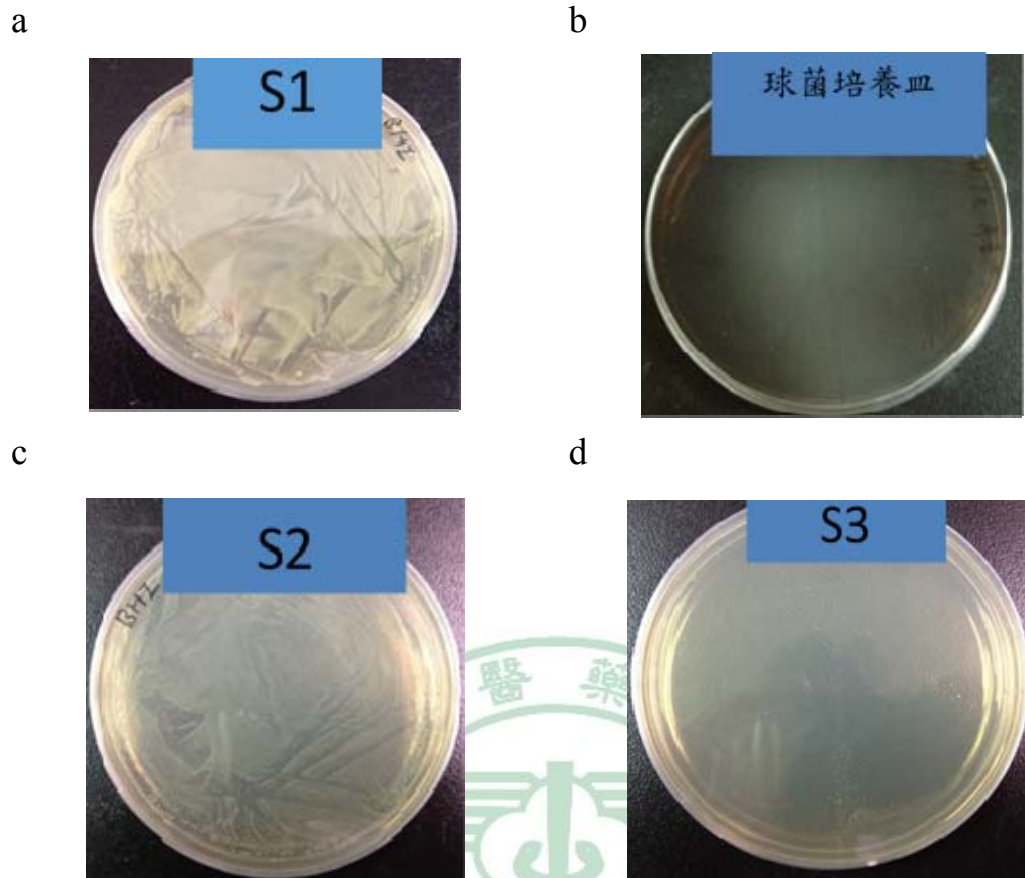
i. 四個月觀察 (101/9/17)



圖十四(A)、病例四 治療 X 光片

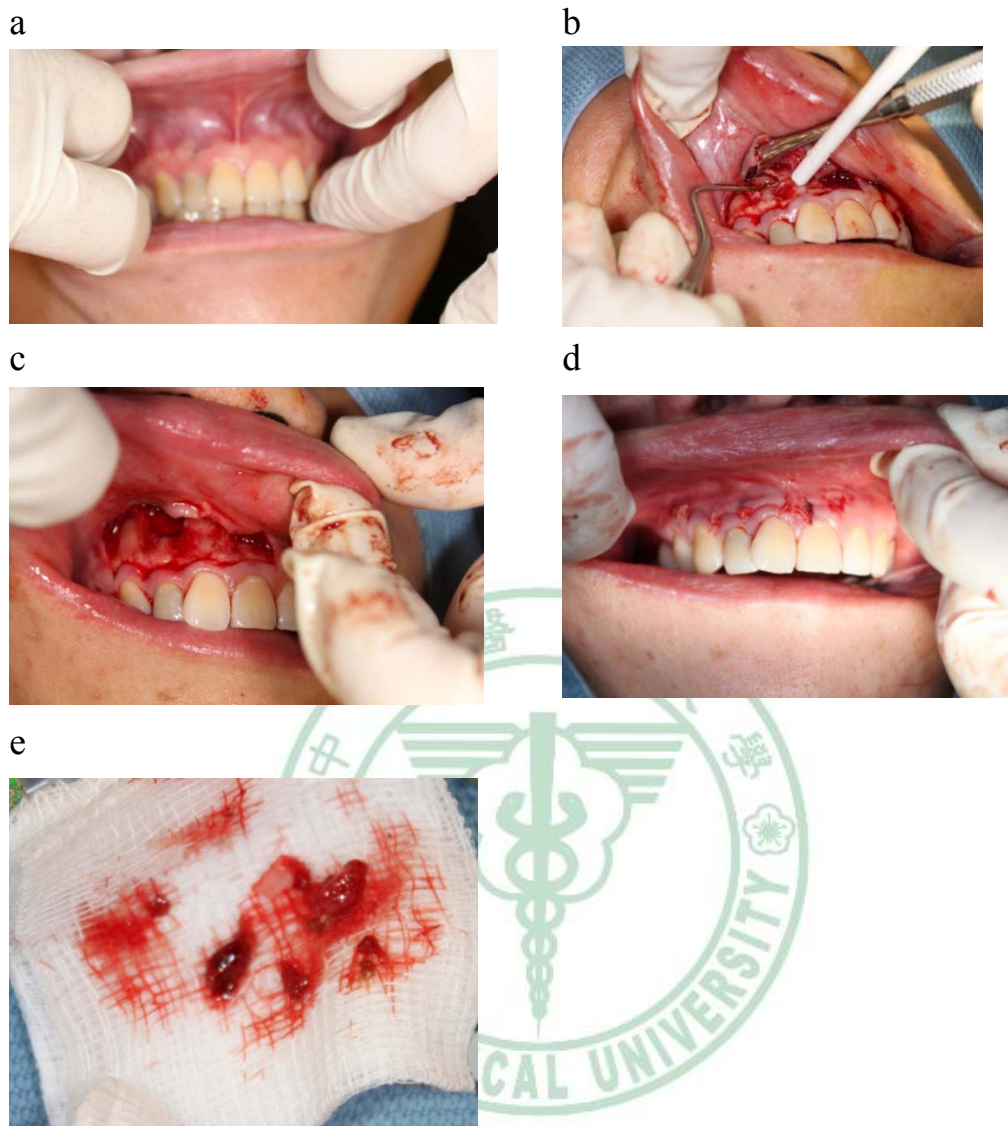
病例四 杜○芳 (女性, 57/12/27)(牙位 12)

- |                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| a. 初診 X 光片 (101/8/6) | b. 工作長度測量 (101/8/20) |
| c. 氫氧化鈣置放 (101/8/20) | d. 根管封填 (101/9/3)    |
| e. 一個月觀察 (101/10/15) | f. 四個月觀察 (102/1/16)  |
| g. 術前 (102/3/1)      | h. 術後 (102/3/1)      |
| i. 術後一周觀察 (102/3/7)  |                      |



圖十四(B)、病例四檢體塗盤

- a. 101/8/20 根管開闢時取的樣本
- b. S1 取的樣本在球菌專屬的培養皿上生長的情形，在有球菌的情況下，選擇性培養皿 (bile esculin azide agar)會因為產生檸檬酸鐵 (ferric citrate)而呈現黑色
- c. 101/8/20 清潔和修形完取的樣本，可以看到細菌量比 S1 明顯減少
- d. 101/9/3 置放完氫氧化鈣兩周後，根管封填前取的樣本可以發現幾乎沒看到菌落的生長



圖十四(C)、病例四 術中照片

a.手術前

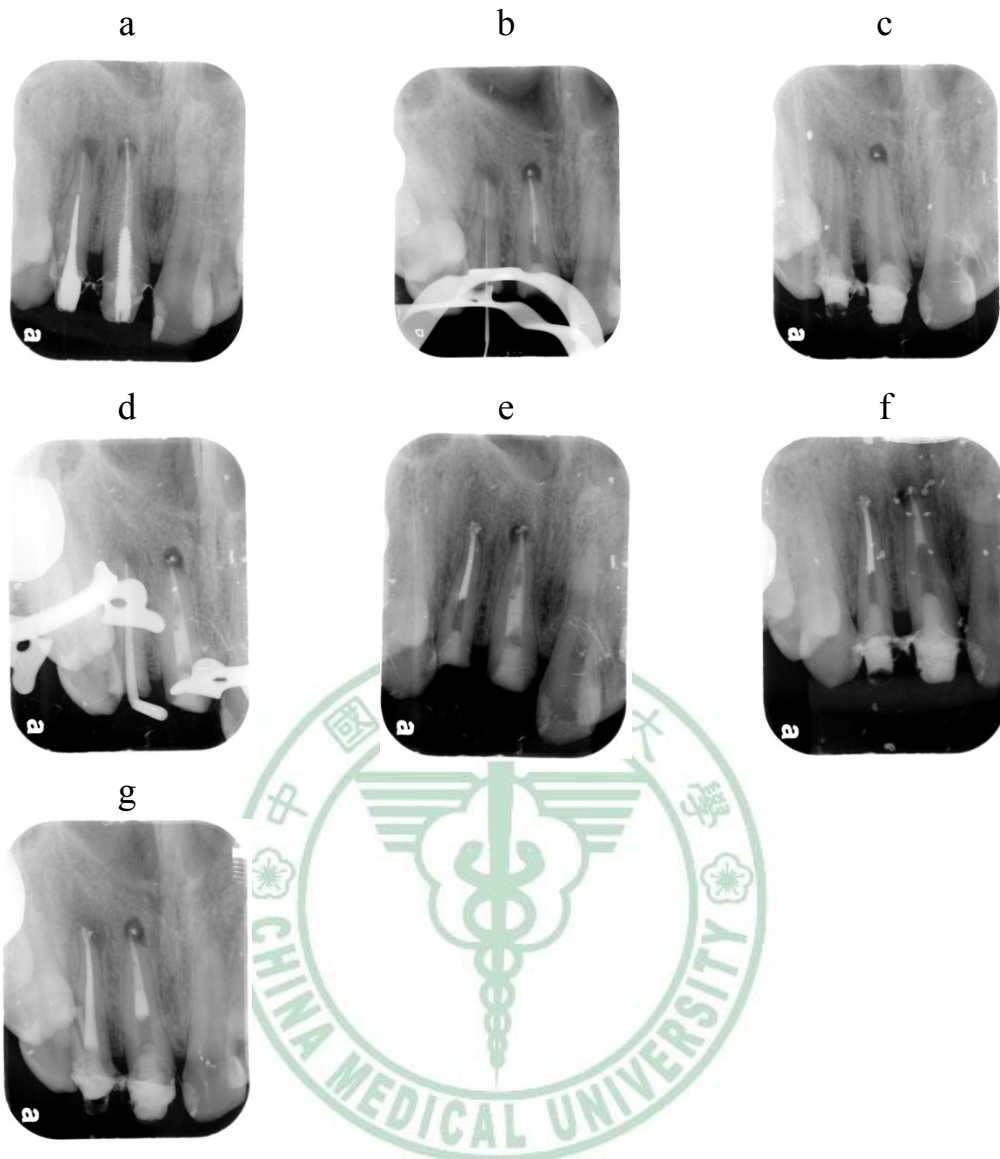
b.手術翻瓣

c.切除病兆後

d.縫合

e.根尖病兆





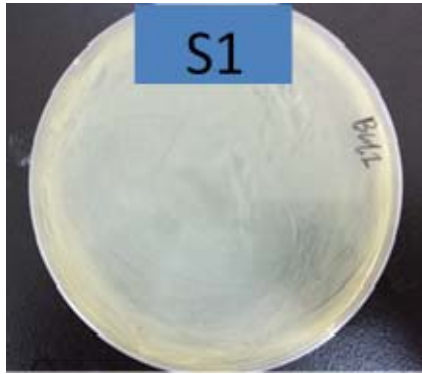
圖十五(A)、病例五 治療 X 光片

病例五 廖○華 (女性,68/8/1)(牙位 12)

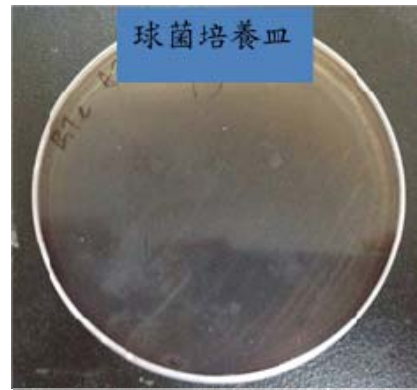
- |                       |                      |
|-----------------------|----------------------|
| a. 初診 x 光片 (101/8/6)  | b. 確定工作長度 (101/9/12) |
| c. 馬來膠移除 (101/9/12)   | d. 主膠針測量 (101/9/19)  |
| e. 根管封填 (101/9/19)    | f. 兩周觀察 (101/10/9)   |
| g. 3 個月觀察 (101/12/26) |                      |



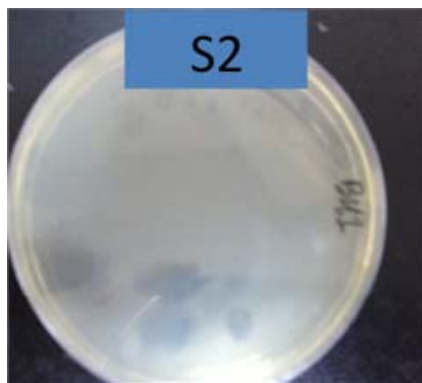
a



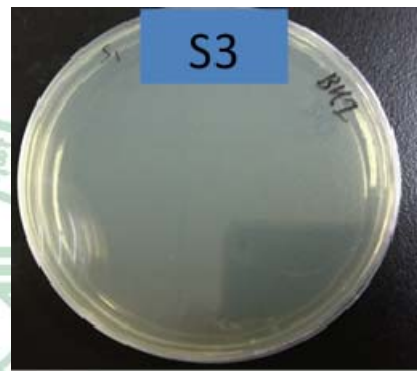
b



c

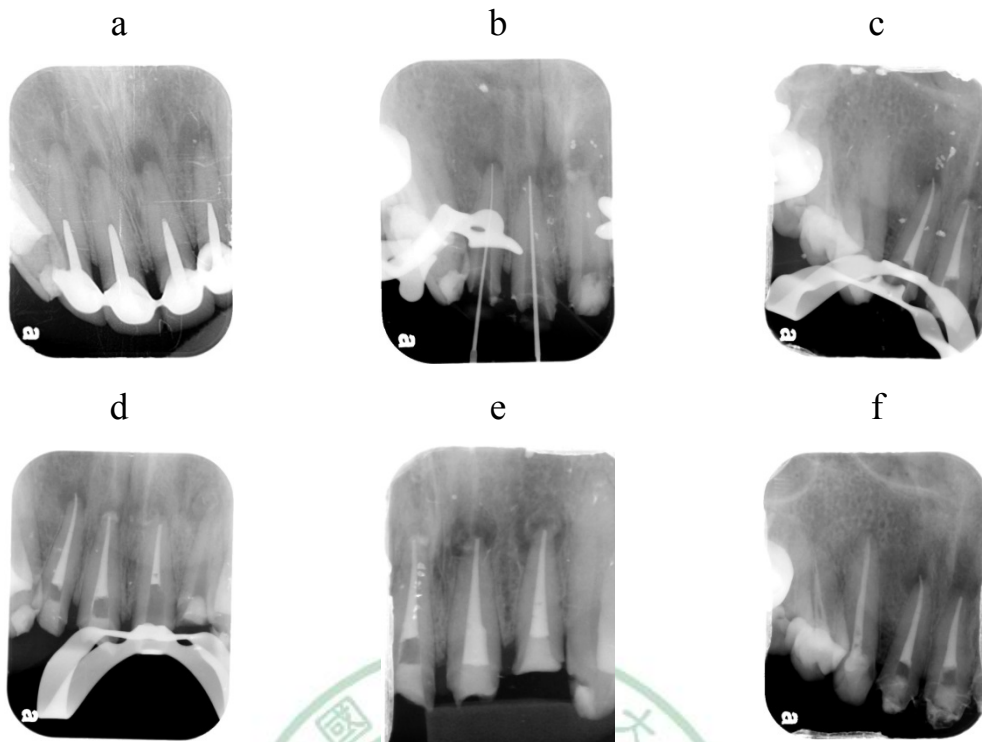


d



圖十五(B)、病例五 檢體塗盤

- 101/9/12 移除柱釘後，未做任何清潔動作，取第一次樣本
- S1 取的樣本在球菌專屬的培養皿上生長的情形，在有球菌的情況下，選擇性培養皿 (bile esculin azide agar) 會因為產生檸檬酸鐵 (ferric citrate) 而呈現黑色
- 101/9/12 清潔修形後取的樣本，可以看到細菌的數量比 S1 明顯減少
- 101/9/19 置放氫氧化鈣一周後，封填前取的樣本，可以發現幾乎沒有細菌的生長

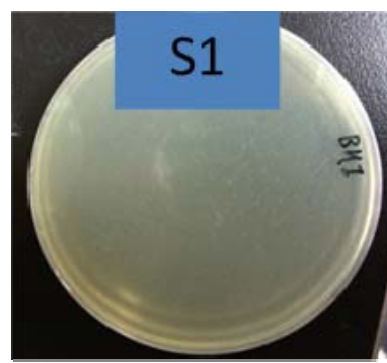
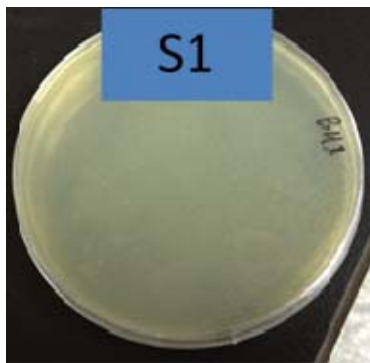


圖十六(A)、病例六、七 治療 X 光片

病例六、七 鄭○姬 (女性, 53/1/26)(牙位 12、11)

- a. 初始 x 光片 (101/6/27)
- b. 工作長度 (101/10/29)
- c. 根管封填 (101/11/21)
- d. 一周觀察(101/11/28)
- e. 一個月觀察(101/12/5)
- f. 三個月觀察(102/2/27)

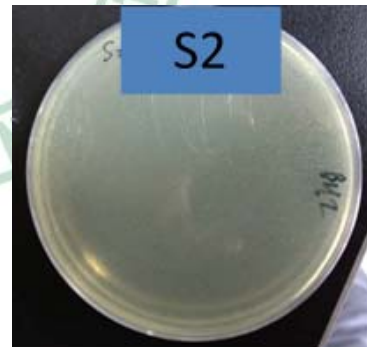
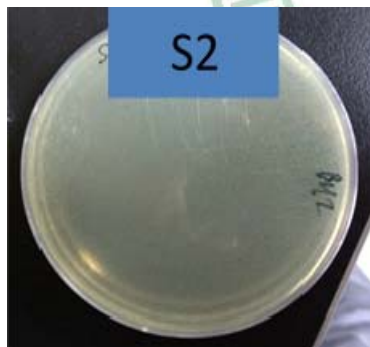
a



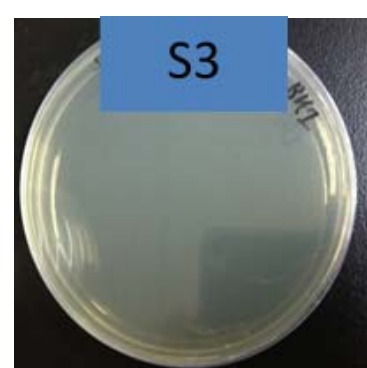
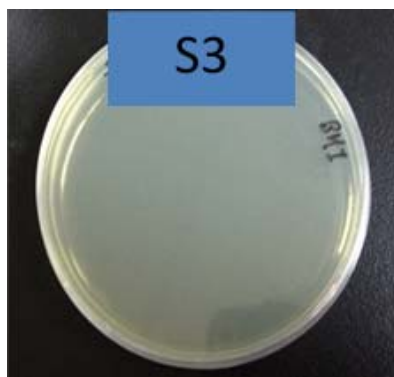
b



c



d

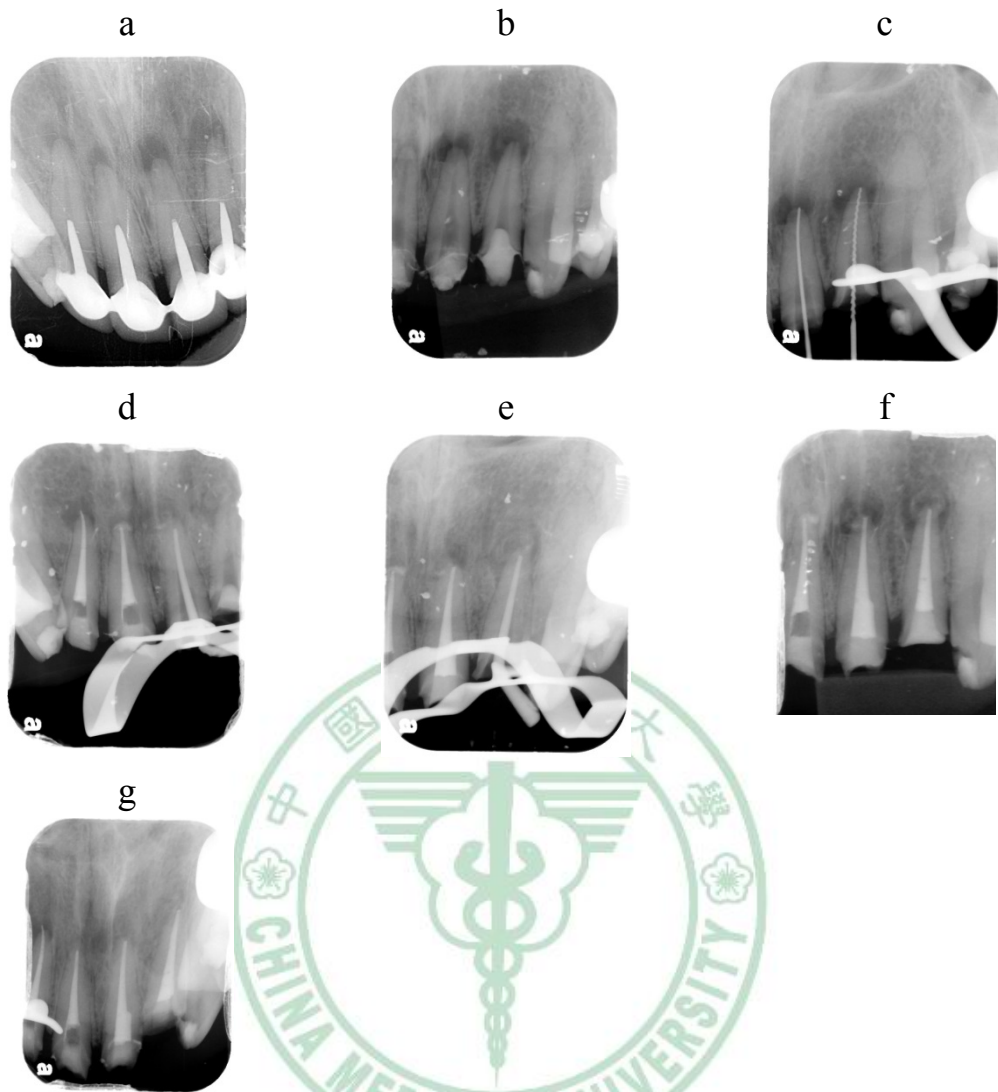


圖十六(B)、病例六、七 檢體塗盤

病例六、七檢體塗盤

- a. 101/10/29 移除柱釘後，未做任何清潔動作，取第一次樣本
- b. S1 取的樣本在球菌專屬的培養皿上生長的情形，在有球菌的情況下，選擇性培養皿 (bile esculin azide agar) 會因為產生檸檬酸鐵 (ferric citrate) 而呈現黑色
- c. 101/10/29 清潔修形後取的樣本，可以看到細菌的數量比 S1 明顯減少
- d. 101/11/21 置放氫氧化鈣三周後，封填前取的樣本，可以發現幾乎沒有細菌的生長





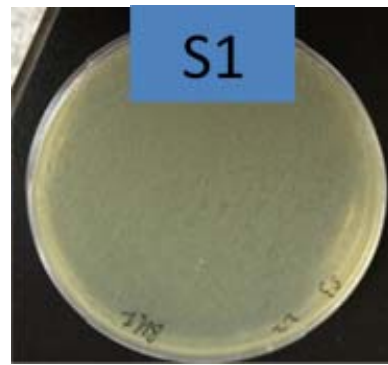
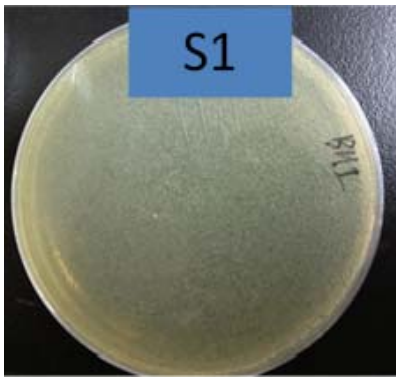
圖十七(A)、病例八、九 治療 X 光片

病例八、九 鄭○姬 (女性, 53/1/26) (牙位 21、22)

- |                       |                                |
|-----------------------|--------------------------------|
| a. 初診 X 光片 (101/6/27) | b. 移除假牙和柱釘 (101/10/15)         |
| c. 工作長度 (101/10/15)   | d. 主膠針測量 (101/11/28)           |
| e. 主膠針測量 (101/12/5)   | f. 根管封填 (101/11/28) (101/12/5) |
| g. 三個月觀察 (102/2/27)   |                                |



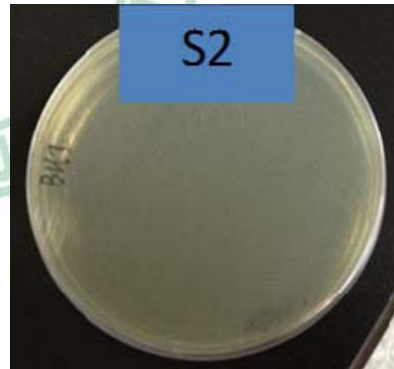
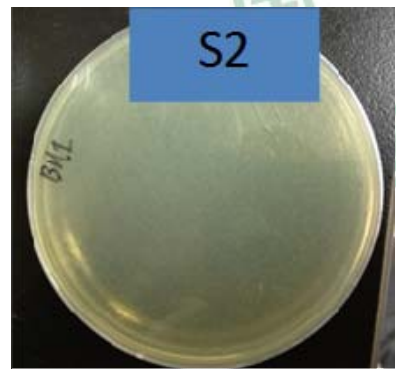
a



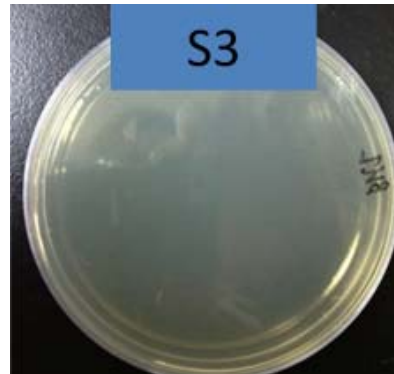
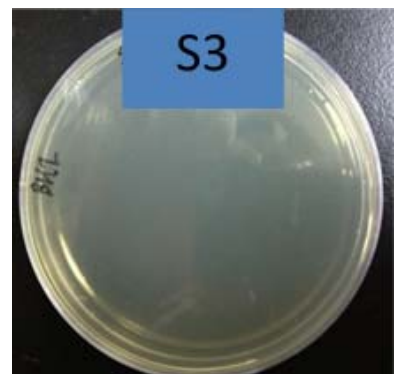
b



c



d



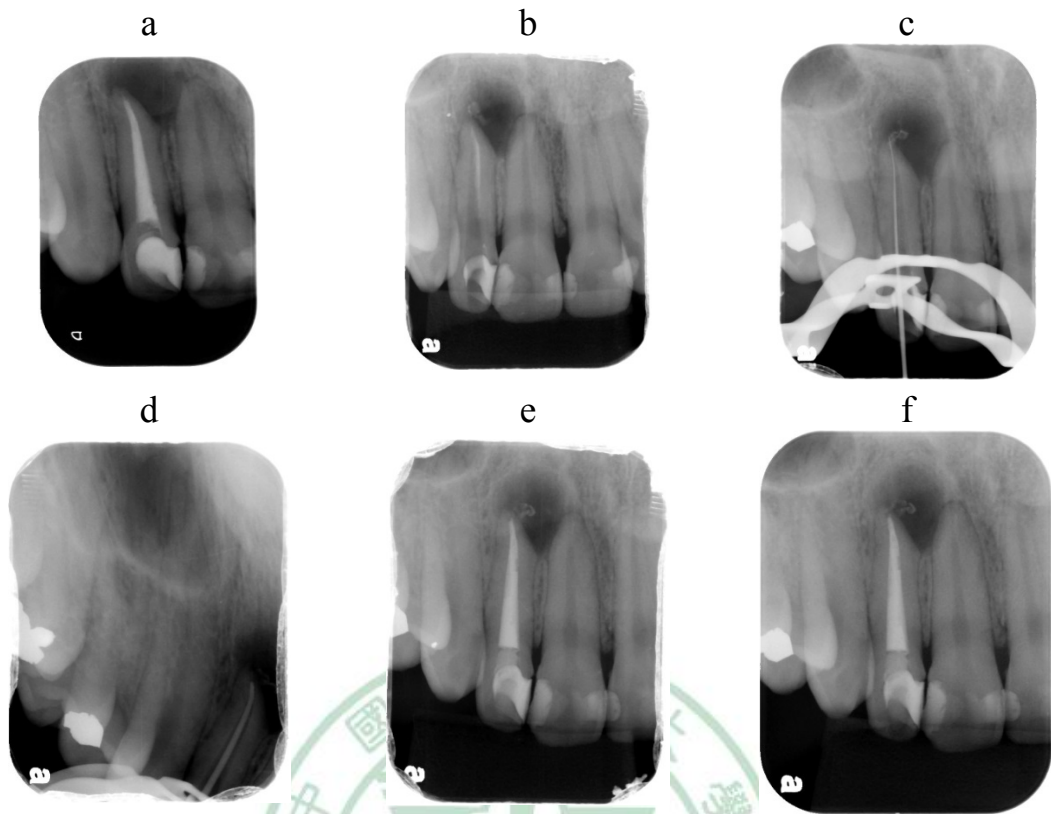


圖十七(B)、病例八、九 檢體塗盤

病理八、九檢體塗盤

- a. 101/10/15 未做任何清潔動作，取第一次樣本
- b. S1 取的樣本在球菌專屬的培養皿上生長的情形，在有球菌的情況下，選擇性培養皿 (bile esculin azide agar) 會因為產生檸檬酸鐵 (ferric citrate) 而呈現黑色
- c. 101/10/15 清潔修形後取的樣本，可以看到細菌的數量比 S1 明顯減少
- d. 101/11/28 、101/12/5 置放氫氧化鈣六、七周後,封填前取的樣本，可以發現幾乎沒有細菌的生長





圖十八(A)、病例十 治療 X 光片

病例十 胡○嵐 (女性, 75/12/21)(牙位 12)

- a. 初診 X 光片 (102/1/31)
- b. 移除馬來膠 (102/2/6)
- c. 工作長度 (102/2/27)
- d. 主膠針測量 (102/3/20)
- e. 根管封填 (102/3/20)
- f. 兩周觀察 (102/4/3)

|            |       | Section 1  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
|------------|-------|--|-----|-----|-----|-------|------|------------------------|-----------------|-----|-----|--|--|
|            |       | 1  | 10  | 20  | 30  | 40    | 50   | 60                     | 70              | 80  | 90  |  |  |
| D_ef       | (1)   | -----  |     |     |     |       | AGCT | TC                     | GTCAGGGGACGTTTC |     |     |  |  |
| S2_12_2    | (1)   | -----  |     |     |     |       | AGCT | TCC                    | GTCAGGGGACGTTTC |     |     |  |  |
| S3_12_2    | (1)   | -----  |     |     |     |       | AGCT | TCC                    | GTCAGGGGACGTTTC |     |     |  |  |
| S1_21_2 rc | (1)   | TGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGGGATCC                        |     |     |     | AGATC | TCC  | GTCAGGGGACGTTTC        |                 |     |     |  |  |
| S3_21_1 rc | (1)   | TGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGGGATCC                        |     |     |     | AGATC | TCC  | GTCAGGGGACGTTTC        |                 |     |     |  |  |
| S1_22_1    | (1)   | -----  |     |     |     |       | AGCT | TCC                    | GTCAGGGGACGTTTC |     |     |  |  |
| S3_22_1    | (1)   | -----  |     |     |     |       | AGCT | TCC                    | GTCAGGGGACGTTTC |     |     |  |  |
| Consensus  | (1)   |  |     |     |     |       | AGCT | TCC                    | GTCAGGGGACGTTTC |     |     |  |  |
|            |       | Section 2  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
|            |       | 56   | 70  | 80  | 90  | 100   | 110  | 120                    | 130             | 140 | 150 |  |  |
| D_ef       | (21)  | AGTTACTAACGTCCTTGTTCTTCTCTAACAAC                         |     |     |     |       | G    | GAGTTTTACGATCCGAAAACCT |                 |     |     |  |  |
| S2_12_2    | (22)  | AGTTACTAACGTCCTTGTTCTTCTCTAACAAC                         |     |     |     |       | A    | GAGTTTTACGATCCGAAAACCT |                 |     |     |  |  |
| S3_12_2    | (22)  | AGTTACTAACGTCCTTGTTCTTCTCTAACAAC                         |     |     |     |       | A    | GAGTTTTACGATCCGAAAACCT |                 |     |     |  |  |
| S1_21_2 rc | (56)  | AGTTACTAACGTCCTTGTTCTTCTCTAACAAC                         |     |     |     |       | A    | GAGTTTTACGATCCGAAAACCT |                 |     |     |  |  |
| S3_21_1 rc | (56)  | AGTTACTAACGTCCTTGTTCTTCTCTAACAAC                         |     |     |     |       | A    | GAGTTTTACGATCCGAAAACCT |                 |     |     |  |  |
| S1_22_1    | (22)  | AGTTACTAACGTCCTTGTTCTTCTCTAACAAC                         |     |     |     |       | A    | GAGTTTTACGATCCGAAAACCT |                 |     |     |  |  |
| S3_22_1    | (22)  | AGTTACTAACGTCCTTGTTCTTCTCTAACAAC                         |     |     |     |       | A    | GAGTTTTACGATCCGAAAACCT |                 |     |     |  |  |
| Consensus  | (56)  | AGTTACTAACGTCCTTGTTCTTCTCTAACAAC                         |     |     |     |       | A    | GAGTTTTACGATCCGAAAACCT |                 |     |     |  |  |
|            |       | Section 3  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
|            |       | 111  | 120 | 130 | 140 | 150   | 160  | 170                    | 180             | 190 | 200 |  |  |
| D_ef       | (76)  | TCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCC  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S2_12_2    | (77)  | TCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCC  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S3_12_2    | (77)  | TCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCC  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S1_21_2 rc | (111) | TCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCC  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S3_21_1 rc | (111) | TCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCC  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S1_22_1    | (77)  | TCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCC  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S3_22_1    | (77)  | TCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCC  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| Consensus  | (111) | TCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCC  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
|            |       | Section 4  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
|            |       | 166  | 180 | 190 | 200 | 210   | 220  | 230                    | 240             | 250 | 260 |  |  |
| D_ef       | (131) | TACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATC |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S2_12_2    | (132) | TACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATC |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S3_12_2    | (132) | TACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATC |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S1_21_2 rc | (166) | TACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATC |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S3_21_1 rc | (166) | TACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATC |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S1_22_1    | (132) | TACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATC |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S3_22_1    | (132) | TACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATC |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| Consensus  | (166) | TACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATC |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
|            |       | Section 5  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
|            |       | 221  | 230 | 240 | 250 | 260   | 270  | 280                    | 290             | 300 | 310 |  |  |
| D_ef       | (186) | ACCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACT  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S2_12_2    | (187) | ACCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACT  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S3_12_2    | (187) | ACCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACT  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S1_21_2 rc | (221) | ACCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACT  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S3_21_1 rc | (221) | ACCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACT  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S1_22_1    | (187) | ACCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACT  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| S3_22_1    | (187) | ACCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACT  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |
| Consensus  | (221) | ACCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACT  |     |     |     |       |      |                        |                 |     |     |  |  |

Section 6

|                  |   |     |     |     |     |     |
|------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| (276)            | 276   | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 |
| D_ef (241)       | AGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACTCT |     |     |     |     |     |
| S2_12_2 (242)    | AGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACTCT |     |     |     |     |     |
| S3_12_2 (242)    | AGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACTCT |     |     |     |     |     |
| S1_21_2 rc (276) | AGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACTCT |     |     |     |     |     |
| S3_21_1 rc (276) | AGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACTCT |     |     |     |     |     |
| S1_22_1 (242)    | AGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACTCT |     |     |     |     |     |
| S3_22_1 (242)    | AGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACTCT |     |     |     |     |     |
| Consensus (276)  | AGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCACTCT |     |     |     |     |     |

Section 7

|                  |  |     |     |     |     |     |
|------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| (331)            | 331  | 340 | 350 | 360 | 370 | 385 |
| D_ef (296)       | TATGCCATGCGGCATAAACAGATCTGGATCCCCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCAT |     |     |     |     |     |
| S2_12_2 (297)    | TATGCCATGCGGCATAAACAGATCTGGATCCCCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCAT |     |     |     |     |     |
| S3_12_2 (297)    | TATGCCATGCGGCATAAACAGATCTGGATCCCCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCAT |     |     |     |     |     |
| S1_21_2 rc (331) | TATGCCATGCGGCATAAACAGCT-----                             |     |     |     |     |     |
| S3_21_1 rc (331) | TATGCCATGCGGCATAAACAGCT-----                             |     |     |     |     |     |
| S1_22_1 (297)    | TATGCCATGCGGCATAAACAGATCTGGATCCCCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCAT |     |     |     |     |     |
| S3_22_1 (297)    | TATGCCATGCGGCATAAACAGATCTGGATCCCCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCAT |     |     |     |     |     |
| Consensus (331)  | TATGCCATGCGGCATAAACAGATCTGGATCCCCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCAT |     |     |     |     |     |

Section 8

|                  |     |
|------------------|-----|
| (386)            | 386 |
| D_ef (351)       | GCA |
| S2_12_2 (352)    | GCA |
| S3_12_2 (352)    | GCA |
| S1_21_2 rc (355) | --- |
| S3_21_1 rc (355) | --- |
| S1_22_1 (352)    | GCA |
| S3_22_1 (352)    | GCA |
| Consensus (386)  | GCA |



圖十九、七種臨床分離株的 16sRNA 鑑定圖

最上方為標準菌株 *Enterococcus faecali* (ATCC29212)，往下依次為病

例四、五、六、七、八、九。



## 參考文獻

- Atila-Pektas, B., et al. (2013). "Antimicrobial effects of root canal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*." Int Endod J **46**(5): 413-418.
- Bidar, M., et al. (2011). "The Effect of Calcium Hydroxide on the Short and Long-Term Sealing Properties of MTA Apical Barrier." Iran Endod J **6**(1): 6-10.
- Dahlen, G., et al. (2000). "Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal." Oral Microbiol Immunol **15**(5): 309-312.
- Delgado, R. J., et al. (2010). "Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*." J Endod **36**(8): 1389-1393.
- Evans, M., et al. (2002). "Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide." Int Endod J **35**(3): 221-228.
- Fulzele, P., et al. (2011). "Evaluation of calcium ion, hydroxyl ion release and pH levels in various calcium hydroxide based intracanal medicaments: An in vitro study." Contemp Clin Dent **2**(4): 291-295.
- Gomes, B. P., et al. (2002). "In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms." Braz Dent J **13**(3): 155-161.
- Han, G. Y., et al. (2001). "Antimicrobial activity of Ca(OH)<sub>2</sub> containing pastes with *Enterococcus faecalis* in vitro." J Endod **27**(5): 328-332.
- Jiang, L. M., et al. (2011). "Resazurin metabolism assay for root canal disinfectant evaluation on dual-species biofilms." J Endod **37**(1): 31-35.
- Kayaoglu, G., et al. (2011). "Antibacterial activity of Propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules." J Endod **37**(3): 376-381.



Kreth, J., et al. (2008). "The Antimicrobial Effect of Silver Ion Impregnation into Endodontic Sealer against *Streptococcus mutans*." Open Dent J **2**: 18-23.

Lima, R. K., et al. (2012). "Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*." Int Endod J **45**(4): 311-316.

Lui, J. N., et al. (2004). "In vitro antimicrobial effect of chlorhexidine-impregnated gutta percha points on *Enterococcus faecalis*." Int Endod J **37**(2): 105-113

Matos Neto, M., et al. (2012). "Effectiveness of three instrumentation systems to remove *Enterococcus faecalis* from root canals." Int Endod J **45**(5): 435-438.

Ng, Y. L., et al. (2011). "A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health." Int Endod J **44**(7): 583-609.

Portenier, I., et al. (2005). "The Susceptibility of Starved, Stationary Phase, and Growing Cells of *Enterococcus faecalis* to Endodontic Medicaments." J Endod **31**(5): 380-386.

Rocas, I. N., et al. (2004). "Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases." J Endod **30**(5): 315-320.

Schafer, E. and K. Bossmann (2005). "Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Two Calcium Hydroxide Formulations Against *Enterococcus faecalis*." J Endod **31**(1): 53-56.

Stuart, C. H., et al. (2006). "Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment." J Endod **32**(2): 93-98.

Sjogren, U., et al. (1997). "Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis." Int Endod J **30**(5): 297-306.

Siqueira, J. F., Jr. and H. P. Lopes (1999). "Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review." Int Endod J **32**(5): 361-369.

Siqueira, J. F., Jr. and I. N. Rocas (2008). "Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures." J Endod **34**(11): 1291-1301 e1293.

Williams, J. M., et al. (2006). "Detection and quantitation of E. faecalis by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment." J Endod **32**(8): 715-721.

Yang, S. E., et al. (2006). "Effect of smear layer and chlorhexidine treatment on the adhesion of Enterococcus faecalis to bovine dentin." J Endod **32**(7): 663-667.

