

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

明膠軟骨透明質酸三重聚合物支架進行齒芽組織工程

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-002-105-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學獸醫學系暨研究所

計畫主持人：郭宗甫

計畫參與人員：陳敏慧、章浩宏、林峰輝、黃安婷、陳香松、羅晞文、莊雅玲、
王月桂

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ■ 成果報告

□ 期中進度報告

明膠軟骨素透明質酸三重聚合物支架進行齒芽組織工程

Gelatin-Chondroitin-Hyaluronan Tri-copolymer Scaffold for

Dental Bud Tissue Engineering

計畫類別： ■ 個別型計畫 □ 整合型計畫

計畫編號：NSC 93-2313-B002-105-

執行期間：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：郭宗甫

共同主持人：無

計畫參與人員：陳敏慧、章浩宏、林峰輝、黃安婷、陳香松、羅晞文、莊雅玲、
王月桂

成果報告類型（依經費核定單規定繳交）：□ 精簡報告 ■ 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫
及下列情形者外，得立即公開查詢

□ 涉及專利或其他智慧財產權，□ 一年 □ 兩年後可公開查詢

執行單位：國立台灣大學獸醫學系暨研究所

中華民國 94 年 10 月 31 日

中文摘要：

牙周疾病、齲齒、撞傷或基因失調而造成牙齒缺損，一直是許多人和動物生活中極大的困擾，若能發展出生物性的牙齒再生取代缺損的牙齒將是臨床治療的一種新方法。本研究之目的乃是利用組織工程的方法達成牙齒的再生。取 1.5 個月齡迷你豬，將未萌發白齒以外科手術取下，放入 30 ml 含 1.5 % PC/ST (Penicillin/streptomycin) 之 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 中於 4°C 保存。其後分離白齒中的牙胚組織，以 1X PBS (Phosphate buffer saline) 液清洗乾淨後切碎成 $< 1 \text{ mm}^3$ 的小片段，於含 1.5 % PC/ST 及 20 % FCS 之 DMEM 中 37°C, 5 % CO_2 培養。培養 3 星期使細胞數達 1×10^7 個。將培養的齒芽細胞種入明膠-軟骨素-透明質酸三重聚合物支架內培養一週。實驗組將含有細胞/支架埋入同源豬原齒槽骨內及下顎骨骨質中；兔子則埋入末端肋軟骨之皮下，並取部分細胞/支架以 10 % 中性福馬林及 2.5 % 戊二醛固定分別製作組織切片、進行環境掃描式電子顯微鏡掃描，可見細胞於支架中的生長情形。植入 24 及 36 週以 X 光放射線照影評估牙齒生長情形，並於 36 週犧牲豬隻及兔子以組織切片評估；對照組為取其白齒後不種入細胞/支架者 6 隻，及取白齒組織後僅中入不含細胞的支架之豬隻 3 頭。6 頭植入細胞/支架的豬隻，3 頭在原齒槽骨出現放射不透明區域，而 3 頭在 X 光放射線照影則無任何發現。3 頭在原齒槽骨出現放射不透明區域的豬隻，其中一頭可見約 $1 \times 0.5 \times 0.5 \text{ cm}^3$ 牙齒萌發於口腔外；一頭則在齒槽骨內可見牙齒鈣化型態；另一頭則是出現直徑 1 cm 的放射線不透明區域。萌發的牙齒進行 H&E 染色可見 Dentin/pulp-like complex 之牙齒相關結構出現，而 Goldner's 及免疫化學等染色則在進行中。兔子再生豬牙齒試驗上則無任何發現。對照組取牙齒組織相對位置都無牙齒生長。本研究證實可由組織工程的方法達成牙齒再生，也證實牙齒幹細胞存於牙髓組織中。

關鍵字：齒芽細胞、支架、組織工程、牙齒再生。

英文摘要：

Tooth lost due to periodontal disease, dental caries, trauma, or varieties of genetic disorders continuing to affect human and animals adversely at some time in their lives. A biological regenerated tooth could replace lost tooth, the new substituted tooth would provide a vital alter-native to currently available clinical treatments. For this purpose, we used a tissue engineering approach to research the tooth regeneration. Using surgical operation to remove 1.5 month-old miniature pig molar tooth before eruption and placed into 30 mL of DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)+1.5 % PC /ST (Penicillin/streptomycin) at 4°C. Dental bud tissues were washed by 1X in PBS (Phosphate buffer saline), minced into $< 1 \text{ mm}^3$ pieces, and then cultured in DMEM +1.5 % PC /ST + 20 % FCS at 37°C with 5 % CO_2 . After 3 weeks cell yielded 1×10^7 cells, and seeded cells onto Gelatin-Chondroitin-Hyaluronan,

Tri-copolymer scaffold. Cultured for one week, dental stem cells were migrated into and attached the scaffold. The cell/scaffold constructs were implanted in both autograft into pig and xenograft into rabbit. In addition, a piece of little cell/scaffold sample was fixed individually with 10 % neutral formalin and 2.5 % glutaraldehyde, and then growing cells were demonstrated in scaffold by histological section analysis and Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) individually. In experimental groups: 6 pigs were implanted with cells/scaffold (C/S) into original alveolus, rabbits were implanted with C/S into subcutaneous tissue near the end costal cartilage. After growing in pigs and rabbits for 24 and 36 weeks, There were regenerated growing teeth could found in 3 pigs by X ray examination, especially a recognizable $1 \times 0.5 \times 0.5 \text{ cm}^3$ size tooth formed in swine alveolus bone by evaluated with radiography, but the other 3 pigs were no found. In rabbit we did not saw anything-like tooth in original implanted place. There was a tooth containing dentin/pulp-like complex tooth structure was appeared by hematoxylin and eosin staining in histological analysis. In control groups: removed molar tooth but did not implanted cell/scaffold 6 pigs group and merely implanted scaffold 3 pigs group. After growing for 24 and 36 weeks in pigs, no any regenerated tooth was grown in original place. Our results demonstrated regeneration of tooth structures could achieved by apply tissue engineering technique and suggested that dental stem cells appearance in dental pulp tissues.

Keywords: dental bud cell, scaffold, tissue engineering, tooth regeneration

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	I - II
前言.....	1
研究目的.....	1
文獻探討.....	2
研究方法.....	2-6
結果.....	6-20
討論與結論.....	21-22
參考文獻.....	22-25
計畫成果自評.....	25-26

前言：

牙齒形成起始於口腔上皮來源的牙齒層細胞 (Dental lamina cell)，在牙齒層細胞的初步分子訊息中包括發育過程中之上皮 (Epithelium) 及間葉 (Mesenchyma) 組織之間相互訊息傳導 (Jernvall and Thesleff, 2000; Peters and Balling, 1999; Sadler, 2003)。牙齒發育期間，牙齒間葉細胞分化為牙髓 (Dental pulp)，而上皮內層細胞則形成齒質 (Dentin) 的成齒質細胞 (Odontoblast)，上皮外層細胞形成牙釉質母細胞 (Ameloblast) 進而形成牙釉質 (Enamel)，最後由各種因子的調控成牙齒結構 (Peters and Balling, 1999)。數十年來，學者一直試圖以組織工程方式製造出牙齒，包括在體外以牙胚培育牙齒的生長 (Glasstone, 1967; Glasstone, 1936) 或是在體內不同的位置使牙齒生長 (Koyama *et al.*, 2003; Mooney *et al.*, 1996)。組織再生工程的突破與發展仍需致力於研究細胞的生長過程，但這一方面的研究仍停留在初期階段，要使之達到成功的境界，仍有賴針對細胞之間的互動加以探討並研發合適的支架 (Scaffold) 材料 (Solchaga *et al.*, 2001)。Young 等人的生物可解性支架材料製造方法是根據過去用以製造小腸使用的生物材料設計法 (Choi and Vacanti, 1997; Duailibi *et al.*, 2004)，將牙齒組織取下的細胞放入支架，再將支架植入動物體內 (Duailibi *et al.*, 2004, Young *et al.*, 2002)，其結果可形成完整的牙冠組織。

Stem cell (幹細胞)、訊號傳遞 (Signal) 及支架為再生醫學的三大要素基礎 (Iohara *et al.*, 2004)。牙髓包括 Progenitor/stem cell (生成前質/幹細胞) 可增殖且分化形成 Dentin 前之 Odontoblast (Gronthos *et al.*, 2002)。Morphogens 為細胞外的分泌訊號，管制上皮和間葉組織間牙齒形態的發生 (Nakashima and Reddi, 2003; Thesleff and Sharpe, 1997)。另一方面細胞的生長也需要細胞外基質的支撐，而在細胞外基質形成前可使用支架來提供細胞生長及貼附，並在植入動物體內的同時將細胞固定於同一位置。

目前已有學者利用組織工程方法製造齒槽骨及重建修復由腫瘤、蛀牙或牙周病所造成的口腔病變 (Abukawa *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2000)。另一方面，也有學者在組織工程突破性的以生物性牙齒成功的在大鼠體內生成完整牙冠並準確的形成 Enamel、Dentin 及牙齒相關組織 (Duailibi *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2002)。

研究目的：

牙周疾病、蛀牙、撞傷或病變造成牙齒缺損。牙齒缺損可能改變其他牙齒的活動、咀嚼困難及缺乏個人自信心。現今有幾個方法放回牙齒，包括：使用假牙、橋接及植入物等，都為非生物技術且沒有一種是安全無憂的。若能發展生物性的牙齒再生以取代缺損的牙齒，將牙齒永久放回原先位置為一種令人滿意的治療方式。本實驗之研究目的是利用組織工程達成牙齒再生。

文獻探討：

牙齒形成起始於外胚層衍生的上皮組織及來自神經脊的間葉組織 (Modino and Sharpe, 2005; Nakashima and Reddi, 2003; Ohazama *et al.*, 2004)。這些過程由增厚的口腔上皮形成牙齒層細胞 (Dental lamina)，深入間葉組織形成齒芽 (Bud) 階段，其後進一步向下形成齒帽 (Cap) 及齒鐘 (Bell) 階段 (Nakashima and Reddi, 2003)。圍繞在牙齒上皮的間葉組織形成牙乳突 (Dental papilla)，向上分化為牙髓及牙本質母細胞 (Odontoblast)。Bell 階段之 Odontoblasts 形成齒質 (Dentin)，而牙釉質母細胞 (Ameloblasts) 形成牙釉質 (Enamel)。牙齒周圍間葉細胞可形成牙釉質器官，包括牙濾泡及延伸至周圍的上皮組織 (Nakashima and Reddi, 2003)。最後牙冠形成完整時牙齒萌發突出口腔齒齦 (Thesleff and Sharpe, 1997)。生物可解性高分子支架可提供細胞生長、貼附，並在植入動物體內的同時將細胞固定於同一位置 (Changa *et al.*, 2003)。本實驗所使用的支架材料由明膠 (Gelatin)、軟骨素 (Chondroitin)、透明質酸 (Hyaluronan) 三重聚合物所組成。明膠有助於細胞的生長、貼附及維持細胞活性；軟骨素促進細胞分泌 Proteoglycan 和 Type II collagen；透明質酸有助於細胞遷移作用並使細胞在支架中均勻分布 (Changa *et al.*, 2003)。

組織工程涉及各種領域，經由植入體外生長的細胞/組織或刺激細胞生長產生細胞外基質來研究組織的再生作用及恢復器官的功能 (Nakashima *et al.*, 2005)。在可見的未來組織工程為一強大的方法來修復組織或器官 (Zhang *et al.*, 2005)。學者在牙齒組織工程突破性的以生物性牙齒成功的在大鼠體內生成完整牙冠並準確的形成 Enamel、Dentin 及牙齒相關組織 (Duailibi *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2002, 2005)。

研究方法：

(一) 牙胚細胞培養：外科手術由下顎骨為萌發的白齒取出的牙胚組織切碎成小於 1 mm^3 ，培養於 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (BIO T 043, 進偕®, USA)+1.5 % Penicillin/streptomycin 100 100X (PC /ST) (BIO A 2213, 進偕®, USA)+ 20 % Fetal calf serum (FCS) (BII 04-001-1A, 進偕®, USA) 約三週，使細胞量達 1×10^6 ；(二) 細胞種入支架：將培養的牙胚細胞種入支架內約一週，使細胞生長並均勻分布於支架中；(三) 植入動物方式：將含有細胞的支架埋入同源豬的口腔原齒槽內及咬肌面骨質中；兔子則植入末端肋軟骨皮下；(四) 術後評估：植入 24 及 36 週以放射線照影評估牙齒生長情形，一年後犧牲以組織切片評估牙齒發育情形。牙齒組織進行組織染色，包括：H&E 及 Goldner's 染色等。而牙釉質特有的 Amelogenin 及齒質特有的 Bone sialoprotein 亦將利用 Vectinstain ABC kit 進行免疫組織化學分析。

一. 實驗動物分組

1. 豬隻分組：

所使用之豬隻為 12 頭。分成 3 組，第一組豬隻有 6 頭，分別將種有豬隻牙胚細

胞/支架自體植入已清除整個未萌發白齒達四週之齒槽及咬肌面骨質中，第二組豬隻有 3 頭，只在原先已清除整個未萌發白齒之槽直接植入支架（不種牙胚細胞之支架），第三組之豬有 6 頭，由下顎齒槽取出未萌發白齒的牙齒組織之後，就不再種入牙胚細胞或支架。第二及第三組作為對照組。

2. 兔子分組：

所使用之兔子為 14 頭。分為 6 組，每組分別異體異種植入 6 頭豬隻之牙胚細胞/支架於末端肋骨之皮下（劍狀軟骨向上約 0.5-1 cm 位置之左側或右側）。

二. 明膠軟骨素透明質酸三重聚合物支架大小

明膠軟骨素透明質酸三重聚合物支架的大小為 1x1x1.5 cm 之長方體。將此支架切成大小接近相等的三個部分，分別植入豬隻原齒槽骨、原齒槽骨下方之下顎骨咬肌面骨質中及兩隻兔子末端肋軟骨之皮下（劍狀軟骨上方約 0.5-1 cm 位置之左側或右側）。種入細胞的支架植入原豬隻佔的比例為 2/3，而每隻兔子的比例則為 1/6。

三. 手術及麻醉

1. 豬隻手術及麻醉：

豬隻先禁食約 8-12 小時後，以 Atropine (Atropine sulfate®, Tai yu, Taiwan) 0.07-0.09 mg/Kg *i. m.* 抑制唾液腺分泌及嘔吐現象，避免麻醉過程造成吸入性肺炎。麻醉前給藥注射 Tiletamine 和 Zolezepam 1:1 之混合液 (Zoletil®, 維克法蘭斯股份有限公司，法國) 0.55-0.8 mg/Kg *i. m.*，使豬隻鎮靜並達淺層麻醉狀態。豬達鎮靜後慢慢給於 Thiamylal (Citosol®, 杏林新生製藥股份有限公司，中華民國) 1.11-1.66 mg/kg *i. v.* 達深層麻醉。術後給予抗生素 Cephalosorin (Cephazolin, 信東生技股份有限公司，中華民國) 3 mg/Kg *i. m.* 預防二次性細菌感染。

分為三個時期進行

A. 約 1.5 月齡迷你豬先禁食約 8-12 小時後，以 Atropine sulfate® 0.07-0.09 mg/Kg *i. m.* 抑制唾液腺分泌及嘔吐現象，避免麻醉過程造成吸入性肺炎及窒息死亡。麻醉前給藥注射 Zoletil® 0.55-0.8 mg/Kg *i. m.*，使豬隻鎮靜並達淺層麻醉狀態。豬隻麻醉後以左側或右側躺位置並將下顎向上抬高傾斜約 30 度角以 0.06 sec、46~50 kv、150 mA 進行 X 光放射線照影，確認未萌發白齒相對位置。其後給於 Thiamylal 1.11-1.66 mg/kg *i. v.* 達深層麻醉。在豬隻麻醉後，於手術部位的下顎咬肌面（由嘴角後緣至耳朵基部，上至下眼窩下至頸部）進行剃毛、刷洗，再以優點消毒術部。手術部位舖上洞巾，並在術部給予局部麻醉劑 Lidocaine (ORA®, Showa yakuhin kako co., Ltd., Japan) 2.0 mg/kg 減輕疼痛。由未萌發白齒相對位置之下顎咬肌面前緣至後緣以手術刀劃開皮膚及肌肉。向下翻開咬肌露出下顎骨，以骨鑿子在未萌發白齒齒槽外側方挖洞。移除骨組織後可見牙胚組織，將牙胚組織取下放入含 1.5 % PC/ST 之 DMEM 中。其後將相對位置之肌肉及皮膚進行縫合即可。

B. 經過一個月後以同樣方式進行手術將培養於支架的牙胚細胞植回原齒槽位置

，並在齒槽骨下方之咬肌面骨組織鑿一個洞也將種入牙胚細胞/支架植入此處。
C. 牙胚細胞/支架植入豬隻後，經 24 及 36 週各以 0.06 sec、60~70 kv、150 mA 進行X光放射線照影評估牙齒生長情形。其後以Citosol[®]給予過量進行安樂死。豬隻安樂死後，取下整個下顎骨再進行一次X光放射線照影確定牙齒是否有生長。生長的牙齒組織以 10 %中性福馬林進行固定，其後以組織學方法評估之。

2. 兔子手術及麻醉：

約一月齡之紐西蘭白兔禁食約 8-12 小時後，麻醉前須先以Atropine sulfate[®] 0.2-1 mg/kg *i. m.*，抑制唾液分泌及嘔吐現象，避免麻醉過程造成吸入性肺炎及窒息死亡。。其後依美國實驗動物學會推薦之 ketamine (Ketalar[®]，派德股份有限公司，中華民國)35 mg/kg 及 Xylazine(Chanzine[®]，Chanelle pharmaceuticals manufacturing Ltd., USA)混合後 5 mg/kg *i. m.* 進行麻醉。

兔子手術過程：

分為兩個時期進行

- A. 紐西蘭白兔如上進行麻醉後，先以電剪在胸部左右兩側進行剃毛，其後進行刷洗再以優點消毒術部。覆蓋上洞巾，確定劍狀軟骨相對位置，向上約 0.5 -1.0 cm 處開約 1 cm 大小傷口。傷口向下進行鈍剝，將肋間肌剝開後以止血鉗撐開植入豬牙胚細胞/支架。其後縫合皮下及皮膚即可。
- B. 牙胚細胞/支架異體異種植入紐西蘭白兔體內，經 24 及 36 週各以 0.06 sec、44~45 kv、150 mA 進行 X 光放射線照影確定牙齒是否有生長。其後以 ketamine 35 mg/kg 混合 Xylazine 5 mg/kg *i. m.* 給於過量進行安樂死。兔子安樂死後，取下整個胸部肌肉以 10 %中性福馬林進行固定，其後以組織學方法評估之。

四. 材料與方法

1. 牙胚細胞培養液之配製：

使用的培養基為DMEM，將DMEM粉末以二次蒸餾水依比例混合配置後，在每公升DMEM中加入 3.7 g NaHCO₃，之後再以PH儀將PH值調製 7.2-7.4。配置完成後於無菌操作台內以 0.22 μm 過濾膜接上真空幫浦進行過濾，其後加入 20% FCS 及 1.5% PC/ST。

2. Phosphate Buffered Saline (PBS)溶液之配製：

一公升的二次蒸餾水中加入Na₂HPO₄ 10.9 g、NaH₂PO₄ 3.2 g及NaCl 90 g混合均勻後將PH值以PH儀調至 7.2，此PBS為 10 倍濃度。使用時以二次蒸餾水 1:10 稀釋並且將PH值調至 7.2。10 或 1 倍的PBS經滅菌後儲存於 4°C 即可。

3. 2 mM Ethylene Diaminetetraacetic Acid (EDTA) 之 PBS 溶液配製：

一公升一倍之 PBS 中加入 0.5 g 之 EDTA，充分混合後經滅菌儲存於 4°C 即可。

4. 從豬隻體下顎齒槽骨分離牙齒組織：

1.5 個月（體重約 10 kg）之迷你豬，進行麻醉後以放射線照影確認未萌發白齒相對位置，以外科手術取下。分離的白齒組織放入約 20 ml 含 1.5 % PC/ST 之 DMEM 中，先存放於 4°C。

5. 牙胚組織之分離：

所有程序及用具以 70~75 %酒精消毒，器械或瓶口使用前先於酒精燈上過火，所有過程皆於無菌狀態下進行。將裝有牙齒組織之DMEM倒入無菌Dish中，並將培養液以Section接上無菌玻璃吸管吸乾。其後Pipet-aid裝上 1 ml Pipete吸取 1 倍回溫（約 37°C）PBS溶液來沖洗牙齒組織上的血塊和血跡。之後再將 Phosphate Buffered Saline (PBS)溶液以Section吸乾，重複數次直到牙齒組織沒有殘留血液。之後一手持攝子另一手使用無菌手術刀於Dish上將牙胚組織及鈣化的牙齒組織分離。鈣化組織丟棄，並將牙胚組織以攝子夾入新的dish中。並將牙胚組織分成適當大小於不同Culture dish內。其後將牙胚組織切碎成小於 1 mm³的小片段，並加入 10 ml 已回溫（約 37°C）1.5 % PC/ST和 20 % FCS之DMEM，充分混合後置於 37°C，5 % CO₂培養箱中培養。經 3-4 天更換培養液一次，經數週使細胞數量達 1×10⁶-10⁷個。

6. 牙胚細胞的獲得及細胞計數：

細胞培養約 3 週，將 Culture dish 內的培養液於無菌操作台內以 Section 吸乾，加入 1-2 ml 回溫（約 37°C）含有 2mM EDTA 之 PBS 於培養牙胚細胞 Dish 內，均勻震盪，使該溶液充分佈滿整個 dish。由於 EDTA 會至換細胞中的鈣離子，而使牙胚細胞在缺乏鈣離子情況下由 Dish coating 膜上被沖洗下來。經過約 1-2 分鐘後在 Dish 中加入含 1.5 % PC/ST 和 20 % FCS 之 DMEM 反覆潤洗，之後再將全部液體收集於離心管中。離心管中的細胞液以吸管懸浮後，取約 100 μl 和相等體積之 0.5 % Trypan blue 混合後滴於血球計數盤上於顯微鏡下進行計數。其他細胞液則以 1500 r. p. m.、4°C 離心 5 分鐘將細胞離心下來，其後將上層液體吸乾加入新的培養液，至於 4°C 備用。

7. 製備明膠軟骨素透明質酸三重聚合物支架：

將 0.5g Gelatin (102K0059, Sigama Co., USA) powder、0.1g Chondroitin-6-sulfate (C6S) (C4384-5G, Sigama, USA) powder 和 0.5 mg Sodium hyaluronate (HA) (WA18181, Fluka, USA) 加入 7 mL 的二次蒸餾水隔水加熱（溫度約 35-40°C）攪拌，以 2 mL 1% 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDAC, PH 5-6) 溶液加入該液中進行交聯。然後將溶液冰於 -20°C，1 小時，再移至 -70°C，一小時，之後進行冷凍乾燥 72 小時。將乾燥之支架浸泡於 10 mL 0.2% EDAC (PH 5-6) 溶液中，24 小時進行第二次交聯。再將支架進行冷凍乾燥 72 小時，即完成支架之製備。明膠軟骨素透明質酸三重聚合物支架使用前泡於 70~75 % 酒精滅菌，至少三小時。種入細胞前先以 PBS 清洗至少 5 次將酒精至換出來，種入細胞前先將 PBS 吸乾，即可種入細胞。

8. 牙胚細胞種入明膠軟骨素透明質酸三重聚合物支架：

離心後的細胞將上層的培養液吸出，再加入少於要種入支架體積之培養液，並懸浮細胞於培養液中。懸浮的細胞以 26 G 針頭接針筒抽出後直接均勻打入支架中。種入細胞的支架靜置約 15 分鐘，小心放入血清瓶底端具有攪拌磁棒之含 1.5 % PC/ST 和 20 % FCS 之 DMEM 之 Spinner flasks 中，37°C，5 % CO₂ 培

養箱中培養。將攪拌磁棒轉速調為 70 r. p. m.，藉磁棒攪拌使培養液均勻分佈於支架中。隔天，將轉速調為 50 r. p. m.，細胞種入支架中培養約 5 天。

9 組織學分析：

將發育的牙齒組織以 10% 中性福馬林固定至少六小時以上，其後以 22.5% v/v Formic acid (A0208003001, Acros, USA) 和 10% w/v Sodium citrate (6274H, MP biomedical, Inc., Taiwan) 脫鈣，經例行性的脫水後再以石臘包埋。包埋之組織切成小於 4 μm 製作成切片。將切片置於 56°C 烘箱中處理 4 小時以上，進行以下組織分析包括：Hematoxylin and eosin (H&E; Stevens *et al.*, 1990); 和 Goldner's 染色 (Stevens *et al.*, 1990)。藉由 H&E 染色了解牙齒組織形態；而 Goldner's 染色法則可將 Dentin 染成藍色，新形成的 Enamel 基質染成紅色，而成熟的 Enamel 則染成灰色 (Duailibi *et al.*, 2004)。

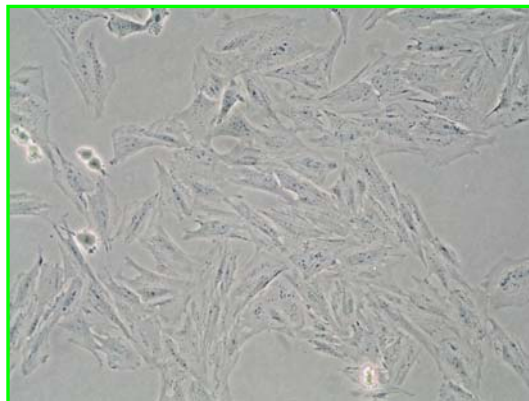
10. 免疫組織化學分析：

免疫化學分析採用商品化 Vectastain ABC kit (兔抗豬的 Amelogenin polyclonal antibody) 來檢測生物工程形成之牙齒成分，檢測其 Enamel 內的 Amelogenin 是否有表現；另一方面則是檢測 Dentin (兔抗豬的 Dentin sialoprotein protein polyclonal antibody) 中特有的 Bone sialoprotein protein 是否也有表現 (Young *et al.*, 2002)。

結果：

一. 牙胚細胞培養情形

1. 牙胚細胞培養之數量及存活率：牙胚細胞生長的型態為紡垂形，如圖一。將培養的細胞洗下，以 0.5 % Trypan blue 染色進行細胞計數，其培養的細胞數目平均值約 1×10^7 個左右，而細胞的存活率平均值在 85 % 左右，如表一所示。



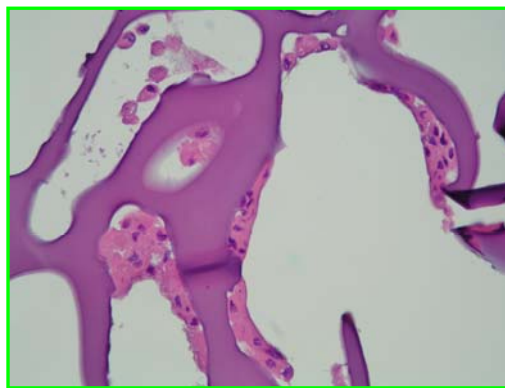
圖一. 牙胚細胞形態 (400X)。

表一. 豬隻牙胚細胞培養數目及細胞存活率

Ear number of swine	cell numbers	Cell viability
P129-2 ♂	4.1×10^5 cell/ml	89.9 %
P132-3 ♂	2.1×10^7 cell/ml	92.3 %
P132-7 ♀	1.3×10^7 cell/ml	90.9 %
P133-1 ♂	1.0×10^7 cell/ml	89.6 %
P137-3 ♂	9.5×10^6 cell/ml	83.5 %
P139-1 ♀	1.0×10^7 cell/ml	90.1 %
P153-2 ♂	1.1×10^7 cell/ml	80.0 %
P161-1 ♂	5.2×10^7 cell/ml	80.6 %
P153-2 ♂	4.9×10^7 cell/ml	90.0 %

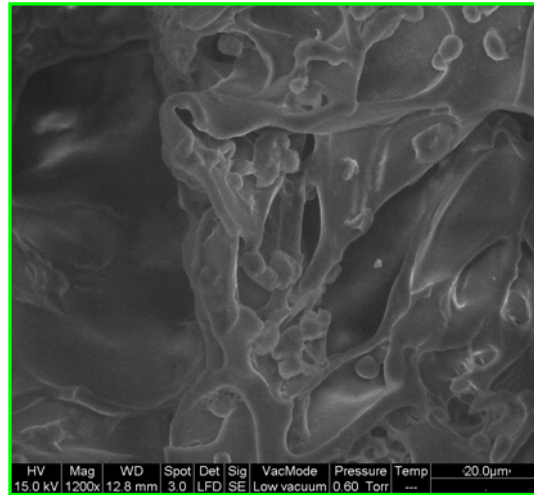
2. 細胞在支架中生長情形

A. 細胞種入支架進行 H&E 染色：細胞種入支架後於培養液中培養約一週後，將部分支架以 10 % 中性福馬林進行固定。其後以石蠟包埋切成切片後進行 H&E 染色。由圖二，可見細胞攀附於支架上的情形。



圖二. 細胞種入支架進行 H&E 染色
(400X)。

B. 細胞種入支架以環境掃描式電子顯微鏡掃描：細胞種入支架後於培養液中培養約一週後，將部分支架以 2.5 % 戊二醛進行固定。其後以 freeze fracture 的方式將支架裂解，其後以環境掃描式電子顯微鏡進行支架表面掃描。如圖三，可觀察細胞攀附於支架上的情形。並且由圖中推算牙胚細胞的直徑約為 $5 \mu\text{m}$ 。



圖三. 環境掃描式電子顯微鏡下之細胞於支架中生長情形 (1200X)。

二. 豬隻取牙齒組織前、後進行 X 光放射線照影，將未萌發的白齒牙齒組織以外科手術從豬隻下顎骨第一至三白齒間取出。牙齒組織分離後進行牙胚細胞培養約三週，再將細胞種入支架一週後植入實驗動物(牙胚細胞/支架自體移植原豬隻齒槽骨和咬肌面骨質中、異體植入不同豬隻之胸部位置；異體異種植入豬的牙胚細胞/支架於兔子末端肋軟骨之皮下)經過 24 及 36 週以 X 光放射線照影評估牙齒生長情形。

1. 牙齒再生實驗於豬隻：

A. 對照組：a. 豬隻取出牙齒組織後不再種入細胞或支架的豬隻有六隻。如圖四～二十一，可見耳號為 129-3 ♀、129-4 ♀、P132-1 ♂、P132-4 ♀、P139-2 ♂、P139-3 ♀，取出牙齒組織後經過 36 週，取牙齒相對位置無牙齒生長情形。

b. 三頭豬隻取出牙齒組織後僅種入不含細胞之支架，此部分未評估。

129-3 ♀



圖四. 取牙齒組織前之 X 光放射線照影。

圖五. 取牙齒組織後之 X 光放射線照影。



圖六. 取牙齒組織後達 36 週將豬
隻犧牲進行 X 光放射線照影。

129-4 ♀



圖七. 取牙齒組織前之 X 光放射線照影。



圖八. 取牙齒組織後之 X 光放射線照影。



圖九. 取牙齒組織後達 36 週將豬隻犧牲進行 X 光放射線照影。

P132-1 ♂



圖十. 取牙齒組織前之 X 光放射線照影。



圖十一. 取牙齒組織後之 X 光放射線照影。



圖十二. 取牙齒組織後達 36 週將豬
隻犧牲進行 X 光放射線照影。

P132-4 ♀



圖十三. 取牙齒組織前之 X 光放射線照影。



圖十四. 取牙齒組織後之 X 光放射線照影。



圖十五. 取牙齒組織達 36 週將豬隻犧牲進行 X 光放射線照影。

P139-2 ♂



圖十六. 取牙齒組織前之 X 光放射線照影。



圖十七. 取牙齒組織後之 X 光放射線照影。



圖十八. 取牙齒組織後達 36 週將豬隻犧牲進行 X 光放射線照影。

P132-3 ♀



圖十九. 取牙齒組織前之 X 光放射線照影。



圖二十. 取牙齒組織後之 X 光放射線照影。



圖二十一. 取牙齒組織後達 36 週將豬隻犧牲進行 X 光放射線照影。

- b. 實驗組：(1) 豬隻取出牙齒組織後，牙胚細胞培養三週後種入支架培養一週自體移植原豬隻的齒槽骨及咬肌面骨質中，其豬隻耳號為 P137-3 ♀、P133-1 ♂、P132-7 ♀、P139-1 ♀、P132-3 ♂、P129-2 ♂。如圖二十二～四十六，可見豬隻取牙齒組織前、後之 X 光放射線照影，及 36 週將豬隻犧牲進行 X 光放射線照影評估牙齒生長情形。其中可見 P132-3 ♂、P129-2 ♂ 在原齒槽位置有牙齒鈣化型態出現，而 P137-3 ♂ 則在齒槽骨出現放射線不透明區域。其餘 P133-1 ♂、P132-7 ♀、P139-1 ♀ 則在 X 光放射線下無任何發現。

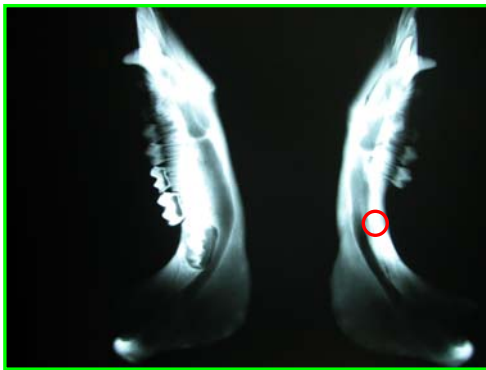
P137-3 ♂



圖二十二. 取牙齒組織前之 X 光放射線照影。



圖二十三. 取牙齒組織後之 X 光放射線照影。



圖二十四. 植入牙胚細胞/支架達 36 週將豬隻犧牲進行 X 光放射線照影。



圖二十五. 左側圖放高倍，可見齒槽骨出現直徑約 1 cm 之放射線不透明區域。

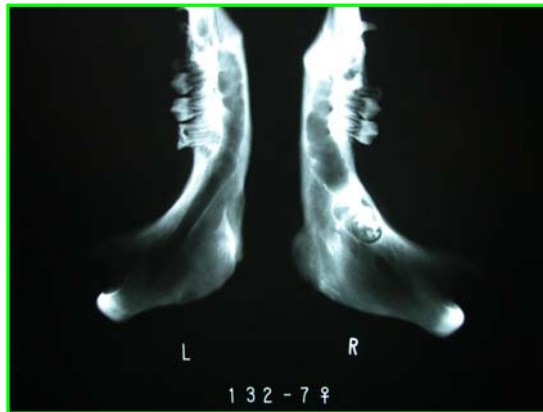
P133-1 ♂



圖二十六. 取牙齒組織前之 X 光放射線照影。



圖二十七. 取牙齒組織後之 X 光放射線照影。



圖二十八. 植入牙胚細胞/支架達 36 週
將豬隻犧牲進行 X 光放射線
照影，於原齒槽骨無任何發
現。

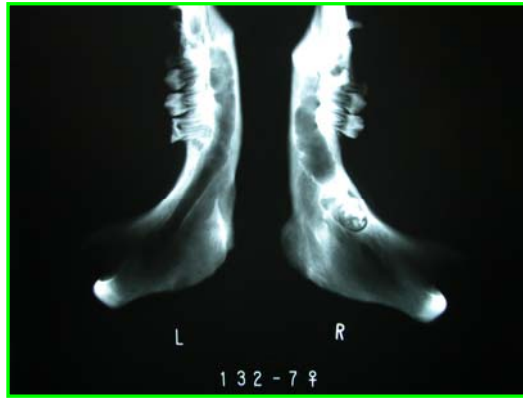
P132-7♀



圖二十九. 取牙齒組織前之 X 光放射線
照影。



圖三十. 取牙齒組織後之 X 光放射線
照影。



圖三十一. 植入牙胚細胞/支架達 36 週
將豬隻犧牲進行 X 光放射線
照影，於原齒槽骨無任何發
現。

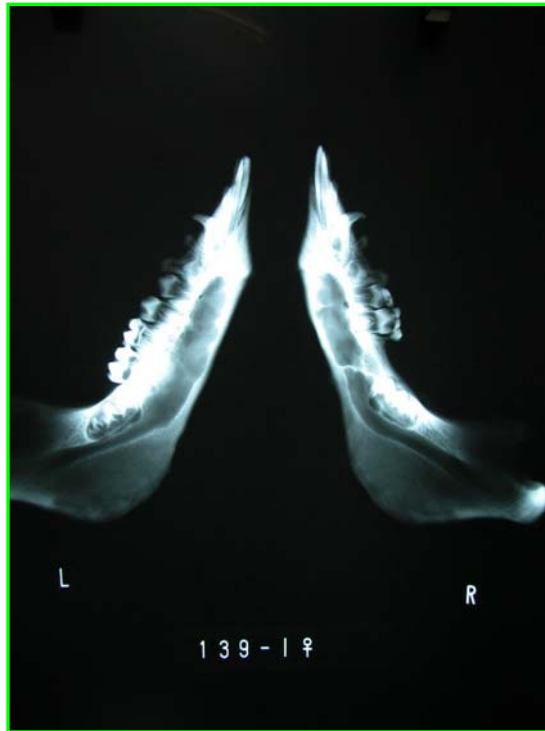
P139-1 ♀



圖三十二. 取牙齒組織前之 X 光放射線
照影。



圖三十三. 取牙齒組織後之 X 光放射線
照影。



圖三十四. 植入牙胚細胞/支架達 36 週
將豬隻犧牲進行 X 光放射線
照影，於原齒槽骨無任何發
現。

P132-3 ♂



圖三十五. 取牙齒組織前之 X 光放射線
照影。



圖三十六. 取牙齒組織後之 X 光放射
線照影。



圖三十七. 植入牙胚細胞/支架達
36 週將豬隻犧牲進行
X 光放射線照影。



圖三十八. 左側圖放高倍，可見齒
槽骨內有牙齒鈣化型
態出現。

P129-2 ♂



圖三十九. 取牙齒組織前之 X 光放射
線照影。



圖四十. 取牙齒組織後之 X 光放射線照
影。



圖四十一. 植入牙胚細胞/支架達
36 週將隻犧牲之下顎照
，可見牙齒萌發於口腔外
。



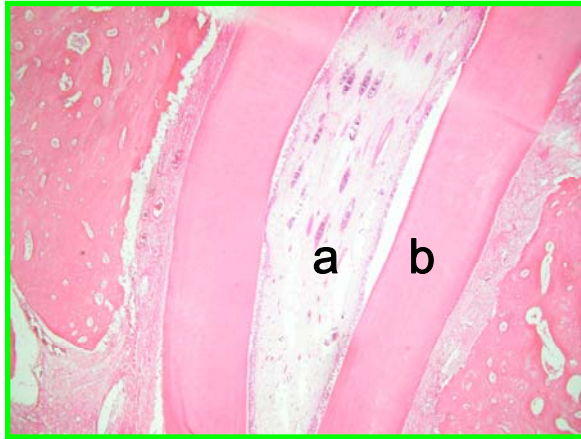
圖四十二. 植入牙胚細胞/支架
達 36 週將豬隻犧牲
進行 X 光射線照影，
可見牙齒生長。



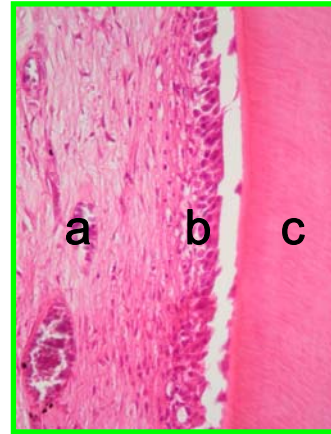
圖四十三. 將牙齒生長相對位置剖開
，可見生長約 1 cm 之牙齒。



圖四十四. 將該組織製作
成切片，進行
H&E 染色。



圖四十五. 製作成切片，在顯微鏡下可見牙髓(a)及Dentin組織(b) (100X)。



圖四十六. 左圖放高倍，可見牙髓(a)、Odontoblast(b)及Dentin(c)組織(400X)。

(2)三頭豬取出牙齒組織後，其牙胚細胞培養三週後分別種入支架培養一週植入異體豬隻的胸部皮下三個位置，如圖。如圖四十七~四十八，在24週時在其中一個位置發現放射線不透明區域出現。

P174-4 ♂



圖四十七. 將不同豬的牙胚細胞/支架種入同一隻豬的胸部皮下。



圖四十八. 種入達24週時，在其中一個位置可見放射線不透明區域出現。

2. 牙齒再生實驗於兔子：

為了瞭解異體異種移植的情形，將豬隻牙胚細胞/支架種入兔子末端肋軟骨之皮下。經過24及36週分別以X光放射線照影進行評估。所有兔子植入位置無任何鈣化情形出現，剖解時除了在開刀相對位置發現脂肪組織比另一側未植入的位置有增多情形其他則無任何發現。

討論與結論：

成人幹細胞 (Adult stem cells) 為多潛能功用且具有高度的可塑性 (Zhang *et al.*, 2005)。這些細胞包括牙齒牙髓幹細胞 (Dental pulp stem cells; DPSCs) 和骨髓基質細胞 (Bone marrow stromal cells; BMSCs) 都可被導入進行生牙作用，參與牙齒的形成 (Gronthos *et al.*, 2000; Masako *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005)。成年動物牙本質的修復主要來自於位於牙髓組織中的前驅細胞集團活化 Odontoblasts 而修復 (Duailibu *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005)。Gronthos 等人證實可分離具有 BMSCs clonogenic 特徵及具有增生能力的 DPSCs (Gronthos *et al.*, 2000)。維持這些 DPSCs 的高增殖速度甚至繼代多次，在初代培養可產生 Stromal-like cell 且在免疫缺陷鼠背部再生 Dentin/pulp-like complex (Batouli *et al.*, 2003; Gronthos *et al.*, 2000; Masako *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005)。由本實驗的結果也證實可由 DPSCs 的培養再種入可生物降解支架，自體植入原豬隻的齒槽骨可形成 Dentin/pulp-like complex。DPSCs 具有自行更新、分化成不同後裔及形成群落 (Clonogenic) 的能力 (Zhang *et al.*, 2005)，再次被證實。

生物可解性高分子支架可提供細胞生長、貼附，並在植入動物體內的同時將細胞固定於同一位置 (Changa *et al.*, 2003)。本實驗所使用的支架材料由明膠 (Gelatin)、軟骨素 (Chondroitin)、透明質酸 (Hyaluronan) 三重聚合物所組成。明膠的功能有助於細胞的生長、貼附及維持細胞活性；軟骨素則促進細胞分泌 Proteoglycan 和 Type II collagen；透明質酸有助於細胞遷移作用使細胞可在支架中均勻分布 (Changa *et al.*, 2003)。明膠軟骨素透明質酸三重聚合物支架使用於軟骨細胞的培養，且以 Spinner flask 方式培養效果較佳 (Changa *et al.*, 2003)。本實驗使用該支架種入牙胚細胞後也以 Spinner flask 方式培養。植入牙胚細胞/支架的豬隻，六頭中有三頭在原齒槽骨出現放射不透明區域，而三頭在 X 光放射線照影則無任何發現。三頭在原齒槽骨出現放射不透明區域的豬隻，其中一頭可見牙齒萌發於口腔外；一頭則在齒槽骨內可見牙齒型態；另一頭則是出現圓形的放射線不透明區域。證據顯示牙胚細胞可貼附於支架上，但值得一提的是該支架是否適合牙胚細胞生長並遷移而均勻分散於支架中仍須進一步探討。由牙胚細胞/支架的組織切片我們發現細胞的遷移作用在培養一週時的效果不佳，應增長培養的時間。但為了避免 Spinner flask 方式培養可能造成細胞由支架上掉落的風險，建議培養後的細胞種入支架後直接植入動物體內。這樣不但可以確保細胞種入支架中的實際數目，還可探討牙胚細胞數目的多寡是否決定牙齒生長的速度及大小。牙齒形成起始於口腔上皮來源的牙齒層細胞 (Dental lamina cell)，在牙齒層細胞的初步分子訊息中包括發育過程中之上皮 (Epithelium) 及間葉 (Mesenchyma) 組織之間相互訊息傳導 (Jernvall and Thesleff, 2000; Peters and Balling, 1999; Sadler, 2003)，進而發展成牙齒結構 (Nakashima and Reddi, 2003)。在許多器官的發育中皆是以此種作用模式形成，例如：毛髮、乳腺、唾液腺、胰島腺等，而其中牙齒的發育是最典型的例

子(Kollar 1972, Lumsden 1988, Slavkin 1972, 1974, 1988, 1992, 1997, Slarkin *et al* 1977, 1984, 1994)。許多生長因子及轉錄因子已被鑑定出來，而且在不同牙齒發育的階段中已被確認（參考：<http://bite-it.helsinki.fi/>）。發育過程中的細胞及分子生物變化皆有許多的研究 (Linde and Goldberg, 1993; Zeichner-David *et al.*, 1995; Robey, 1996; Wu *et al.*, 1996; Bartlett and Simmer, 1999; Grzesik *et al.*, 2000; Jernvall and Thesleff, 2000; Saygin *et al.*, 2000; Diekwisch, 2001; Saito *et al.*, 2001)，部分詳細的分子訊息網已被建立，其中最重要的訊息家族為Bone morphogenetic proteins (BMPs)、Fibroblast growth factors (FGFs)、Hedgehog proteins (Hhs)和Wingless- and int-related proteins (Wnts) (Jernvall and Thesleff, 2000; Nakashima and Reddi, 2003)。因此，在牙胚細胞培養時或將細胞種入支架植入動物體內添加生長因子是否有助於細胞的分化進而形成相關的牙齒組織是值得探討的範疇。Nakashima和Reddi等人指出材質的形狀和大小控制修復Dentin的大小和形狀(Nakashima and Reddi, 2003)，因此是否將支架的形狀切成相關的牙齒形狀有助於萌發成相對應的牙齒仍須進一步證實。

本實驗中將豬牙胚細胞/支架異體植入另一頭豬隻胸部位置，可見放射線不透明區域出現。由本實驗異體移植的雛形得到初步的證實。豬隻牙胚細胞/支架在兔子異體異種移植方面由於免疫排斥上的問題需克服才能進一步的進行探討牙齒組織生長與否。其中可能要改變兔子植入豬隻牙胚細胞/支架的評估時間，例如：縮短拍攝X光放射線照影及分為不同週數進行犧牲或以藥物破壞其免疫系統再進行本實驗較具有實際意義。

我們的結果指出使用組織工程方式，再加上來自環境可能的訊號轉移因子可再生牙齒相關組織。

參考文獻：

- Abukawa H, Terai H, Hannouche D, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. Formation of a mandibular condyle in vitro by tissue engineering. *J Oral Maxillofac Surg* 61: 94-100, 2003.
- Bartlett JD, Simmer JP. Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med* 10: 425 - 441 , 1999.
- Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, and Shi S. Comparison of stem-cell mediated osteogenesis and entinogenesis. *J Dent Res* 82: 976-81, 2003.
- Bavetta LA, ed. Developmental aspects of oral biology. New York, Academic Press, 165 - 201, 1992.
- Changa CH, Liua HC, Lina CC, Choua CH, Lina FH. Gelatin-chondroitin hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 24: 4853 - 4858, 2003.

Choi RS, Vacanti JP. Preliminary studies of tissue-engineered intestine using isolated epithelial organoid units on tubular synthetic biodegradable scaffolds. *Transplant Proc* 29: 848 – 851, 1997.

Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol* 45: 695 – 706, 2001.

Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res* 83: 523–258, 2004.

Glasstone S. Development of teeth in tissue culture. *J Dent Res* 46: 858–861, 1967.

Glasstone S. The development of tooth in vitro. *J anat* 70: 260–266, 1936.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, and Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Cell Biology* 97: 13625–13630, 2000.

Grzesik WJ, Cheng H, Oh JS, Kuznetsov SA, Mankani MH, Uzawa K, Robey PG, Yamauchi M. Cementum-forming cells are phenotypically distinct from bone-forming cells. *J Bone Miner Res* 15: 52 – 59, 2000.

Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 92: 19 – 29, 2000.

Kollar EJ. Histogenetic aspects of dermal-epidermal interactions. In: Slavkin HC, Bavetta LA, ed. *Developmental aspects of oral biology*. New York , Academic Press Inc , 126 – 149, 1972.

Koyama E, Wu C, Shimo T, Pacifici M. Chick Limbs With Mouse Teeth: An effective in vivo culture system for tooth germ development and analysis. *Developmental dynamics* 226: 149 – 154, 2003.

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 679–728, 1993.

Lumsden A. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth. *Development* 103: 55 – 169, 1988.

Masako Miura, Stan Gronthos, Mingrui Zhao, Bai Lu, Larry W. Fisher, Pamela Gehron Robey, and Songtao Shi. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Cell Biology* 100: 5807–5812, 2003.

Miller NA, Béné MC, Penaud J, Ambrosini P, Faure GC. Periodontal application. In: Lanza PL, Langer R and Vacanti J, ed. *Principle of tissue engineering*. 2nd ed. Academic press, USA, 833–843, 2000.

Modino SAC, Sharpe PT. Tissue engineering of teeth using adult stem cell. *Archives of Oral Biology* 50: 255–258, 2005.

Mooney D, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering Dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog* 12: 865-868, 1996.

Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nature Biotechnology* 21: 1025-1032, 2003.

Ohazama A, Modino SAC, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 83: 518-522, 2004.

Peters H, Balling R. Teeth where and how to make them. *Trends Genet* 15: 59-65, 1999.

Robey PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. *Connect Tissue Res* 35: 131 - 136, 1996.

Sadler TW. Langman's medical embryology, 9th ed. Lippincott Williams & Wilkins , USA, 395-400, 2003.

Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Teranaka T, Narayanan AS. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 29: 242 - 248 , 2001.

Slavkin HC. Epithelial-mesenchymal induction. (Collection of five previously published papers). In: Acton RT, ed. Cellular induction: series on the mechanism of cell-cell interaction and communication. New York , MSS Information Corp , 9 - 79, 1974.

Slavkin HC. Intercellular communication during odontogenesis. In: Slavkin HC, Bavetta LA, ed. Developmental aspects of oral biology. New York , Academic Press Inc, 165 - 197, 1972.

Slavkin HC. Intercellular communication during odontogenesis. In: Slavkin HC, Slavkin HC, Zeichner-David M, Snead ML, Bessem C, Santos V. Epithelial mesenchymal interactions and enamel gene induction phylogenetic implications. In: Fernhead W, Suga S, ed. Tooth enamel IV. Amsterdam, Elsevier /North Holland Publishers, 167 - 171 , 1984.

Slavkin HC. Regulation of embryogenesis. In: Polin R, Fox W, ed. Fetal and neonatal physiology, 2 ed. Philadelphia, WB Saunders Co., 37 - 47, 1997.

Slavkin HC. Molecular biology of dental development: a review. In: Davidovitch Z, ed. Biological mechanisms of tooth eruption and root resorption. Birmingham, Ebsco Media, 107 - 116, 1988.

Slavkin HC, Chai Y, Hu CC, Millar-Groff S, Bringas Jr P. Intrinsic molecular determinants of tooth development from specification to root formation: a review. In: Davidovitch Z, ed. Biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacement by implants. Birmingham, EBSCO

Media, 263 - 272, 1994.

Slavkin HC, Trump GN, Brownell AG, Sorgente N. Epithelial-mesenchymal interactions: mesenchymal specificity. In: Lash JW, Burger MM, ed. Cell and tissue interactions. New York, Raven Press, 29 - 46, 1977.

Solchaga LA, Goldberg VM, Caplan AI. Cartilage regeneration using principles of tissue engineering. Clin Orthop 391: S161-S170, 2001.

Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. Mech Dev 67: 111 - 123, 1997.

Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. J Bone Miner Res 11:686 - 692, 1996.

Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffold. J Dent Res 81: 695-700, 2002.

Zeichner-David M, Diekwisch T, Fincham A, Lau E, MacDougall M, Moradian-Oldak J, Simmer J, Snead M, Slavkin HC. Control of ameloblast differentiation. Int J Dev Biol 39: 69 - 92, 1995.

Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. Cell Research 15: 301-316, 2005.

計畫成果自評：

由於豬隻取牙齒組織進行牙胚細胞培養為初起步階段，因此造成部分計畫上的延後。計畫中豬隻取牙齒組織進行牙胚細胞培養、牙胚細胞/支架植入實驗動物體內、實驗動物進行 X 光放射線照影評估及犧牲等都已完成。但我們目前組織僅進行 H&E 染色，後序將進行 Goldner's 染色及免疫組織化學染色分析牙齒相關成分。由實驗結果指出利用組織工程方式可再生牙齒相關組織。

評估牙齒生長情形我們除了進行 X 光放射線照影外，也以核磁共振的方式確認牙齒生長情形。因此在 X 光放射線照影下植入牙胚/細胞的相對位置未看見牙齒相關形態，我們也將陸續進行組織學分析了解是否有相關牙齒組織或成份出現。

牙齒生長的形狀方面我們實驗結果和原先白齒的形狀差異甚大，討論其原因，其中最重要的是取下的組織為 Bell 階段的牙齒組織，而調控牙齒生長形態的 Enamel knot 則是在 Bell 階段短暫出現調控牙齒形態，而在 Bell 階段後期經由細胞凋亡現象而消失。除了取下牙齒組織的發育階段為何相關外和細胞種入支架後在體外進行培養細胞數量的變異、植入豬隻體內發育的時間太短等都有關。

本實驗中將豬牙胚細胞/支架異體植入另一頭豬隻胸部位置，可見放射線不透明區域出現。由本實驗異體移植的雛形得到初步的證實。豬隻牙胚細胞/支架在兔子異體異種移植方面由於免疫排斥上的問題需克服才能進一步的進行探討牙齒組織生長與否。其中可能要改變兔子植入豬隻牙胚細胞/支架的評估時

間，例如：縮短拍攝 X 光放射線照影及分為不同週數進行犧牲或以藥物破壞其免疫系統再進行本實驗較具有實際意義。

我們的結果指出使用組織工程方式，再加上來自環境可能的訊號轉移因子可再生牙齒相關組織。