

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2006－2008
課題番号：18592080
研究課題名（和文） 臨床的スミア層の超微細構造解析と簡略化ステップ接着システムの接着性能に及ぼす影響
研究課題名（英文） Ultra-morphological analysis of clinically produced smear layer and its effect on bonding effectiveness of one-step adhesive systems bonded to dentin
研究代表者 井上 哲（INOUE SATOSHI） 北海道大学・北海道大学病院・講師 研究者番号：80184745

研究成果の概要：簡便で短時間に処置が終了し、化学的に歯質と接着し、さらに長期にわたり安定した接着性能を発揮できる接着システムの開発を最終目的とし、その基礎的知見を得るために、臨床的な条件下で作製したスミア層を形態学的に解析するとともに、各種スミア層を有する歯面に対する簡略化ステップ接着システムの短長期的接着性能を検討した。その結果、スミア層の厚さは切削器具に左右されること、スミア層の除去能が低い接着システムでは接着性能に影響があること、1ステップ接着システムは長期的に接着性能が低下することが判明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	480,000	3,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯学、臨床的スミア層、簡略化接着システム、接着性能

1. 研究開始当初の背景

近年の歯科用接着システムの進歩はめざましく、エッチング、プライミング、ボンディングの3つのステップを持つ3ステップ型システムによって、望まれる初期接着強さは得られたものの、その操作の煩雑さや処置時間の延長を解消すべく、各国で製品の開発努力は続けられてきた。現在、我が国では2ステップ型セルフエッチングシステムが広く臨床に応用されているが、より一層の操作の簡略化を目的として、最近ではその発展型として数多くの1ステップ型システムが国内外の市場に現れてい

る。わが国で開発された簡略化ステップ型システムの2ステップ型セルフエッチングシステムにおけるスミア層と接着強さの関係については、スミア層の性状によって接着強さが異なること（渡辺ら、歯材器13: 101-108, 1994）や、厚いスミア層を持つ象牙質は高い接着強さを得ることが難しい基質であること（Miyasaka et al, Dent Mater 15: 153-157, 1999）が報告されている。さらに、in vivoで1年間経過したいくつかの2ステップ型セルフエッチングシステムでは、接着強さが有意に低下したり、接着界面に劣化が起こることが示

唆されている (Sano et al, J Dent Res 78: 906-911, 1999; Takahashi et al, J Adhesive Dent 4: 151-159, 2002; Koshiro et al, Euro J Oral Sci 113: 341-348, 2005)。したがって、その短期および長期的接着性能には、スマア層の性状や機能性モノマーの種類、口腔内環境が大きく影響するものと思われる。申請者らは、被着体表面のスマア層をより臨床に近づけるため、2種のダイヤモンドバーを使用して形成した象牙質研削面に対する数種類の接着システムおよびレジセメントの微小引張り接着強さとスマア層溶解能を比較検討した結果、スマア層の溶解が充分ではない場合があり、この残存スマア層が、接着強さを低下させる因子となることを示唆した(井上ら, 日歯保存誌 43: 1211-1219, 2000; 小阿瀬ら, 日歯保存誌 47: 87-109, 2004)。

しかしながら、実際の臨床の場では、使用されるバーはダイヤモンドバー、スチールバー、カーボランダムポイントなど多岐に渡っており、その際のスマア層の厚みと接着強さの関係や接着界面の超微細構造、長期間負荷が加えられた場合の接着性能、さらには機能性モノマーと歯質との化学的接着能の詳細については全く不明であったので、申請者らは平成15年度-17年度に採択された科学研究費補助金を用い、市販されている異なった機能性モノマーを用いた簡略化ステップ型接着システムの短・長期的接着性能を、まずは臨床的な条件下をシミュレートした#600SiC研削被着面(象牙質)に対する接着強さと、その接着界面の超微細構造を指標に比較検討した。その結果、ナノ相互作用層形成型に分類される簡略化ステップ型接着システムは酸処理される歯質の量(深さ)が少なく、レジンの浸透が十分に期待できるため、劣化の少ない長期に安定な材料であること(Koshiro et al, J Biomed Mater Res Part B (Applied Biomaterials) 77B: 401-408, 2006)、簡略化ステップ型接着システムに含有されている機能性モノマーの中には歯質のCaイオンと化学的相互作用を示すものがあること(Yoshida et al, J Dent Res 83: 454-458, 2004)、象牙質接着界面の長期安定性は、機能性モノマー自体の加水分解安定性や機能性モノマーと象牙質との化学的相互作用に依存していること(Inoue et al, J Dent Res, 84: 1160-1164, 2005)などを明らかにした。

2. 研究の目的

簡略化ステップ型接着システム、特に1ステップ型システムについては、製品により歯質に対する接着性能は大きく異なり、さ

らに長期接着安定性に関しては、未だ十分とは言えない。その要因として、臨床的に形成された被着歯面上に存在するスマア層の厚みや性状の違いや、各材料の歯質脱灰能や化学的接着能が異なることなどが指摘されている。そこで本研究では、簡便で短時間に処置が終了し、化学的に歯質と接着し、さらに長期にわたり安定した接着性能を発揮できる真に有用な接着システムの開発を最終目的とし、その基礎的知見を得るために、これまでほとんど明らかにされてこなかった臨床的な条件下(各種ダイヤモンドバーを使用)で作製した種々のスマア層を形態学的に解析するとともに、各種スマア層を有する被着歯面に対する簡略化ステップ型接着システムの短・長期的接着性能を力学的および超微細構造学的に比較検討することを目的とした。

3. 研究の方法

まず切削条件の違いがスマア層の厚さや性状に及ぼす影響を検討するために、2種のダイヤモンドポイントおよび2種のSiCペーパーを用いて作製した4種の研削象牙質面におけるスマア層の超微細構造を電子顕微鏡で詳細に観察した。また、それらのうちで差異の大きかった2種の研削象牙質面を用いて、実際に臨床で使用されている1ステップ接着システムで処理するとスマア層がどのように変化するかを知るために、2種の市販1ステップ接着システムで処理した場合の表面を走査型電子顕微鏡で観察した。さらに長期接着耐久性を知るため、同様の2種の研削象牙質面に2種の市販1ステップ接着システムでコンポジットレジンを接着し、100000回のサーマルサイクル負荷試験前後の接着性能を、接着強さおよび接着界面の透過電子顕微鏡による観察を指標に評価した。

(1) 各種スマア層の観察

- ①研削象牙質面の作製: 0.5%クロラミンT水溶液(4℃)中に保存されていた16本の健全ヒト抜去大白歯歯冠部を、Isomet (Buehler, USA)にて歯軸に垂直に切断し、平坦な歯冠中央部象牙質面を得た。その平坦象牙質面をレギュラーダイヤモンドポイント(Diamond Point FG, #106RD, SHOFU; 以下レギュラー)、スーパーファインダイヤモンドポイント(Diamond Point FG, #SF106RD, SHOFU; 以下スーパーファイン)および2種のSiCペーパー(#600および#2000、マルトー; 以下#600および#2000)を用いて、ダイヤモンドポイントでは弱圧下で10往復切削、SiCペーパーでは60秒間研削を行い、可及的平坦な研削象牙質面を得た(各4本)。
- ②走査型電子顕微鏡(SEM)観察(各2本): 各種研削面を汚染しないように注意しながら

ら、レギュラーダイヤモンドポイントを用いて根部を切断後、研削面側の厚みが 2mm 程度残るように根面側からスリットを形成した。それらの試料をエタノール系列脱水後、室温にて 24 時間放置乾燥し、スリットに合わせて切断した。切断面および研削面を Au-Pd 蒸着 (E-1040、Hitachi) し、SEM (S-4000、Hitachi) 観察を行った。各切削器具の表面も同様に SEM 観察した。象牙細管の幅、スマア層の厚さ、スマアプラグの長さ、および各切削器具表面粒子の大きさの測定は、SEM 写真上でデジタルノギス (CD-15C、Mitsutoyo) を用いて行った。スマア層の厚さおよび表面粒子の大きさの統計学的検索には、一元配置分散分析および Games-Howell の多重比較を用いた ($p < 0.05$)。

③透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察 (各 2 本) : 上述①の方法で作製したそれぞれの研削象牙質面を弱圧エアーにて軽く乾燥させ、研削面保護のためボンディング材 (Scotchbond Multi-purpose Adhesive、3M ESPE、USA) を滴下し、エアーで薄く伸ばした後に 10 秒間光照射 (JETLITE3000、J. MORITA、USA) した。歯軸に平行に約 4 枚の試片 (厚さ約 0.7mm) を Isomet にて切り出し、Van Meerbeek らの方法 (J Dent Res 77、50-59、1998) で固定、脱水、包埋した。その後、ダイヤモンドナイフ (Diatome、Switzerland) を使い、ウルトラマイクローム (Ultracut UCT、Leica Microsystems、Switzerland) を用いて厚さ約 80nm の超薄切片を作製し、TEM (H-800、Hitachi) にて観察を行った。

(2) 接着システムにより処理した象牙質面の SEM 観察

前述の各種スマア層の観察と同様の方法で 2 種の研削象牙質面 (レギュラーおよび #2000) を作製した (各 4 本)。研削象牙質面を汚染しないよう注意しながら、レギュラーダイヤモンドポイントにて根部を切断し、研削面側の厚みが 2mm 程度残るように根面側からスリットを形成した。それらの研削象牙質面を、2 種の 1 ステップ接着システム、すなわち Clearfil S³Bond (Kuraray ; 以下 S3) および Absolute (Dentsply-Sankin ; 以下 AB) を用い、メーカーの指示に従って処理した後、光照射は行わず、ただちに 30 秒間アセトン洗浄した (各 2 本)。その後、試料をエタノール系列脱水し、室温にて 24 時間放置乾燥させたのち、スリットに合わせて切断した。切断面および処理面に Au-Pd 蒸着を行い、SEM にて観察した。

(3) サーマルサイクリング負荷試験による長期接着耐久性の検討

①試料の作製

0.5% クロラミン T 水溶液 (4°C) 中に保存されていた 30 本のヒト抜去健全大白歯を用い、前述の各種スマア層の観察と同様の方法で 2 種 (レギュラーおよび #2000) の可及的平坦な研削象牙質面を得た。これら 2 種の研削象牙質面に S3 および AB を用いてメーカーの指示通り接着操作を行い、コンポジットレジン (Z-100、3M) を高さ約 7mm になるよう築盛し、光照射を行った (レギュラー各 8 本、#2000 各 7 本)。

それらの試料を 37°C 水中に 24 時間保存した後、Isomet にて歯軸に平行な 4-7 枚の試料 (厚さ約 0.7mm) を切り出し、さらにレギュラーダイヤモンドポイントにて接着界面の面積が約 1mm² となるよう切れ込みを形成し、ダンベル型に調整した。サーマルサイクリング (TC) 負荷試験を行わない試料は後述の方法にて接着強さの測定を行った。

②サーマルサイクリング負荷試験

ダンベル型に調整された試料を 100000 回 TC (5°C および 55°C の水中に各 60 秒間浸漬) 負荷試験に供した。

③微小引張り接着強さ (μ TBS) の測定

TC 負荷無しの試料および TC 負荷終了後の試料について微小引張り接着強さを測定した。測定には卓上万能試験機 (EZ-test、Shimadzu) を用い、クロスヘッドスピード 1mm/min にて行った。統計学的検索には、一元配置分散分析および Games-Howell の多重比較を用いた ($p < 0.05$)。

④TEM 観察

TC 負荷有無のダンベル型試料を、接着界面を中心に直径約 3mm 程度の大きさより小さくなるようにレギュラーダイヤモンドポイントを用いてトリミングし、前述の各種スマア層の TEM 観察と同様に、固定、脱水、包埋後、ダイヤモンドナイフにて厚み約 80nm の超薄切片を切り出し、TEM 観察した。

4. 研究成果

(1) 各種スマア層の観察

今回の実験で使用したレギュラー、スーパーファイン、#600 および #2000 を用いて研削した場合の象牙質表面および切断面の SEM 像を図 1 に示した。表面粒子はいずれも不定形で、レギュラー、スーパーファイン、#600 および #2000 の粒子の大きさの平均値はそれぞれ 123.6、24.9、31.4 および 5.1 μ m であり、スーパーファインと #600 の間以外に統計学的に有意差が認められた。レギュラーで研削した象牙質表面はスマア層で覆われており、ひび割れて隆起している象牙細管開口部が認められた (図 1a)。象牙質切断面の SEM 像においても象牙質表面はスマア層で覆われ、象牙細管内にはスマアプラグが認められた (図 1b)。

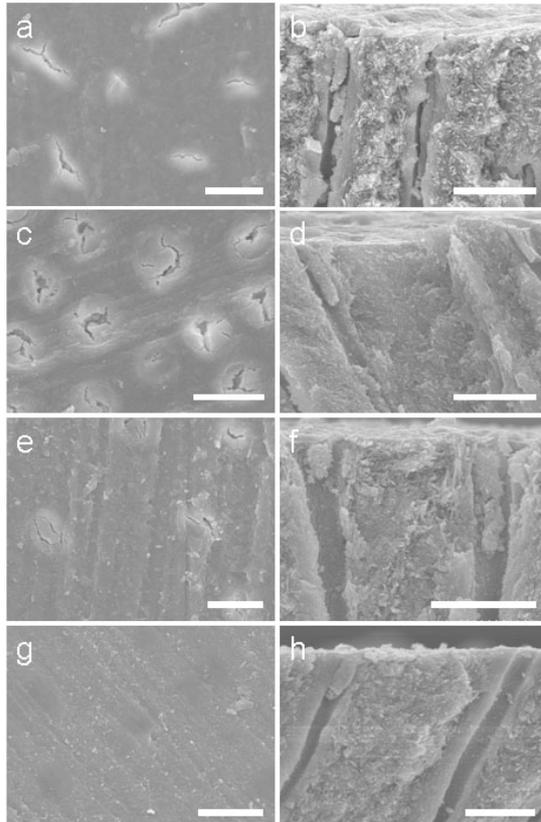


図1. 各切削器具による研削象牙質表面および断面のSEM像

a: レギュラー研削面(表面), b: レギュラー研削面(断面), c: スーパーファイン研削面(表面), d: スーパーファイン研削面(断面), e: #600研削面(表面), f: #600研削面(断面), g: #2000研削面(表面), h: #2000研削面(断面)

Bar=5 μ m

スマア層の厚さは約 1.8 μ m であった。スーパーファイン研削象牙質表面は、スマア層で覆われ、象牙細管開口部はレギュラーよりも明瞭にひび割れ、隆起していた(図1c)。スマア層の厚さは約 1.2 μ m であった。断面ではスマアプラグが象牙細管内に認められた(図1d)。 $\#600$ で研削した場合、2種のダイヤモンドポイントと同様に、スマア層で覆われた表面に、ひび割れて隆起した象牙細管開口部が認められ、ひび割れや隆起の程度はレギュラーと同程度であった(図1e)。また、断面でもスマアプラグが象牙細管内に認められた(図1f)。スマア層の厚さは約 1.1 μ m であった。 $\#2000$ 研削面では、管間象牙質と象牙細管が判別できず、スマア層に一樣に覆われており(図1gおよびh)、その厚さは約 0.8 μ m であった。スマア層の厚さはスーパーファインと $\#600$ の間以外で有意差が認められ、表面粒子の大きさが小さくなるにつれ、スマア層の厚さは薄くなった。

TEM 観察の結果、いずれの研削器具を用

いても、スマア層には細かい削り屑様物が無数に認められ、その中に粒状のハイドロキシアパタイト結晶(HAp)が散在しており、明らかな形態の違いは認められなかった。
(2) 接着システムにより処理した象牙質面のSEM観察

S3により処理されたレギュラー研削面の表層は一部脱灰が認められるが、スマア層で覆われており、未処理研削面で認められた細管部のひび割れ様の像が残存していた。断面では、スマア層は厚く付着し、象牙細管はスマアで埋まり、細管内にスマアプラグが観察された。 $\#2000$ 研削面では、スマア層は脱灰され、未処理研削面では認められなかった象牙細管が観察されたが、スマアプラグは残存していた。一方、ABにより処理されたレギュラー、 $\#2000$ いずれの研削象牙質面においても、スマア層は除去され、象牙細管が開口し、スマアプラグはほとんど認められなかった。とくに、断面においては細管開口部が漏斗状に広がっており、管周象牙質が脱灰されていた。S3と比較すると、スマア層やスマアプラグの除去程度および細管の開口程度から、いずれの研削面においてもABによる脱灰の程度が大きかった。

(3) サーマルサイクリング負荷試験による長期接着耐久性の検討

S3では、TC負荷無しで各研削面に接着した場合、接着強さはレギュラー研削面に対しては 21.4MPa であり、 $\#2000$ 研削面への 39.1MPa と比較し有意に低く、約 55%の値を示した。100000回TC負荷試験後、いずれの研削面に対する接着強さも有意に低下し、レギュラーでは約 69%、 $\#2000$ では約 56%の値となった。ABでは、TC負荷無しの接着強さは、レギュラー研削面に対しては 23.1MPa であり、 $\#2000$ 研削面への 19.8MPa と比較して有意差は認められなかった。100000回TC負荷試験後、いずれの研削面に対する接着強さも有意に低下し、レギュラーでは約 51%、 $\#2000$ では約 52%の値となった。

S3のTC負荷無しレギュラー研削面の接着材/象牙質界面のTEM観察では、象牙質表層部が厚さ 200-300nm程度脱灰されており、いわゆるnano-interaction zone (NIZ)が観察され、NIZにはHApが残存していた(図2a)。100000回TC負荷後の接着界面も同様の像が観察された(図2b)が、ボンディング層内のフィラーは消失していた。 $\#2000$ 研削面においてもTC負荷にかかわらずほぼ同様の接着界面であったが、TC負荷後NIZ下に空虚な部位が観察された(図2bおよびd)。一方ABでは、約 1.5-2 μ m程の厚さを有する樹脂含浸層が、研削面の違いやTC負荷の有無にかかわらず、全ての試

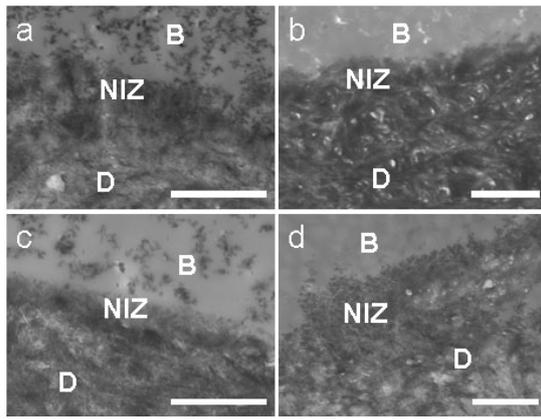
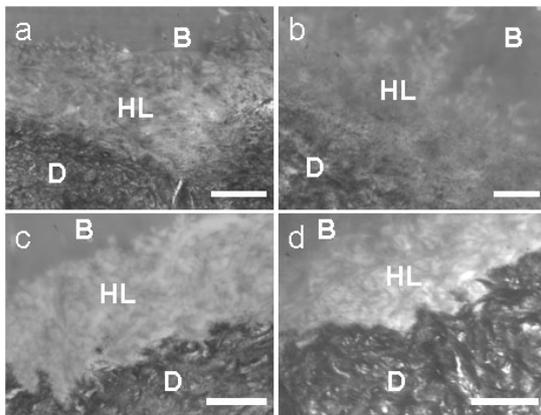


図2. TC 負荷有無の接着界面の TEM 像 (S3)
a: レギュラー・TC 無, b: レギュラー・TC 有, c: #2000・TC 無, d: #2000・TC 有
B=Bonding resin, NIZ=Nano-interaction zone, D=Dentin Bar=1 μm



料において観察された(図 3a-d)。樹脂含浸層底部には HAp の点在が認められた。100000 回 TC 負荷後の #2000 研削面では、樹脂含浸層下部象牙質に空虚な部位が観察された(図 3d)。

図3. TC 負荷有無の接着界面の TEM 像 (AB)
a: レギュラー・TC 無, b: レギュラー・TC 有, c: #2000・TC 無, d: #2000・TC 有
B: Bonding resin, HL: Hybrid layer, D: Dentin Bar=1 μm

以上より、スミア層の厚さは切削器具に左右されること、スミア層の除去能が低い接着システムでは、スミア層が厚い場合、スミア層が残存し、接着性能に影響を及ぼすこと、接着システムによっては、その厚さに拘らずスミア層を除去でき、接着性能に影響しないものもあること、および 1 ステップ接着システムは長期的に接着性能が低下することが示唆された。スミア層の影響が考えられる接着システムを使用する場合には、研削に使用する器具によって産生されるスミア層の厚さが異なるので、接着システムの性質を良く理解した上で、窩洞形成に使用するバーを選択することが重要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 福岡杏理、小城賢一、井上 哲、吉田靖弘、田中 享、池田考績、鈴木一臣、佐野英彦：スミア層が 1 ステップ接着システムの短長期的象牙質接着性能に及ぼす影響、日歯保存誌 52(1)、27-38、2009、査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 福岡杏理、小城賢一、井上 哲、池田考績、田中 享、佐野英彦：臨床的スミア層の形態学的観察、日本歯科保存学会 2007 年度秋季学会(第 127 回)、2007/11/09、岡山
- ② 福岡杏理、小城賢一、井上 哲、池田考績、田中 享、吉田靖弘、B Van Meerbeek、佐野英彦：1 ステップ接着システムの長期接着安定性、日本歯科保存学会 2006 年度秋季学会(第 125 回)、2006/11/09、鹿児島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 哲 (INOUE SATOSHI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：80184745

(2) 研究分担者

田中 享 (TANAKA TORU)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90179771
池田 考績 (IKEDA TAKATSUMI)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90222885

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

福岡杏理 (FUKUOKA ANRI)
北海道大学・大学院歯学研究科・大学院生

(5) 海外共同研究者

Bart Van Meerbeek
ベルギー王国ルーベンカソリック大学
医学部・教授