

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592798

研究課題名(和文) 分子レベル解析技術を応用した接着機能性モノマーの網羅的解析と最適組成の検討

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of functional monomer in dental adhesives using molecular-level analysis technique and investigation of the most suitable composition of adhesives

研究代表者

鳥井 康弘 (TORII, Yasuhiro)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：10188831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：MDP含有市販接着材でヒト歯象牙質を処理すると既報の人工アパタイトモデル実験と同様に、接着界面にMDP2分子が対向した層状構造組織が生成され、その三次元立体観察では接着界面上でMDP-Ca塩が板状に生成しレジン層に入り込んでいることがわかった。そこで、レジン、モノマーCa塩が混合したこの接着層を想定し接着材に合成MDP-Ca塩を添加したところ、添加で重合収縮は減少し、物性の一部は向上した。

以上より、接着界面でレジン層に広がるようにMDP-Ca塩が生成され、このMDP-Ca塩がレジンと混合して接着層を形成するが、この層の物性が接着に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It was reported that 10-MDP promoted formation of self-assembled layering at resin-hydroxyapatite interface when it was applied. Firstly, this study showed that the commercial 10-MDP based adhesives also formed the self-assembled layering of two 10-MDP molecules, joined by stable MDP-Ca salt formation, at the interface between human dentin and resin as similar to 10-MDP solution. The three-dimensional observation with FIB-SEM revealed that MDP-Ca salt was formed at the interface, extending into the adhesive (resin) layer. When we prepared adhesives containing MDP-Ca salts as a model of adhesion layer and measured its properties, polymerization shrinkage decreased and some of properties increased by adding the salt. It is concluded that MDP-containing adhesives do form nano-layering at the adhesive interface and MDP-Ca salt spread through the adhesive layer. The properties of adhesive layer with resin, salts and other residual tooth substances may influence the adhesion.

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：接着 機能性モノマー 歯質 エックス線回折 微細構造解析 歯質接着材 10-MDP

1. 研究開始当初の背景

歯科保存修復は生体への治療侵襲と欠損補填であり、治療の成否に歯質接着材料の応用は不可欠である。この接着材料は歯との間に界面をもち、その構造や形成過程が接着発現を左右する。この方面の最新の研究では、共同研究者の吉田らはリン酸系モノマーである 10-MDP とアパタイトとの反応を調べ、カルシウムに吸着した 10-MDP に、疎水性の部分を引き合う形で 10-MDP が 2 つ重なった MDP-Ca 塩が層状構造物として形成されることを明らかにした (J Dent Res 85:941-944, 2006)。この層はモノマーとアパタイトとの反応物が接着界面にナノレベルで構造体を形成したものであり、接着発現に関与していることは間違いないものと思われるが、この層状構造物の接着への影響については未だ詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、接着機能性モノマーを応用した材料・歯の界面を解析し、生体硬組織への接着安定性に優れた新しいモノマーを理論的に設計するための基礎的情報を集積することを目的とする。

(1) 歯質象牙質に対する機能性モノマーの化学的結合能について接着界面をナノスケールレベルで解析する。

(2) 接着層の物性と接着強さとの関連性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 供試接着性モノマー

図 1 に示す 10-methacryloyl-oxydecyl dihydrogen phosphate (10-MDP, クラレノリタケ) を使用した。

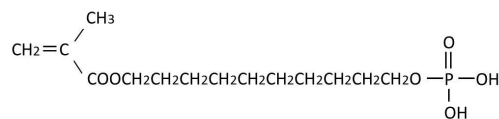


図 1. 10-MDP の化学構造

(2) 接着性モノマーによるレジンとヒト象牙質界面の化学的、構造的解析

10-MDP とアパタイトとの反応を調べ、MDP-Ca 塩の層状構造物が形成されることが共同研究者の吉田らによりすでに報告されている (J Dent Res 85:941-944, 2006) が、本研究ではまず、10-MDP 含有市販接着材でもヒト象牙質で同様の現象が生じるかを調べた。

供試プライマー、アドヘーシブおよび象牙質試料について

10-MDP とエタノールおよび蒸留水を 15 : 45 : 40wt% で混合して溶液 (試作プライマー) を調整した。また、MDP を含むプライマーであるメガボンドプライマー (クラレノリタケ) と Scotchbond Universal (3M

ESPE) を使用した。ヒト象牙質試料については、岡山大学倫理委員会の承認のもとで収集した抜去ヒト第 3 臼歯から切出したものを使用した。

エックス線回折 (XRD)

象牙質試料研磨面に試作プライマーは 20 秒間、メガボンドプライマーおよび Scotchbond Universal はメーカー指示どおり処理し、粉末、薄膜 X 線回折 (XRD) 装置 (RINT2500, Rigaku) で調べた。

TEM, STEM による微細構造観察

メガボンドまたは Scotchbond Universal で処理し、プロテクトライナー F (クラレノリタケ) を薄く充填した象牙質資料を切断し、TEM (JEM-2100, Jeol、東京) と STEM (JEM-2100F, Jeol) で観察した。

10-MDP 含有接着材で処理した象牙質とレジンとの接着面の三次元的観察について

牛象牙質研磨面をメガボンドで処理し、プロテクトライナー F を薄く充填した。37 水中 1 日浸漬後、一般的な TEM 試料作製手法でエポキシ包埋し、FIB と SEM が直交に配置された装置 (SMF -1000, エスアイアイ・ナノテクノロジー) で観察した。FIB 加工は 15nm ピッチでセクションングし、約 500 枚の SEM 像を撮影した。SEM 像をスタックさせ、三次元データを得て立体画像とした。

(3) 接着材構成成分と物性の関係について

レジンと象牙質との接着には界面のみならず、接着材の物性も重要な要素である。そこで、ワンステップ接着材で検討した。

試作ワンステップ接着材の調整

試作ワンステップ接着材の組成は、Bis-GMA (Aldrich)、HEMA (Merck)、10-MDP (クラレメディカルより供与)、無水エタノール、精製水を 33:16.5:5.5:27.5:16.5 wt% の比率で混合し、配合割合をモノマーに対して 1~5wt% で変化させたカンファークイノン (東京化成; 以下 CQ)、4-ジメチルアミノ安息香酸エチル (東京化成; 以下 Amine) を用いて調整した。CQ および Amine の配合量は、CQ1wt% Amine1wt%、CQ3wt% Amine3wt%、CQ5wt% Amine5wt% とした。

活性ラジカル量の測定について

各試料を滴下し 20 秒エアで乾燥させ、直径 2mm x 1mm のテフロン製チューブに充填後、光照射器 (Luxor-4000, ICI) を用いて 10 秒間照射し、直ちに ESR 試料管に投入して電子スピン共鳴装置 (JES-FR30, 日本電子) でラジカル発生量を測定した。光照射開始時点から時間経過ごとに測定した。

重合率の測定について

赤外線分光高度計 (IR-81, 日本分光) で

フィルム法により、光照射 1 時間後の各試料の重合率を測定した。

張り接着強さの測定について

1 時間後、12 時間後の各試料の牛歯エナメル質、象牙質の引張り接着強さを、オートグラフ (AG-20 k NX, 島津製作所) で測定した。

(4) MDP の Ca 塩を添加した市販ワンステップボンディング材の物性について

10-MDP 含有市販ワンステップ接着材でも接着界面に MDP-Ca 塩が生成されるとすると樹脂の含浸したハイブリッド層やレジン接着界面では接着材と MDP-Ca 塩が混合した層が存在することになり、この層の物性は接着性能に強く影響を与えることが予想される。そこで、市販接着材に合成 MDP-Ca 塩を添加した試作材料の物性測定を行った。

MDP-Ca 塩の人工的合成について

MDP-Ca 塩の合成は、MDP(クラレノリタケより供与) 1g を 200ml 蒸留水に溶解し 50ml エタノールを加えた後に不溶解物を濾過除去した。次に水酸化ナトリウム 0.2g を溶解した 150ml 蒸留水を pH6 にまで MDP 溶液に滴下した。反応槽中の沈殿物を吸引濾過した後に、デシケーター中で真空乾燥した。合成物の構造は赤外線吸収スペクトル (IR-81, 日本分光) 粉末 X 線回折 (RINT2500) で確認した。

MDP-Ca 塩添加接着材の重合収縮量の測定について

10-MDP 含有市販ワンステップ接着材としてトライエスbond (クラレノリタケ) を用いた。テフロン製モールド (6 × 3mm) にトライエスbond (70wt%) と MDP-Ca 塩 (30wt%) あるいは比較のため第三リン酸カルシウム (30wt%) からなる材料を充填し光照射した。得られたディスク試料の直径をマイクロメーター (MC-101, ニコン) で測定し、線収縮量から体積収縮率を算出した。

MDP-Ca 塩添加接着材のヌーブ硬さの測定について

合成 MDP-Ca 塩あるいは第三リン酸カルシウムを 30wt% 添加したトライエスbond を 3.8 × 0.4 mm のモールドに充填し、20 秒間光照射した試料で、微小硬度計を用いて荷重 10g, 負荷時間 20 秒の条件でヌーブ硬さを測定した。

MDP-Ca 塩添加接着材のダイヤメトラル引張り強さの測定について

重合収縮率測定と同様に作製した試料をオートグラフ (AG-20kNX, 島津) で 0.5mm/min で間接引張り強さを求めた。

4. 研究成果

(1) 接着性モノマーによるレジンとヒト象牙

質界面の化学的、構造的解析
エックス線回折 (XRD)

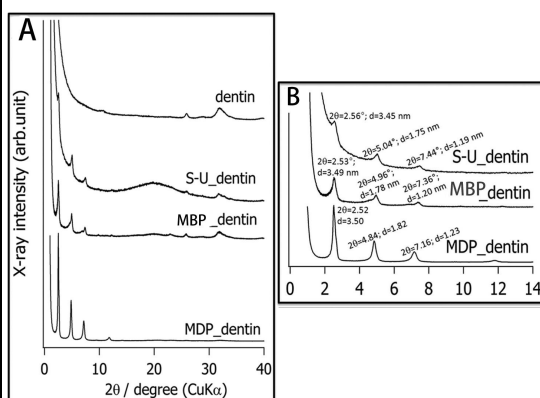


図 2. 粉末 XRD(A) および薄層 XRD(B)

XRD の結果を図 2-A, B に示す。10-MDP とエタノールおよび蒸留水の試作プライマーで処理した象牙質 (MDP_dentin) では、 $2\theta = 2.52^\circ$ ($d=3.50$ nm), 4.84° ($d=1.82$ nm) と 7.16° ($d=1.23$ nm) の範囲の 3 つの特徴的ピークが現れた。メガボンドプライマーで処理された象牙質試料 (MBP_dentin) および Scotchbond Universal 処理象牙質 (S-U_dentin) でも同様の 3 つのピークが検出された。以前の報告では、これらの 3 つの特徴的ピークは、2 つの MDP 分子が Ca を介して会合する自己集合構造体の MDP-Ca の層と確認されている (Yoshihara, Acta Biomaterials 7: 3187- 3195, 2011)。

TEM, STEM および EDS による微細構造観察

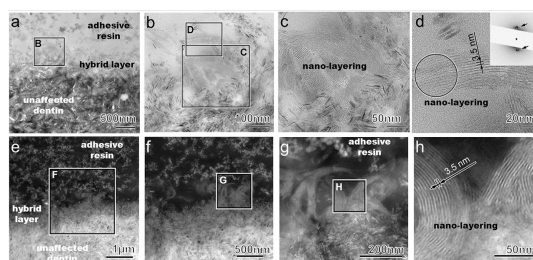


図 3. メガボンド処理試料の TEM(a~d) および STEM(e~h) 像

図 3 は、メガボンド 象牙質接着界面の TEM, STEM 像で界面象牙質表面に 0.5~0.7 μm の厚いハイブリッド層が見られ、図 3-d で示す高倍率像では、幅約 3.5nm のナノレイヤーが確認できた。また STEM でも検出された (図 3-h)。一方、Scotchbond Universal 処理試料の TEM 像では界面の象牙質に 0.2-0.5 μm ハイブリッド層があり、細管開口部の近くでナノレイヤーが見られた。

これらより、10-MDP を含有する市販接着材はヒト象牙質接着層において多層の板状構造物を生成し、XRD 結果よりそれは MDP-Ca 塩であることが確認できた。

10-MDP 含有接着材で処理した象牙質とレジンとの接着面の三次元的観察

上記の研究より,10-MDP 含有接着材で象牙質を処理した際には,接着界面に MDP-Ca 塩が生成することがわかったが,これらは二次元的な観察である。そこで,接着界面を含む象牙質-レジン接着層の三次元立体構造を15nm ピッチでセクションングしてFIB加工し,連続的にSEM像を撮影し三次元データを得て立体画像としたものが図4である。象牙質の接着界面(図4の下部)からレジン層(図上方)側に向かうにつれ,板状様のモノマーCa塩が三次元的に広がるように生成していた。

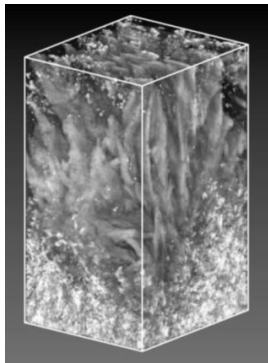


図4. 接着層三次元像

このように接着界面ではモノマーCa塩がレジンと歯質との間に介在するが,これのみが接着を担っているはずもなく,歯質が脱灰されて残存した無機質,有機質成分およびその部分に浸透し重合したレジン並びにモノマーCa塩が混合

して接着層を構成し,それらが接着を担っているものと想像できる。

(2) 接着材構成成分と物性の関係について

MDP 含有ワンステップ接着材に配合された重合触媒および促進剤の活性ラジカル,重合率および接着強さへの影響について

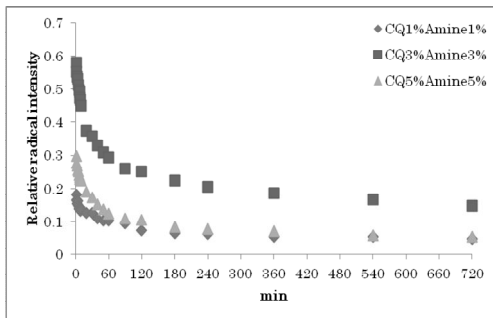


図5. CQ, Amine 量を変化させた試作ワンステップ接着材重合時の活性化ラジカル発生量

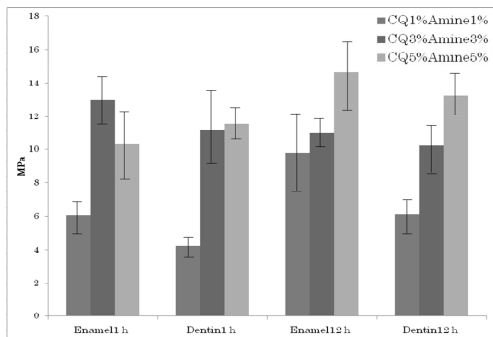


図6. CQ, Amine 量を変化させた試作ワンステップ接着材の牛歯エナメル質と象牙質への接着強さ

接着材の重合開始剤,触媒の配合比を変えて物性,接着への影響を調べたところ,重合率は CQ1wt%Amine1wt%で 34%, CQ3wt%Amine 3wt%で 48%, CQ5%Amine5wt%で 48.4%であった。活性ラジカル量は光重合開始剤 3wt%のもので常に最も高く,1wt%と 5wt%では低かった

一方,重合率や接着強さは 1wt%のものが最も低く,5wt%は 3wt%とほぼ同じ高い値を示し,ラジカル発生挙動との相関はなかった。接着強さは,1時間後より 12時間後の方が高く,また CQ および Amine 量が多くなるにつれ,高くなる傾向であった。以上より CQ3wt% Amine 3wt%あたりが最適な配合量ではないかと予想されるが,これらの結果だけでは明らかでなくより詳細に検討する必要がある。

MDP Ca 塩添加ワンステップ接着材の物性
三次元像の観察で認められた MDP-Ca 塩と接着材のモノマーが混合して重合した接着層を想定して,市販ワンステップ接着材に合成 MDP-Ca 塩を添加し物性を調べた。

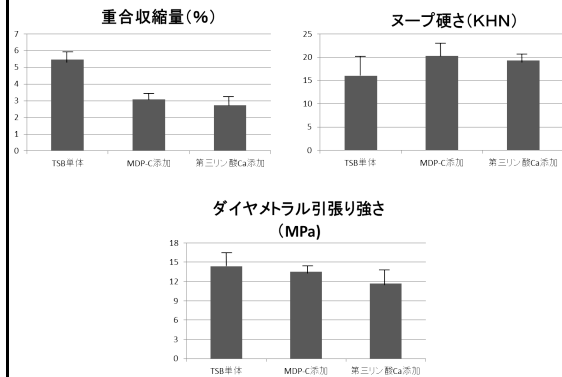


図7. MDP-Ca 塩添加ワンステップ接着材の重合収縮量,ヌーブ硬さ,ダイアメトラル引張り強さ

図7は,トリエスポンド(TBS)に MDP-Ca 塩を 30wt%添加したものの重合収縮量,重合後のヌーブ硬さおよびダイアメトラル引張り強さである。比較のため,TBS 単体と MDP-Ca 塩のかわりに第三リン酸カルシウムを 30wt% 添加したのものについても示した。

重合収縮量は,MDP-Ca 塩あるいは第三リン酸カルシウムの 30wt%添加によって大幅に低下した。MDP-Ca 塩,第三リン酸カルシウムの両群では差はなかった。重合収縮の主因はモノマーの重合時の収縮であるため,30wt%の MDP-Ca 塩あるいは第三リン酸カルシウムの添加はモノマー量の減少につながってレジンへのフィラーの添加と同様の効果を生揮し,重合収縮量を減少させたのであろう。

また,MDP-Ca 塩添加,第三リン酸カルシウム添加の両群とも TBS 単体よりもヌーブ硬さが向上した。これもフィラー効果の影響と思われる。一方,引張り強さは低下傾向にあったが,MDP-Ca 塩添加群は第三リン酸カルシウム添加群に比べて低下の程度は極めて少な

かった。通常のフィラーは表面処理モノマーと重合可能で、良好な複合効果が発揮できる。第三リン酸カルシウムは単なる添加で引張り強さが低下したが、MDP-Ca 塩はモノマーと化学的に反応したのかもかもしれない。

(3)研究成果のまとめ

10-MDP を含有する市販接着材はヒト象牙質との界面でアパタイトの場合と同様に層状の MDP-Ca 塩を生成し、立体的には接着界面からレジン層に MDP-Ca 塩が入り込んでいることがわかった。すなわち、三次元的には歯質が脱灰され残存した無機質、有機質成分およびその部分に浸透し重合したレジン並びに生成した MDP-Ca 塩が混合して接着層を構成し、それらが接着を担っており、この層の物性が影響を与えるものと想像できた。そこで、10-MDP を含有する市販の接着材に合成 MDP-Ca 塩を添加することで物性への影響を調べたところ、重合収縮は減少し硬さは向上した。引張り強さはやや低下した程度であった。接着材のレジン成分と MDP-Ca 塩が混在し重合した接着層では、物性が大きく向上するわけではないが混在による何らかの効果が、接着に寄与しているのではないかと考えられた。しかしながら、最終的な結論を得るためにはさらに詳細な検討が必要となる。

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)

Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, Osaka A, Meerbeek BV, Self-assembled Nano-layering at the Adhesive interface, Journal of Dental Research, 査読有, 91 巻, 2012, 376-381,
DOI 10.1177/0022034512437375

〔学会発表〕(計2件)

長岡紀幸, 吉原久美子, 吉田靖弘, 鳥井康弘, 直交配置型 FIB-SEM を用いた歯質接着界面の 3 次元観察, 第 32 回日本接着歯学会学術大会, 2013 年 11 月 30 日~12 月 1 日, 福岡市

武田 宏明, 鳥井 康弘, 松本 卓也, 鈴木 一臣, ワンステップボンディングシステムにおける活性ラジカル発生挙動と接着性-光重合開始剤の配合量による変化-, 第 59 回日本歯科理工学会学術講演会 2012 年 4 月 15 日, 徳島市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鳥井 康弘 (TORII, Yasuhiro)
岡山大学・大学病院・教授
研究者番号: 1 0 1 8 8 8 3 1

(2)研究分担者

吉田 靖弘 (YOSHIDA, Yasuhiro)
岡山大学・歯学部・研究員
研究者番号: 9 0 2 8 1 1 6 2

長岡 紀幸 (NAGAOKA, Noriyuki)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 7 0 3 0 4 3 2 6

白井 肇 (SHIRAI, Hajime)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号: 0 0 2 6 3 5 9 1

河野 隆幸 (KOUNO, Takayuki)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号: 8 0 2 8 4 0 7 4

鈴木 康司 (SUZUKI, Kouji)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号: 3 0 3 0 4 3 2 2