

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670834

研究課題名(和文) プラス ステップによる1ステップセルフエッチングシステムの象牙質接着能向上

研究課題名(英文) Improvement of dentin bonding effectiveness using 1 step self-etching system by the plus-alpha-step

研究代表者

峯 篤史 (MINE, Atsushi)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：60379758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マイルドタイプの1ステップ接着システムを用いた象牙質接着における次亜塩素酸ナトリウム(NaOCl)とスルフィン酸ナトリウムの処理効果を評価した。リン酸に続くNaOClによる処理で、スメア一層およびコラーゲン線維が除去されることにより接着耐久性が向上した。さらにスルフィン酸ナトリウム処理を行うことで、根管象牙質に対する初期接着能が向上した。NaOCl処理後は水洗を行っても、象牙質表面にClやNaが残存していることが確認され、NaOCl処理後はその後適用される接着材の重合が阻害された。しかしながら、スルフィン酸ナトリウムを作用させることで、接着材の重合度が回復した。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated the effect of sulfinic acid sodium salt interposition after acid and NaOCl treatment on the dentin bonding durability using a mild type one-step self-etching adhesive. The long-term dentin bonding durability is improved by removing the smear layer and collagen fibrous using NaOCl following phosphoric acid application. Moreover, initial bonding effectiveness for the root canal dentin improved by sulfinic acid sodium after acid and NaOCl treatment. Cl and Na remain on the dentin surface even washed out with water after using NaOCl, and the polymerization of adhesive is inhibited. The degree of polymerization of adhesive is restored by sulfinic acid sodium application.

研究分野：接着歯学

キーワード：接着歯学 セルフエッチングプライマー 象牙質 スルフィン酸 次亜塩素酸ナトリウム処理

1. 研究開始当初の背景

1990年代に確立された接着技法によって、低侵襲で審美的な欠損歯質の再建が可能となった。その後歯科用接着材は、市場の要求に応えるようにシンプルユーズ化され1ステップセルフエッチングシステムが開発された。しかしながら、この1ステップシステムの接着能は実験的にも臨床的にも、これまでのシステムに比べて劣っている (Mine *et al.*, J Dent 2009)。応募者らは1ステップシステムで処理した場合のスメアー層残存をナノレベルの界面分析で明らかにしており (Mine *et al.*, J Dent Res 2010)、この残存スメアー層が接着能低下の原因となっている可能性がある。

1ステップシステムの接着能を向上させるための象牙質被着面処理法としてリン酸処理、次亜塩素酸ナトリウム処理 (NC 処理: Wakabayashi *et al.*, Int J Prosthodont 1994, 峯ら, 接着歯学 2001) とスルフィン酸ナトリウム処理 (Nassar *et al.*, J Endod 2011) に着目した。

2. 研究の目的

本研究ではマイルドタイプの1ステップアドヒーズシステムにおける根管象牙質とコンポジットレジン接着能とその耐久性の向上を目的として、NC 処理、さらに還元剤であるスルフィン酸ナトリウムによる処理の効果を多面的に検討した。

本研究の帰無仮説は

NC 処理およびスルフィン酸ナトリウム処理は、根管象牙質に対するマイルドタイプの1ステップアドヒーズシステムの接着能に影響を及ぼさない。

NC 処理およびスルフィン酸ナトリウム処理は、平滑面象牙質に対するマイルドタイプの1ステップアドヒーズシステムの長期の接着耐久性に影響を及ぼさない。

象牙質に対する NC 処理およびスルフィン酸ナトリウム処理は、その後に適用されるアドヒーズプレジンの重合度に影響を及ぼさない。

である。

3. 研究の方法

(1) 根管象牙質に対する初期接着能評価

本実験に使用した歯は、抜去後に平衡塩溶液 (Hanks' Balanced Salt solution: HBSS) 中に保存されたう蝕に罹患していないヒト単根管小臼歯 36 本で、抜去後 6 か月以内に使用した。まず、歯冠をセメント-エナメル境で歯軸に対して垂直に切断した。さらに K ファイル (マニー社, 栃木) にて #80 まで根管を拡大し、拡大終了後、根管内をエアブローとペーパーポイントを用いて十分に乾燥させ、ガッタパーチャポイント (GC 社, 東京) を用いて側方加圧にて根管充填を行った。根

管充填後、37℃ 水中に 24 時間保存したのち、根管形成バー (トクヤマ FR ポスト用ドリル, トクヤマデンタル社, 東京) でポストの長さをセメントエナメル境より 10 mm に統一して根管形成を行った。

作製した 36 試料を無作為に 3 グループに分け、以下の処理を行った。

【対照群】: 光重合型アドヒーズプレジン (クリアフィルボンド SE ONE, クラレノリタケデンタル社, 東京) と支台築造用コンポジットレジン (クリアフィル DC コアオートミックス ONE, クラレノリタケデンタル社, 東京) を用い、製造者指示に従ってポスト孔内にコンポジットレジン填入を行った。

【NC 処理群】: ポスト孔を 37%リン酸 (K-エッチャントゲル, クラレノリタケデンタル社, 東京) で 15 秒間処理後、水洗および乾燥を行い、続いて 10~15%次亜塩素酸ナトリウム (AD ゲル, クラレノリタケデンタル社, 東京) で 60 秒間処理し、水洗および乾燥を行った。その後対照群と同様にコンポジットレジン填入を行った。

【NC+AC 処理群】: NC 処理群と同様に処理した後、さらにスルフィン酸ナトリウム (アクセル, サンメディカル社, 滋賀) で 15 秒間処理し、エア乾燥後、対照群と同様にコンポジットレジン填入を行った。

光重合型アドヒーズプレジン塗布後に LED 照射器 (Mini L.E.D, 最大光量 2,200 mW/cm², SATELEC 社, フランス) を用いて 10 秒間光照射し、続くコンポジットレジン填入後に 20 秒間光照射を行った。コンポジットレジンに対する光照射後 6 分間静置したのち、水中に浸漬した。なお、本研究ではコンポジットレジンと根管象牙質の接着に焦点を絞るため、ポストを挿入せずに実験を行った。

コンポジットレジン填入を行った試料のうち各群 9 歯を 37℃ 水中に 24 時間浸漬した後、歯冠側より 1 mm の厚みで歯軸に直交するように試料を 6 枚切り出し、さらに各切断試料から 1 mm × 1 mm のビーム状試料 1 本を作製した。各試料片を引張接着試験専用のジグにモデルリペア (デンツプライ三金社, 東京) で装着し、小型卓上試験機 (EZ S, 島津製作所社, 京都) を使用して、クロスヘッドスピード 1.0 mm/min で μ TBS 試験を行った。各試料片の断面積はマイクロメータ (ミットヨ CD15, ミットヨ社, 神奈川) で測定し、測定時の引張強さの値を MPa に変換した。 μ TBS 試験を行う前に破断した試料 (pre-testing failure, 以下 ptf) は 0 MPa として計算した (各群 n=9)。

μ TBS 試験の結果は二元配置分散分析 (処理法, 部位) および Scheffé 法を用いて多重比較検定を行った。有意水準は 5% とした。

μ TBS 試験に使用していない各群 3 歯を歯軸に平行に切断し、切断面の切片片をリン酸にて 15 秒処理後に水洗乾燥し、続いて次亜塩素酸ナトリウムを用いて 60 秒処理後、水洗乾燥した。8%グルタルアルデヒドとカ

コジル酸水溶液を 1:1 で混和した液で 2 時間以上固定した後、リン酸バッファー溶液 (PBS) を用いて数回洗浄し、オスミウム酸溶液で 2 時間固定を行った。再度 PBS で繰り返し洗浄した。その後、エタノール上昇系を用いて段階的に脱水を行い、さらに T-ブチルアルコールで段階的に置換を行い、凍結乾燥した。乾燥した試料は金蒸着を行った。作製した試料は走査電子顕微鏡 (以下 SEM, JSM - 6390, 日本電子社, 東京) にて根管象牙質レジン界面の観察を 40~1000 倍で観察した (各群 n=3)。

(2) 長期の象牙質接着耐久性の評価

抜去後に HBSS 中に保存され、抜去後 6 か月以内のう蝕に罹患していない新鮮ヒト抜去大臼歯 15 本を、歯冠の最大豊隆部で歯軸に対して垂直に切断し、象牙質平滑面試料を作製した。#600 の耐水ペーパーで研磨し、スメア層を形成後、無作為に 3 グループに分けた。表面処理の異なる実験群として、(1) と同様に対照群、NC 処理群、NC+AC 処理群を作製した。

象牙質平滑面の表面処理後、(1) と同様に光重合型アドヒーズプレジンを塗布し、処理表面に光硬化型歯冠修復用コンポジットレジン (クリアフィル マジェスティ ES 2, クラレノリタケデンタル社, 東京) を 4 mm 程度の高さまで積層充填した。作製した試料を 37 °C 水中に 24 時間浸漬したのち、1 mm × 1 mm のビーム状試料を作製した (各歯 12~16 ビーム)。

各群をさらに無作為に 3 つのサブグループに分け、24 時間、6 か月および 1 年間水中浸漬後、各試料片を引張接着試験専用のジグにモデルリペア (デンツプライ三金社, 東京) で装着し、小型卓上試験機 (EZ S, 島津製作所社, 京都) を使用して、クロスヘッドスピード 1.0 mm/min で μ TBS 試験を行った (各群 n=15)。

μ TBS 試験の結果は二元配置分散分析 (処理法, 保存期間) および Scheffé 法を用いて多重比較検定を行った。さらに保存期間に関しては各群において一元配置分散分析および Scheffé 法にて統計解析を行った。有意水準は 5% とした。

接着試験後の破断面は 30 倍の光学顕微鏡で観察し、破壊様式を確認した。破断面様式は、コンポジットレジン アドヒーズプレジン間の界面破壊、アドヒーズプレジン 象牙質間の界面破壊、コンポジットレジンの凝集破壊、象牙質の凝集破壊、混合破壊の 5 つに分類した。混合破壊は界面破壊と凝集破壊の両破壊様式が少なくとも 30% 以上含まれるものと定義した。また、代表的な試料は SEM (JSM - 6390, 日本電子社, 東京) にて観察を行った。

μ TBS 試験にて作製した 1 mm 角のビーム状試料のうち各群 6 個をランダムに 2 群に分け、24 時間あるいは 1 年間 37 °C 水中浸漬した。

それらを 2.5% グルタル溶液で 2 時間固定後、カコジル酸緩衝溶液で洗浄し、続いてオスミウム酸で 2 時間固定を行った。カコジル酸緩衝溶液で十分に洗浄したのち、エタノール上昇系にて順次脱水を行った。脱水後の試料をエポキシ樹脂に包埋し、60 °C で 48 時間加熱重合を行った。硬化後、歯軸に直交するように約 400 μ m の厚みで切り出した。各試料は再度同様の方法でエポキシ樹脂包埋を行い、約 1 mm 角の試料を作製した。さらにダイヤモンドナイフ (ナノトーム シック, 酒井電子顕微鏡応用研究所, 埼玉) およびウルトラミクロトーム (ウルトローム V, LKB 社, スウェーデン) を用いて接着界面を含む部位で約 100 nm の厚みに薄切した。薄切後の試料は透過型電子顕微鏡 (以下 TEM, H-800, 日立製作所社, 東京) にて加圧電圧 200 kV で観察した。

抜去後 HBSS 中に保存し 6 か月以内のう蝕に罹患していない新鮮ヒト抜去大臼歯 3 本を、歯冠の最大豊隆部で歯軸に対して垂直に切断して象牙質平滑面試料を作製し、#600 耐水ペーパー研磨した。平滑面を 4 等分し、それぞれ耐水ペーパー研磨後のまま、リン酸処理、リン酸処理 次亜塩素酸ナトリウム処理、リン酸処理 次亜塩素酸ナトリウム処理 スルフィン酸ナトリウム処理を行った 4 群を設定し、それぞれ対照群、エッチング処理群、NC 処理群、および NC+AC 処理群とした。各処理時間は (1) と同じとした。各表面処理群の象牙質平滑面を SEM (JSM - 6390, 日本電子社, 東京) にて 5,000 倍で観察した (各群 n=3)。

(3) 表面元素分析と重合度評価

(2) と同様の手法で 4 群の試料を作製した後、X ray Photoelectron Spectroscopy (以下 XPS, AXIS 165x, 島津製作所, 京都) により表面の元素分析を行った。真空圧は 9×10^{-6} Pa, X 線発生源は単色化 AlK α , 電圧 15 kV, 電流 12 mA の条件で測定を行った。Wide Scan のインターバルは 1 eV, Narrow Scan のインターバルは 0.1 eV, 測定時間は 100 ms, 積算は Wide Scan では 2 回, Narrow Scan では 5 回とした (各群 n=3)。

(2) と同様の手法で象牙質平滑面を処理し、アドヒーズプレジンでアルミニウムバーを接着させ、歯軸と平行に切断した。切断した試料の一方をレーザーラマン分光光度計 (NRS-5100, 日本分光, 東京) を用いて重合度を評価し、もう一方を SEM で形態観察した。レーザーラマン分光光度計の測定条件は、励起波長 532 nm, レーザーパワー約 5.5 mW とし、撮影間隔 1 μ m, 25 点 × 15 点, 積算 2 回で撮影した (各群 n=3)。

まず、対応する SEM 画像を参考に観察部位を決定し、象牙質側から界面に向かって 1 μ m 間隔で 25 点ラマン分光測定を行った。象牙質に特徴的な P043 のピーク (962 cm^{-1}) とアドヒーズプレジンに特徴的な C=C のピーク (1610 cm^{-1}) で分布をマッピングし、アドヒ

ーシブレン層の同定を行った。さらに、アドヒーズブレンに含まれる芳香族 C=C (1610 cm⁻¹)と脂肪族 C=C (1640 cm⁻¹)のうち、脂肪族 C=C のピークのみが重合とともに減少することを利用して、それらのピークの比をとることで分布図のアドヒーズブレン層に対応する部位の重合度を評価した。

4. 研究成果

(1) 根管象牙質に対する初期接着能評価

図1に接着界面のSEM観察の結果を示す。対照群では歯冠側(図1a),中間部(図1b),根尖側(図1c)のすべての部分でレジンタグは形成されていなかった。一方,NC処理群では歯冠側(図1d)から根尖側(図1f)に向かうに従って長さは短くなるものの象牙細管内にレジンタグが形成されていた。NC+AC処理群でも歯冠側(図1g)から根尖側(図1i)までNC処理群と同様の傾向が認められたが,同群ではさらに側枝へもレジンタグの伸展を認め,NC処理群と比較してレジンタグの太いことが確認された。

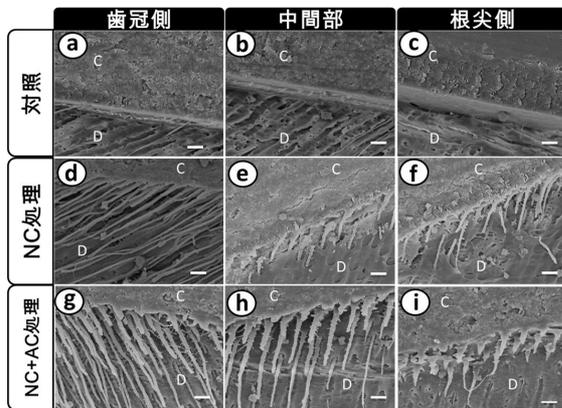


図1 接着界面のSEM観察像
(バー:10μm)

図2にμTBS試験の結果を示す。1つの歯から作製した6つの試料のうち最も歯冠側を1とし,最も根尖側を6とした。接着強さは,対照群では根尖部に向かうに従って接着強さが低下した。NC処理群およびNC+AC処理群も対照群と同様に根尖側に向かうに従って接着強さが低下する傾向が認められた。しかしながら,二元配置分散分析において,部位(P=0.61,F=2.17)には有意差を認めなかった。処理法には有意差が認められた(P=0.001,F=7.03)。Scheffé法による多重比較検定の結果,NC+AC処理群は他の2群と比較して有意に高い接着強さを示した(vs.対照群:P=0.001,vs.NC処理群:P=0.004)。一方,対照群とNC処理群の間の接着強さには有意差を認めなかった(P=0.970)。すべての群において歯冠側ではptfが少なかった。

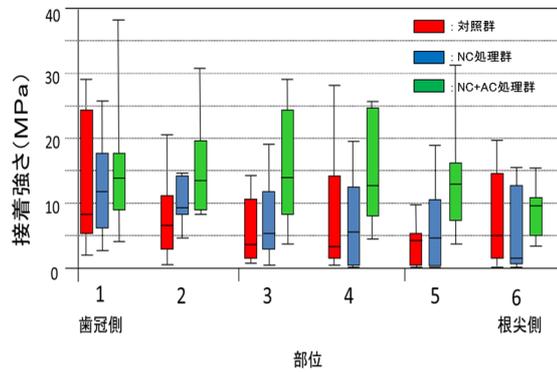


図2 ポスト孔象牙質と支台築造用レジンの接着強さ

(2) 長期の象牙質接着耐久性の評価

図3に象牙質被着面のSEM観察の結果を示す。対照群では象牙質表面がスメア層に覆われていた(図3a)。エッチング処理群ではリン酸処理によりスメア層が除去され,表面にコラーゲン線維層が観察された(図3b)。NC処理群ではコラーゲン線維層が完全に除去され,象牙細管がエッチング処理群と比較して拡大している像が観察された(図3c)。NC+AC処理群はNC処理群と形態的な違いを認めなかった(図3d)。

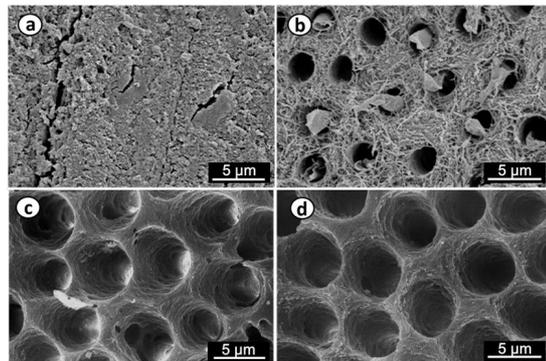


図3 象牙質表面のSEM観察像

図4にμTBS試験の結果を示す。二元配置分散分析の結果,処理法(P<0.001,F=23.4),保存期間(P=0.008,F=5.0)ともに有意な差を認めた。Scheffé法による多重比較検定の結果,実験1と同様に,NC+AC処理群は他の2群と比較して有意に高い接着強さを示した(vs.対照群:P<0.001,vs.NC処理群:P<0.001)。一方,対照群とNC処理群の間の接着強さには有意差を認めなかった(P=0.923)。さらに各群において保存期間が接着強さに及ぼす影響について一元配置分散分析を行った結果,対照群のみに有意な影響を認めた(対照群:P=0.012)。一方,NC処理群とNC+AC処理群においては接着強さに有意な影響を認めなかった(NC処理群:P=0.452,NC+AC処理群:P=0.220)。Scheffé法による多重比較検定の結果,対照群では24時間後に対し,1年後の接着強さが有意に低下していた(P=0.012)。

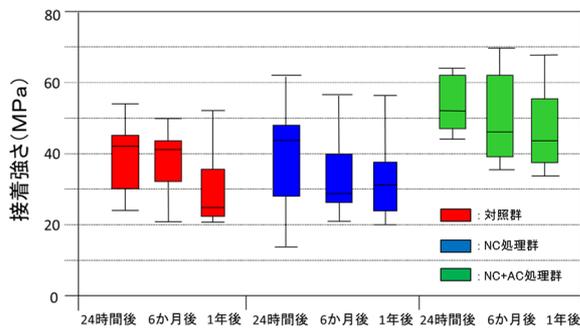


図4 平滑面象牙質における接着強さ

破断面観察による破壊様式は、すべての群において混合破壊が最も多く、次いで NC+AC 処理群の 24 時間後を除いてコンポジットレジン内での凝集破壊が多く認められた。24 時間後の対照群の破断面のみにアドヒーズプレジン コンポジットレジン界面付近での破壊がみられ、象牙質内での凝集破壊を示した試料以外では破断面に広範囲に象牙質面が確認される試料はなかった。一方、1 年水中保存後では、混合破壊を示した試料において象牙質面が広範囲に確認されるものが増え、象牙質 アドヒーズプレジンの界面の劣化が推測された。NC 処理群と NC+AC 処理群の破壊様式はどちらも同様の傾向を示し、1 年後にどちらの群もコンポジットレジン内での凝集破壊が増えていること以外は 24 時間後と 1 年後でも大きな変化は認められなかった。

TEM による界面観察の結果を図 5 に示す。対照群において、初期ではスメア層やスマプラグが認められるものの、界面に構造的欠陥は認められなかった (図 5a,b)。しかしながら、1 年後の界面ではスメア層部分すなわち破断面観察で劣化が推測された部分に空隙が存在した (図 5c)。一方、NC 処理群は 1 年後の界面でも明らかな劣化を示す所見は認めなかった (図 5f)。同様に、NC+AC 処理群でも 1 年後の界面で明らかな劣化を示す所見は認めなかった (図 5i)。

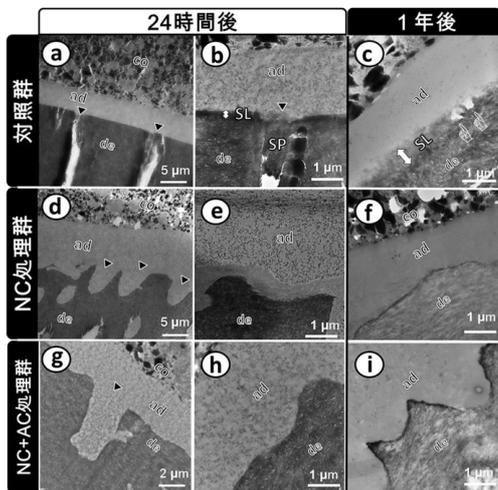


図5 象牙質表面の SEM 観察像

(3) 表面元素分析と重合度評価

XPS による表面の元素分析の Wide Scan 結果、対照群においては C, N, O, P, Ca が認められた。エッチング処理群では C, N, O が確認された。NC 処理群には C, N, O, Na, P, Cl, Ca が存在し、対照群にない Na と Cl が認められた。NC+AC 処理群には C, N, O, Na, P, Cl, Ca, S が存在し、他群にはない S が確認された。すべての元素において Narrow Scan を行い、化学的結合の各群間における差を確認した。リン酸処理後は象牙質表面の Ca や P が消失し、無機成分が脱灰されていることが確認された。さらに次亜塩素酸ナトリウム処理を行うことで再度 Ca や P の存在を確認した。次亜塩素酸ナトリウム処理後は、表面に Cl や Na が存在した。スルフィン酸ナトリウム処理後には Cl のピークが不明な試料もあった。Narrow Scan によって化学的結合の差異は確認されなかった。

ラマン分析の結果を図 6 に示す。対照群では SEM 像 (図 6a) においてもアドヒーズプレジン・象牙質分布図 (図 6d) においてもアドヒーズプレジンと象牙質の界面が明瞭であった。一方、NC 処理群 (図 6b,e) と NC+AC 処理群 (図 6c,f) はレジントグを形成しているため、アドヒーズプレジンと象牙質の境界は不明瞭であった。また、対照群 (図 19g) と比較して、NC 処理群 (図 6h) はアドヒーズプレジンの重合度が低く、NC+AC 処理群は重合度が向上していることが確認された (図 6i)。

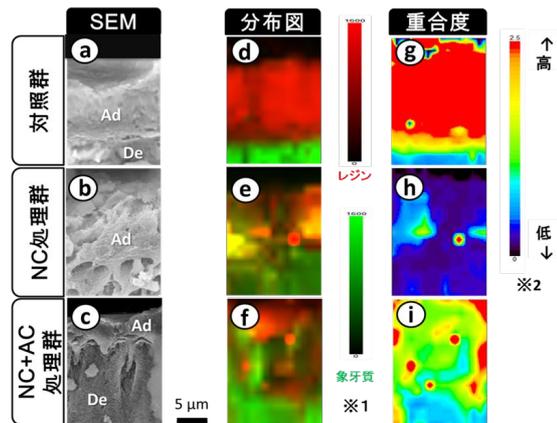


図6 平滑面象牙質における接着強さ

*1: レジン特有のピークが大きいほど赤色に、象牙質特有のピークが大きいほど緑色に表される。

*2: 重合度が高いほど赤色に、低いほど青色に表される。

本研究において以下のことが明らかとなった。

マイルドタイプの1ステップアドヒーズシブシステムを用いる際、リン酸処理に続く次亜塩素酸ナトリウム処理に加えてスルフィン酸ナトリウム処理を行うことで根管象牙質に対する初期接着能が向上した。

マイルドタイプの1ステップアドヒーズシブシステムを用いる際、リン酸処理に続く次亜塩素酸ナトリウム処理によりスメア層およびコラーゲン線維層を除去することで長期の象牙質接着耐久性が向上した。

次亜塩素酸ナトリウム処理後は水洗を行っても、象牙質表面にClやNaが残存していることが確認され、次亜塩素酸ナトリウム処理後はその後に適用されるアドヒーズプレジンの重合が阻害されること、さらにスルフィン酸ナトリウムを作用させることで、アドヒーズプレジンの重合度が回復する。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計6件)

中谷早希, 峯 篤史, 壁谷知茂, 川口明日香, 田尻裕子, 三浦治郎, 松本真理子, 矢谷博文. 根管象牙質接着におけるリン酸, 次亜塩素酸塩とスルフィン酸塩処理の効果. 第125回日本補綴歯科学会学術大会(金沢). 2016年7月9日.

中谷早希, 峯 篤史, 松本真理子, 岩下太一, 南野卓也, 川口明日香, 東 真未, 三浦治郎, 矢谷博文. 象牙質接着におけるNaOClとスルフィン酸塩処理1ステップシステムの長期接着能. 第124回日本補綴歯科学会学術大会(埼玉). 2015年5月30日.

[招待講演](計7件)

峯 篤史. 接着技法を最大限に活用した支台築造～ファイバーポストの科学的根拠～. 平成28年度日本補綴歯科学会西関東支部学術大会生涯学習公開セミナー(横浜). 2017年1月22日.

峯 篤史. 知っているようで知らない最新補綴治療の勘所～支台築造編～. 平成28年度日本補綴歯科学会九州・中国・四国支部合同学術大会シンポジウム(熊本). 2016年9月4日.

峯 篤史. 2016年における「接着歯学」～研究ベースの臨床に活かせるお話～. 大阪府歯科医師会学術講演会(大阪). 2016年5月21日.

峯 篤史. “接着”を駆使した修復・補綴臨床～表面・界面の科学と疫学研究を礎に～. 第36回岡山歯学会(岡山). 2015年9月27日.

峯 篤史. 臨床接着歯学～2014年における

トレンド～. 平成26年度日本補綴歯科学会中国・四国・関西支部合同学術大会ランチョンセミナー(岡山). 2014年9月7日.
峯 篤史. 接着歯学によるイノベーション創出～若手補綴臨床家のToDoリスト～. 第123回日本補綴歯科学会学術大会イブニングセッション(埼玉). 2014年5月24日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峯 篤史 (MINE, Atsushi)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 60379758

(2) 研究分担者

矢谷博文 (YATANI, Hirofumi)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 80174530