

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893142

研究課題名(和文)象牙質接着におけるコラーゲン劣化プロセスの多面的評価と架橋形成の影響の検討

研究課題名(英文)Evaluation of the effect of cross-linker on resistance of resin-dentin bonding degradation.

研究代表者

松本 真理子 (MATSUMOTO, Mariko)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：30733969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、象牙質接着の長期耐久性を獲得することを目的として、Cross-Linkerによるコラーゲン架橋形成の酵素分解抵抗性と免疫染色により、Cross-Linker処理が象牙質接着の長期耐久性に及ぼす影響の確認を引張接着試験および形態観察をSEMおよびTEMにより行った。その結果、免疫染色については、MMPの濃度や作用時間などの検討がさらに必要と考えられた。引張試験においては、Cross-linker(Riboflavin使用)処理群において、高い接着強さが認められた。SEMにおいてもレジントグの形成に違いが認められ、これらが長期予後にどう影響していくかは今後さらに検討が必要と思われる。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to acquire the long-term durability for resin-dentin bonding using cross-linker. We evaluated the ability of cross-linker to resist the degradation of dentin collagen caused by MMPs using immunostaining and the effect of cross-linker on the long-term durability of resin-dentin bonding with micro tensile testing, SEM and TEM observation. The results of the immunostaining was not clear. We couldn't find the significant difference. We need to consider the concentration and application time of MMPs. For micro tensile bond strength, the strength of the cross-linker(riboflavin) applied group was higher than that of other groups. Furthermore, the morphological observation by SEM showed that the excellent interface in all groups and the resin tags of cross-linker group were shorter than control but the density of them were almost the same between groups. We need to observe the interaction between bond strength and the morphology of the interface application time.

研究分野：接着歯学

キーワード：象牙質 コラーゲン Cross-linker

1. 研究開始当初の背景

1990年代に確立された歯質-レジンに対する接着技法によって、非侵襲でかつ審美的な欠損歯質の再建が可能となった。しかしながら、その長期的な臨床成績に関しては、主に接着界面の劣化による脱離や二次う蝕を引き起こし、接着耐久性はまだ十分とは言えず、日々の臨床において“再治療”が多く行われている。申請者はこれまで一貫して接着歯学の基礎的研究に従事しており、接着試験や接着界面観察といった接着能評価において初期接着能は非常に良い結果であるものの、その長期耐久性に問題があることを経験してきた。

接着材-象牙質界面の劣化に及ぼす要因として、レジンそのものの加水分解による劣化や界面付近の象牙質の劣化が考えられる。今回、「象牙質接着の長期耐久性獲得」を目標として、象牙質の劣化による長期耐久性への影響に着目した。

象牙質はエナメル質と比較して、その構成成分でコラーゲンを豊富に含む組織である。象牙質の劣化を引き起こす主な原因として、象牙質の主成分であるコラーゲンの分解が指摘されており、タンパク質分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(Matrix Metalloproteinase: 以下 MMP)とシステインカテプシン(Cystein Cathepsin: 以下 CT)がその原因として疑われてきた。

近年、MMP-2,3,8,9,20 や CT-B,K は、接着処理に用いる酸やう蝕による酸により象牙質基質内に発現することが報告されている(C.M.P. Vidal et al. 2014)。しかしながら、いまだこれらのタンパク質分解酵素の象牙質コラーゲンに対する影響や接着操作後の長期耐久性についての詳細は明らかではない現状がある。

一方で、近年、コラーゲン内の架橋構造を増強させることが、これらタンパク質分解酵素によるコラーゲン分解を防ぐ補助的処置として考案されており、酵素によって分解されない強固な架橋構造をコラーゲンに与える手法に関する研究が、主に眼科領域で進められている。

コラーゲンの架橋剤である Cross-Linker は現在注目されており、これまでにプロアントシアニジン、タンニン酸、リボフラビン等が分子内および分子間コラーゲンの架橋構造強化に効果的との報告がある。

2. 研究の目的

本研究は、象牙質接着の長期耐久性を獲得することを目的としている。その実現のために、象牙質コラーゲンをターゲットとし、Cross-Linker によるコラーゲン架橋形成の酵素分解抵抗性、および Cross-Linker 処理が象牙質接着の長期耐久性に及ぼす影響の確認を行う。

これまでに Cross-Linker の長期的予後に関する報告は少ないため、実際に架橋構造強化が象牙質の接着界面劣化を長期的に防ぐか否かの検証は十分に行われていない。

本研究では、コラーゲン強化については眼科学分野において既に臨床応用され、安全性の高い天然成分であるリボフラビン(Arbelaez MC et al. 2009)、およびコラーゲンの架橋効果としては強力である化学物質であるグルタルアルデヒドを使用した Cross-Linker 処理によるコラーゲン架橋の状態を確認する。そして、強化されたコラーゲン架橋により、象牙質接着の低下を阻止できるかを明らかにする。従来から行われてきた接着能評価(電子顕微鏡による界面観察および微小接着引張試験による接着強さ評価)を行うことにより、形態的变化と物理的变化の関係を明らかにする。これらより、コラーゲン架橋効果と象牙質接着の長期耐久性との関連性を検討する。

接着歯学の研究は、接着処理後 24 時間もしくは 1 週間後における接着能の評価が中心であり、その評価法としては上記の機械的性質の評価である接着試験と電子顕微鏡を用いた形態観察が通例となっていた。しかしながら、これらの手法では、長期耐久性とコラーゲンの架橋効果について直接的な因果関係を検討出来ない。

そこで本研究では、これまでの手法に加えて、免疫染色により MMP によるコラーゲン分解が Cross-Linker によるコラーゲン架橋形成により防ぐことが示すことが出来れば、より象牙質-レジン接着の長期耐久性の獲得に対して、Cross-Linker の効果の評価が詳細にできるものと考えられる。

本研究で、Cross-Linker 処理が、象牙質基質内タンパク質分解酵素によるコラーゲン劣化に与える影響について多面的に評価することで、接着処理後の象牙質の劣化を防止するために重要な基礎的知見が得られると考えられる。

また、接着技法前にコラーゲン架橋を強化する「新規象牙質処理」を具体的に示すことにより、これまでの“再治療”を可及的に減らすことができ、将来的に永久的な歯科治療を実現することに一歩近づく。このことは国民の健康の維持増進に大きく寄与できるものと考えられる。



3. 研究の方法

(1)象牙質-レジン接着界面評価

試料の作製

健全なヒト抜去第三大臼歯の歯冠を、最大豊隆部でダイヤモンドブレードにて歯軸に対して垂直に切断後、切断面にエナメル質残存がないことを確認し、#400 および #600 の耐水研磨紙にて流水下で研磨を行った。

使用した Cross-Linker は、0.5%リボフラビン溶液および 5%グルタルアルデヒドとし、接着システムは、2ステップセルフエッチングシステムのクリアフィルメガボンドとした。

まず、象牙質平滑面を露出した歯をそれぞれの Cross-Linker 溶液に1分もしくは5分浸漬後、水洗を行った。続いて、クリアフィルメガボンドを業者指示通りに処理し、クリアフィル AP-X を高さ 4mm に築盛し、照射を行った。その後 37 °C 水中に 24 時間および 1 年保存した。

各実験グループは以下の通りとする。リボフラビン 1 分浸漬群(R1)、リボフラビン 5 分浸漬群(R5)、グルタルアルデヒド 1 分浸漬群(GA1)、グルタルアルデヒド 5 分浸漬群(GA5)、Cross-Linker 処理なし(SE)。

微小引張接着 (μ TBS) 試験

で作製した各試料を、0.7 mm \times 0.7 mm の角柱状に切断し、接着引張試験用試料とした。これらを引張接着試験専用のジグにモデルリペアで装着した後、小型卓上試験機 (EZ-S, 島津製作所, 京都) を用いて微小引張接着試験をおこなった。

走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

微小引張接着試験後の試料の破断面の観察を行った。観察試料を Pt-Pd 蒸着を行った後、走査電子顕微鏡 (SEM) 観察し、破断面の形態について詳細に検討をおこなった。

また、それぞれの実験グループ試料の接着界面の観察をおこなった。で作製した試料を歯軸に平行に 1mm の厚さで切り出し、観察面を、まず耐水研磨紙 #800, #1000, #1200 の順に使用して研磨し、次いでダイヤモンドペーストを粒子サイズ 6 μ m, 3 μ m, 1 μ m の順に使用して研磨をおこない、各ペーストの間には超音波洗浄をした。その後、1M 塩酸に 30 秒、次いで 5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 5 分浸漬し、蒸留水で水洗した。試料を乾燥させた後、Pt-Pd 蒸着をおこない、走査電子顕微鏡 (SEM) で接着界面の観察をおこなった。

透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

で切り出した試料を使用し、まず 1M 4% グルタルアルデヒド溶液で固定をおこなった後、カコジレート緩衝液で洗浄し、続いて 1% オスミウム溶液で 2 時間固定をおこなった。再度カコジレート緩衝液で洗浄後、

50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% のエタノール溶液で段階脱水をおこなった。その後、エポキシレジン:エタノールが 1:1 および 1:2 の混合液にそれぞれ 30 分浸漬後、100% エポキシレジンに真空状態で 60 分を 2 回浸漬し、その後 60 度の高温槽で 4 日間加熱重合をおこなった。エポキシレジンが重合後、ミクロトームで約 90nm の厚みに薄切した。薄切試料は透過型電子顕微鏡 (H800, 日立, 東京) を用いて観察をおこなった。

(2) Cross-linker のコラーゲン架橋形成能とコラーゲン分解抵抗評価 -免疫染色-

ヒト新鮮抜去第三大臼歯の歯冠部象牙質を、1mm \times 1mm \times 5mm の棒状に切り出した後、10% EDTA 溶液に 2 週間浸漬し、脱灰をおこなった。その後、0.5% リボフラビン、5% グルタルアルデヒドに 1 分もしくは 5 分浸漬、および 0.5% リボフラビンに浸漬中、紫外線照射をおこなった。続いて Cross-Linker 処理象牙質および非処理象牙質に対して、MMP2 および 9 溶液処理をおこなった。その後、コラーゲン抗体 (一次抗体, 二次抗体) を作用させた後、染色をおこない、光学顕微鏡にて観察をおこなった。

4. 研究成果

(1) 微小引張接着試験

接着 24 時間後の引張接着試験の結果を図 1 に示す。

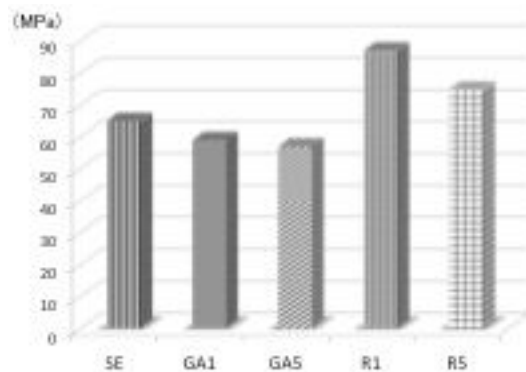


図 1. 各 Cross-Linker 処理象牙質に対する微小引張接着強さ

SE は 64.77 \pm 16.15MPa, GA1 は 58.83 \pm 23.57MPa, GA5 は 56.85 \pm 22.85MPa, R1 は 86.9 \pm 20.01MPa, R5 は 74.77 \pm 16.26MPa という結果となっている。

リボフラビン 1 分および 5 分処理群が、他の群に比べて高い値を示しており、1 分処理群が最も高い値を示した。

現在、試料を長期水中保管中であり、今後測定予定である。

(2) SEM 観察

破断面観察

微小引張試験後の試料の破断面のうち、象牙質側の破断面様式について詳細に検討を

おこなった。

それぞれの代表的な像を図 2 におよび図 3 に示す。

GA1 は、図 2 にみられるように、研磨傷が認められることからアドヒーズの象牙質側最下層付近での破断が多く認められた。GA5 に関しては GA1 に比べてややアドヒーズ内での破断が多く認められた。

R1 および R5 に関しては、破断面に象牙細管が多く認められることから、象牙質内での破断が多かった。R1 および R5 の破断面に大きな相違は認められなかった。

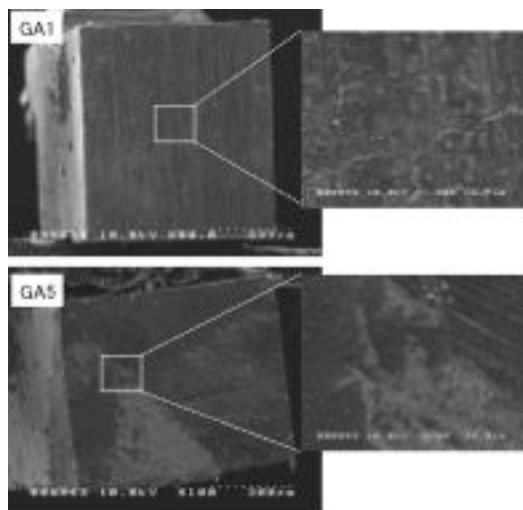


図 2. GA1 および GA5 の破断面の象牙質側代表像

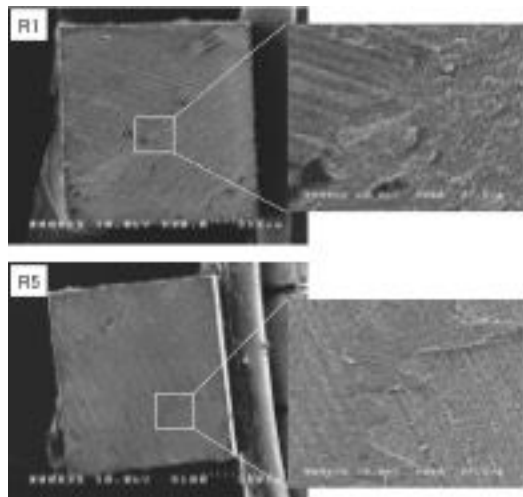


図 3. R1 および R5 の破断面の象牙質側代表像

接着界面の SEM 観察

図 4 に Cross-Linker 非処理の SE bond のみ処理した接着界面および R5 の接着界面の SEM 像を示す。

SEM においては、長くて密なレジンタグが観察され、非常に良好な接着界面が得られていることがわかる。一方、R5 においては、SE 群に比べてややレジンタグは短いものの、密度は非常に高く、また側枝への浸透が認められる部位もあり、接着界面の状態としては非常に良好な状態であることがわかる。

接着界面の SEM 像に関しても、長期保存試料においても今後行っていく予定である。

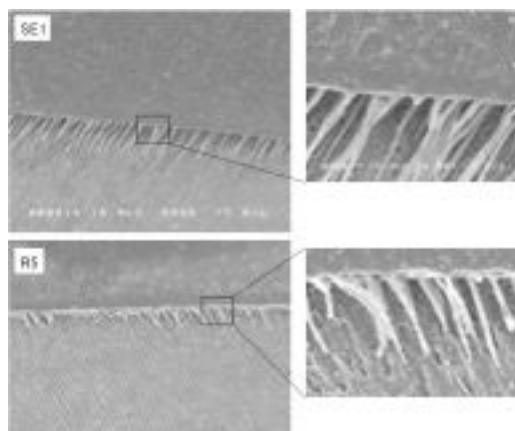


図 4. 接着界面の SEM 像

(3) TEM 観察

24 時間および長期保存試料をエポキシ樹脂包埋をおこない、TEM 試料を作製し、現在薄切をおこなっている。透過型電子顕微鏡を用いての観察は今後引き続きおこなっていく。

(4) 免疫染色

Cross-Linker 処理象牙質の、MMP によるコラーゲン分解に対する抵抗性の向上についての検討をおこなった。

染色の状態を確認したが、Cross-Linker 処理と非処理において、明らかな相違を現在認められていない。処理に使用した MMP の濃度、処理時間等について不十分である可能性が考えられ、また実際の臨床における状態の再現についても今後条件を変えながら再検討をおこなっていく必要があると考える。

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)

Mariko Matsumoto

Bonding effectiveness and multi-interfacial characterization of two direct buildup resin core systems bonded to post-space dentin. Clin Oral Investig. 2016 Mar 22. [Epub ahead of print] 査読 有

[学会発表](計 1 件)

松本 真理子

新規チオリン酸エステルモノマー配合ボンディング材の象牙質接着性能

日本歯科保存学会 平成 27 年度春季大会 北九州国際会議場(北九州市) ポスター発表 2015.6.26

[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

松本 真理子 (MATSUMOTO, Mariko)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：30733969

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし