

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06644

研究課題名(和文) タンニン酸を使用した象牙質コラーゲンの強化と象牙質接着耐久性の向上

研究課題名(英文) Effect of tannic acid on reinforcement of collagen and improvement of bond durability on dentin

研究代表者

會田 悦子 (AIDA, Etsuko)

日本大学・松戸歯学部・兼任講師

研究者番号：90758088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：象牙質と樹脂含浸層を介して接着することから接着性レジンセメントが多用されているが、経年的に接着性が低下することがわかっている。その原因として樹脂含浸層内にある象牙質コラーゲンの加水分解が挙げられる。本研究は、象牙質を強化することで接着耐久性を向上させることを目的とした。始めに、象牙質コラーゲンの抽出法の確立を検討した。牛象牙質をタービンで切削、または機械的に粉碎し、象牙質粉末を作成した。これらの粉末をEDTAで処理して抽出した象牙質コラーゲンの熱変性温度を測定した。その結果、それぞれ55～65℃、75～80℃であり、象牙質コラーゲンの抽出は機械的に粉碎した粉末をEDTAで処理することとした。

研究成果の概要(英文)：In clinical dentistry, adhesive resin cements are widely used capable of bonding to dentin through hybrid layer. However it was reported bond strength of adhesive resin cement is gradually decreased due to hydrolyze the dentin collagen in hybrid layer. The purpose of this study was to obtain the high adhesive durability by reinforcing the dentin. The method for the efficient extraction of collagen from dentin was firstly investigated. Two types of dentin powders from bovine teeth were prepared, one with air turbine and another with mechanical comminution. Thermal denaturation temperature of the dentin collagens which were extracted with EDTA treated from these dentin powders, were determined. Thermal denaturation temperature of dentin collagens by air turbine and mechanical comminution were 55～65℃ and 75～80℃ respectively. In conclusion, it was decided the method for the efficient extraction of collagen were preparing with mechanical comminution in this experiment.

研究分野：歯学

キーワード：タンニン酸 コラーゲン 接着

## 1. 研究開始当初の背景

う蝕や外傷などによる実質欠損に対し、歯科臨床では機能の回復と審美性確保の目的で、人工物による歯冠補綴治療が頻繁に行われている。歯冠補綴装置は長期間、口腔内に維持されることが重要であるが、接着性レジンセメントを用いて象牙質に合着する場合、酸を用いて象牙質面を処理する。その酸処理によって影響を受けた樹脂含浸層内または樹脂含浸層直下のコラーゲンが歯冠補綴装置合着後の長期にわたる水の浸入により、加水分解してしまうことが原因で、象牙質と接着性レジンセメントとの接着性は経時的に低下すると報告されている。

一方、歯質強化を目的としてタンニン・フッ化物化合物(以下、HY 材)が開発され、多くの研究が行われている。HY 材は構成成分中のタンニン酸がタンパクを収斂凝固させることが知られている。著者はこれまでにタンニン酸を用いた象牙質コラーゲンと同型の型コラーゲン(牛アキレス腱由来のコラーゲン:テンドン)の強化とタンニン酸で処理したテンドンの酸に対する影響について検討し、接着歯学 32 巻 4 号に報告した。その結果、タンニン酸で処理したテンドンは 40%リン酸溶液または 10%クエン酸溶液に対してゲル状に変化することがなく、すなわち、強化されていることがわかった。

そこで、タンニン酸を利用して、象牙質コラーゲンを強化できる可能性があり、その結果、象牙質と接着性レジンセメントとの接着耐久性の低下の原因とされている象牙質コラーゲンの加水分解を抑制し、接着耐久性を向上することができるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

歯科臨床では、象牙質に対して接着性を示すことから、歯冠補綴物の装着に、接着性レジンセメントが多用されている。象牙質と接着性レジンセメントとの接着は、象牙質側に

形成される樹脂含浸層によって行われる。この樹脂含浸層は象牙質を酸処理し、プライマーによって露出したコラーゲンの浸潤性を回復し、そこにボンディング材が浸透することによって形成される。しかし、この樹脂含浸層は経時的に劣化し、結果として、象牙質と接着性レジンセメントとの接着耐久性が低下する。その原因として、歯冠補綴物装着時に行われる象牙質の酸処理が象牙質コラーゲンにダメージを与え、ダメージを受けた象牙質コラーゲンが長時間にわたる樹脂含浸層内への水の浸入によって加水分解してしまうことであるとされている。

本研究では、タンパク収斂作用を有するタンニン酸を用いて象牙質コラーゲンを強化し、象牙質コラーゲンの加水分解を抑制することによって樹脂含浸層の劣化を防止し、象牙質と接着性レジンセメントとの接着耐久性を向上させることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) コラーゲンの抽出法の検討

本研究を遂行するにあたり、象牙質から象牙質コラーゲンの抽出を行わなければならない。過去の文献では、象牙質を液体窒素中で粉碎し、その粉末をリン酸やクエン酸あるいは EDTA を用いて脱灰し、コラーゲンの抽出を行っているとされている。しかし、コラーゲンの抽出法が具体的に記載しているものはなく、不明な点が多い。そこで、本研究では、象牙質コラーゲンの抽出法について検討した。

著者は、象牙質コラーゲンの抽出を行うための参考として、象牙質コラーゲンと同じ型コラーゲンであり、象牙質コラーゲンを想定した実験にしばしば使用されている牛アキレス腱由来のコラーゲン(以下、テンドン)を用いて、象牙質コラーゲンを抽出するために用いられているリン酸、クエン酸または EDTA にて一定時間処理した場合のコラーゲンの変性について検討した。その結果、40%

リン酸を用いて象牙質粉末を処理した場合、テンドンは完全にゲル化し、また、10%クエン酸を用いた場合においてもテンドンのほとんどがゲル化し、変性してしまうことを確認した。しかし、EDTA で処理した場合は、コラーゲンがゲル化せず、原型を留めていたことから、本研究での象牙質コラーゲンの抽出には EDTA を用いることとした。さらに、象牙質粉末の作製は、臨床における歯の切削法を考慮し、歯科用タービンを使用する場合と、象牙質をブロックとして切り出し、それを機械的に粉碎する場合の2つの方法で行うこととした。

牛歯象牙質を歯科用タービンまたはクラッシャー（当補助金にて購入した機械的粉碎機）を用いて粉碎した。著者らの過去の研究で歯科用タービンを用いて象牙質を切削した場合、その粒子の大きさが200メッシュの篩を通過したものが全体の約7割を占めていたことから、それぞれの方法にて粉碎した象牙質を更に粉碎し、200メッシュ以下の象牙質粉末（当補助金にて購入した自動篩機）を作製し、実験に用いた。それぞれの方法にて作製した象牙質粉末3gを60mlのEDTA緩衝液に1, 3, 6, 12, 24時間浸漬した後、蒸留水にて洗浄・乾燥し、象牙質コラーゲンを抽出した。抽出した象牙質コラーゲンは示差熱-熱重量同時測定装置(TG-DTA)を用いて、有機・無機成分の割合を測定し、脱灰の程度を観察するとともに、抽出した象牙質コラーゲンの変性の様子を示差走査熱量測定装置(DSC)にて熱変性温度を測定することによって検討した。

尚、本実験における象牙質コラーゲンの抽出法の再現性を確認するため、同じ方法を3回繰り返し、実施した。

#### 4. 研究成果

##### 1) TG-DTA による有機質及び無機質量の測定

タービンにて作製した粉末(以下,TP)は、

脱灰後の有機質の量が、1時間の浸漬の場合、87~91%、3時間で80~90%、6時間で77~91%、12時間で84~89%と安定せず、24時間では95~97%と安定した値を示した。この状態は3回繰り返し行った場合に共通していた。

クラッシャーにて作製した粉末(以下,CP)は、1時間の浸漬の場合、83~95%、3時間で79~96%、6時間で82~94%、12時間で89~93%と、TP同様安定せず、24時間では、95~98%と安定した。この状態は3回繰り返し行った場合に共通していた。

以上の結果から象牙質粉末3gに対して、EDTA60mlを使用して脱灰した場合、浸漬時間を24時間とすることによって、95%以上、脱灰されていることがわかった。しかし、この方法によって脱灰した場合、象牙質粉末3gから抽出できるコラーゲンの量は約0.5gであり、その後の各種濃度のタンニン酸による強化に使用する場合を考慮すると、この量では不足してしまうことから、以後の象牙質コラーゲンの抽出には、この点を考慮し、10gの象牙質粉末に対して100mlのEDTAを用いて処理し、処理時間は24時間とすることで、目的とする象牙質コラーゲンを抽出することとした。すなわち、象牙質コラーゲンの抽出法の1つを確立することができた。

また、EDTA処理前のTPおよびCPのTG-DTA測定ではどちらの粉末においても有機成分が約70%、無機成分が約30%であり、牛象牙質中の有機成分量は人象牙質よりやや多い量であることがわかった。

##### 2) 抽出した象牙質コラーゲンのDSCによる熱変性温度の測定

TPおよびCPにおけるEDTA処理前のDSC測定では、コラーゲンの熱変性温度を示す吸熱ピークは観察できなかった。

TPでは、いずれのEDTA処置時間においても、60~65で変性温度を示す吸熱ピーク

が検出された。

CP では、いずれの EDTA 処理時間においても、70 ~ 80 で熱変性を示す吸熱ピークが検出された。

EDTA 処理前の TP および CP の DSC 測定において、熱変性を示す吸熱ピークが観察されなかったことは、牛象牙質中に含まれているコラーゲンの割合が TG-DTA 測定の結果、約 30% であり、DCS 測定時に使用する象牙質粉末 5.0mg 中には約 1.5mg しか含まれていないことになることから、この量では吸熱ピークが観察できない状態であることが考えられる。また、象牙質中のコラーゲンはアパタイトで囲まれている状態であることから、変性しにくいことが考えられる。このことは新しい発見であり、解明も行わなければならない課題である。

また、EDTA 処理後の TP が CP それぞれのコラーゲンの熱変性温度は処理時間の違いに関わらず、TP が 60 ~ 65、CP が 70 ~ 80 であり、TP が CP より、10~15 低い結果であったことは、歯科用タービンで切削する際、ダイヤモンドバーと象牙質とが接触する部分のスプレーによる冷却が不十分であり、発生した熱によって象牙質コラーゲンの一部が熱変性を起こしてしまった可能性が考えられたため、現在、FTIR 装置を用いて、EDTA 処理後の TP および CP の構造分析の準備を行っているところである。

今後は、TP および CP から EDTA を用いて抽出したコラーゲンのタンニン酸による強化と、それによる象牙質と接着性レジンセメントとの接着耐久性への影響を検討する予定である。

#### 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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

會田 悦子 (AIDA, Etsuko)

日本大学・松戸歯学部・兼任講師

研究者番号：90758088

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )