

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11105

研究課題名(和文) レジンとエナメル質との接着界面に生成したABRZの構造解析

研究課題名(英文) Structural analysis of ABRZ formation at the resin-enamel interface

研究代表者

二階堂 徹 (NIKAIDO, Toru)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：00251538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：セルフエッチングシステムは、リン酸処理と比べてマイルドであり、エナメル質の処理に懸念がある。本研究では2ステップ及び1ステップセルフエッチングシステムのエナメル質接着界面について、酸-塩基処理後に電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、どの接着システムにおいても接着界面直下に酸塩基抵抗層(Acid-Base Resistant Zone, ABRZ)の形成が認められた。ABRZの形態は、接着システムによって異なり、2ステップでは質の高いABRZが観察されたが、1ステップではABRZ直下にErosionが形成された。リン酸処理によってABRZは肥厚し、1ステップでは必須であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：A self-etching primer is much milder than phosphoric acid, which is concerned in enamel bonding. The purpose of this study was to evaluate the acid-base resistant zone (ABRZ) at the adhesive/enamel interface of self-etching adhesives with/without prior phosphoric acid etching. After application of self-etching adhesives on enamel surfaces, a flowable composite was placed. For observation of the acid-base resistant zone (ABRZ), the bonded interface was subjected to the acid-base challenge, morphological attributes of the interface were observed using SEM. ABRZ formation was confirmed in all groups, however, the morphology of the ABRZ was adhesive material dependent. The funnel-shaped erosion beneath the interface was present in one-step self-etch adhesives. With phosphoric acid etching, the ABRZs were obviously thicker compared with no phosphoric acid etching. In the case of the one-step self-etching adhesives, enamel etching should be recommended to improve the interfacial quality.

研究分野：保存修復学

キーワード：エナメル質 ABRZ 接着 セルフエッチング接着システム リン酸エッチング 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

従来の接着システムは、エッチング、プライミング、ボンディングの3ステップシステムであり、エナメル質と象牙質ともにリン酸エッチング処理を施すトータルエッチングシステムであった。リン酸によるエナメル質のエッチングは、その強い酸性 (pH1 未満) からエナメル質表面に蜂巢様構造を形成し、その凹凸に接着材が浸透・硬化することで機械的嵌合力が生じた。しかし、リン酸エッチングは象牙質に対するダメージが強く、よりマイルドなセルフエッチングプライマーが開発された。最初に開発されたのは、2ステップセルフエッチング接着システム (以下2-SEA) であり、酸性機能性モノマーを配合することによってエッチングとプライミングの処理を一体化することに成功した。セルフエッチングプライマーの脱灰力 (pH2 前後) は、よりマイルドであり、セルフエッチングプライマーによりエナメル質・象牙質を同時処理が可能となった。さらにセルフエッチングプライマーとボンドを一体化した1ステップセルフエッチング接着システム (以下1-SEA) も開発され、臨床手順のより一層の簡略化が行われている。しかし、1-SEA はさらにマイルドであり、エナメル質に対する処理が不十分となることが懸念されている。最近では、この酸処理の問題を補う方法としてリン酸をエナメル質に限局して使用するセレクトティブエッチング法も提唱されているが、その効果を検証した報告は少ない。

レジンと歯質との接着界面の耐久性を *in vitro* で検証するため、接着界面を酸 - 塩基処理後に電子顕微鏡で観察する手法が開発され、主に象牙質の接着界面を中心に検討されてきた。その中で、樹脂含浸層の直下に酸 - 塩基処理に抵抗を示す歯質類似構造が確認され、これを酸塩基抵抗層 (ABRZ) と称

している。この ABRZ の形成は、修復物における接着界面の封鎖性に重要な役割を果たし、修復物の長期耐久性の向上にも寄与する可能性がある。近年、エナメル質との接着界面においても ABRZ の形成と形態学的評価が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、2-SEA 及び 1-SEA のエナメル質接着界面の酸塩基処理後の形態学的変化について観察し、さらにリン酸によるセレクトティブエッチングがその形態学的変化に及ぼす影響についても比較検討した。

3. 研究の方法

図1に試料作製方法を示す。ヒト抜去小臼歯と大臼歯からエナメル質切片を切り出し、エポキシ樹脂に包埋後、表面を耐水研磨紙 (#600) にて研削した。試料はリン酸エッチングの有無によって2群に分け、4種の接着システム: Clearfil SE Bond (SEB)、Optibond XTR (XTR), Scotchbond Universal Adhesive (SBU), Clearfil BOND SE ONE (ONE) を用いて接着した群と、40%リン酸 (K-etchant GEL) を10秒塗布・水洗後、各接着材を塗布した群とに分けた。その後、コンポジットレジン (Clearfil Majesty LV) を築盛し、24時間水中保管後、試料を半切して再びエポキシ樹脂包埋した。さらに試料表面を耐水研磨紙 (#600-1200) にて研削後、人工脱灰液 (pH4.5, 2.2 mmol/l CaCl₂, 2.2 mmol/l NaH₂PO₄, 50 mmol/l 酢酸) にて4.5時間脱灰し、さらに5% NaOCl 水溶液にて20分間超音波洗浄した後、水洗した。試料を切り出し、ダイヤモンドペースト (6-0.25 μm) を用いて鏡面研磨後、アルゴンイオンエッチング、金蒸着を行い、走査電子顕微鏡 (SEM) 観察を行った。

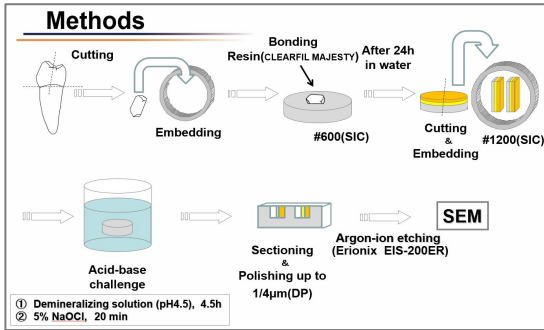


図1．レジン-エナメル質接着界面における ABRZ 観察の試料作製方法

4．研究成果

SEB と SBU の代表的な SEM 像を図2・図3に示す。

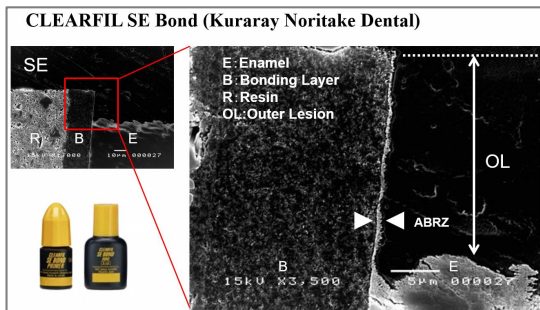


図2．2ステップセルフエッチング接着システムとエナメル質との酸塩基処理後の接着界面のSEM観察

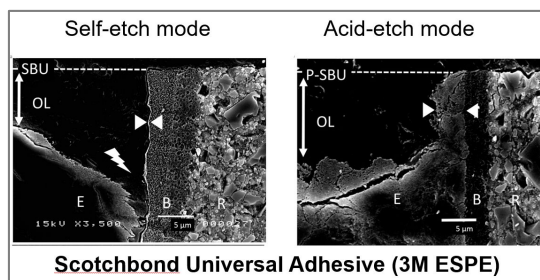


図3．1ステップセルフエッチング接着システムとエナメル質との酸塩基処理後の接着界面のSEM観察(左：セルフエッチング処理、右：リン酸によるセレクトティブエッチング処理)

酸塩基処理後のエナメル質接着界面のSEM観察の結果、すべての群において10~15μmのOuter lesion、及びボンディング層直下にABRZの形成が確認された。ABRZの厚みは各群で異なり、XTR(約1μm)のABRZは、SEB(約0.5μm)と比べて厚く、SBUおよびONEにおいてはより薄いABRZ(約0.2μm)が確認

された。一方、リン酸処理群においては、厚いABRZ(約5μm)が認められた。SBUおよびONEにおいては、ABRZ直下にエロージョンの形成が認められたが、その他の群においてはエロージョンの形成は認められなかった。

エナメル質処理表面のSEM観察において、SEBおよびXTRではエナメル小柱構造を認めたが、明瞭な蜂巢様構造は確認できなかった。またSBUおよびONEでは、スマヤー層がエナメル質表面を覆っており、エナメル小柱およびエッチングの様相は確認できなかった。一方、リン酸エッチング処理した場合、エナメル質表面には、明瞭な蜂巢様構造が観察された。

セルフエッチング接着材における機能性モノマーは、水の存在下で歯質のエッチング材として機能し、次いでモノマーの浸透を促進し、さらに歯質のHApと化学的に反応すると考えられる。この化学反応によって生じた塩は、歯質のHAp結晶を酸によるダメージから保護してABRZを形成すると推測される。エナメル質は、象牙質と比べて無機質の構成比率が高く、比較的マイルドなセルフエッチングプライマーでは脱灰が弱く、レジントグの形成による十分な機械的嵌合効果が得られない可能性がある。一方、リン酸エッチング処理は、セルフエッチング処理と比べてエナメル質のより深部まで脱灰することにより、モノマーの浸透を促すことが可能である。リン酸エッチングによってエナメル質に対する接着強さの向上が報告されており、臨床においてはエナメル質に対する選択的なリン酸処理(セレクトティブエッチング)も提案されている。2-SEAにおいてリン酸処理の併用によってエナメル質に形成されるABRZの肥厚化が報告されているが、本実験においてもSEB、XTRにおいて同様の結果が認められた。しかし、SEBおよびXTRにおいては、リン酸処理を併用せずとも良好なABRZの形成が確認でき、ABRZ直下にエロージョンの形成

は認められなかった。ABRZ の厚みは各々約 0.5 μm 、約 1.0 μm であったが、この厚みの違いは、セルフエッチングプライマーの酸性度の違いによるものと考えられる。

接着システムの機能性モノマーの違いは、接着強さのみならず、ABRZ の形成にも影響を及ぼすことが報告されている。SEB と XTR は、各々リン酸系機能性モノマーである 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate (MDP) と glycerol phosphate dimethacrylate (GPDM) を含有する。MDP と HAp の化学的相互作用については、多くの報告があるが、本研究結果から GPDM は MDP と同様の効果を有することが示唆されたが、今後さらなる検討が必要である。

SEB、SBU、ONE は、いずれも機能性モノマーとして MDP を含有するが、各群で形成された ABRZ には形態学的な違いが認められた。すなわち、1-SEA である SBU および ONE においてのみ、ABRZ 直下にエロージョンの形成が認められた。このことは ABRZ 直下に酸-塩基処理に対して脆弱な部分が存在することを示している。MDP は水-エタノール溶媒中において強い酸性を示し、溶解された HAp 表層には MDP-カルシウム塩の形成が報告されている。1-SEA は、機能性モノマーと水及び溶媒が 1 液中に存在しているため、水の配合比率が 2-SEA のセルフエッチングプライマーより少ない。このため 1-SEA におけるモノマーとハイドロキシアパタイトとの相互作用が不十分となり、ABRZ 直下に脱灰しやすい脆弱な部位が形成された可能性が考えられる。

一方、リン酸エッチング後に SBU、ONE にて接着した場合、ABRZ の厚みは約 5 μm であり、エロージョンの形成も認められなかった。このことはリン酸エッチングによりエナメル質結晶に微細多孔構造が形成され、モノマーのエナメル質深くへの浸透を促したと考えられる。また、豊富なカルシウム、リン酸塩および水酸化物の各イオンが HAp 表面から

溶出した場合、これらのイオンの飽和がメタクリレート樹脂との良好な相互作用を示し、DCPD ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) の堆積を生じることが報告されている。これによってリン酸エッチングにより MDP とカルシウム塩の反応性が向上し、エロージョンが阻止された可能性も考えられる。ABRZ の厚みの違いは、エナメル質の接着界面の保護にとっての必要条件ではないが、リン酸エッチングによって 1-SEA の接着界面に形成される脆弱な部位を補うことが可能であるため、臨床においては 1-SEA におけるエナメル質の選択的なエッチングが推奨される。一方、2-SEA においては、リン酸エッチングは必ずしも使用する必要はなく、セルフエッチング処理によって十分に満足できる接着界面が形成できることがわかった。

エナメル結晶の八ニカム構造に対する機能性モノマーの浸透とそれに次ぐモノマーの浸透、HAp との化学的相互作用がエナメル ABRZ の形成に寄与すると考えられるが、そのメカニズムはいまだ不明な点が多い。本研究においては、エナメル質表面に対する評価を行ったが、臨床的観点からは非切削エナメル質に対する影響についての研究も必要である。さらに接着材からのフッ化物の徐放もエナメル質 ABRZ の形成に及ぼす影響についても今後検討が必要である。

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4件)

Nikaido T, Tagami J, Yatani H, Ohkubo C, Nihei T, Koizumi H, Maseki T, Nishiyama Y, Takigawa T, Tsubota Y. Concept and clinical application of the resin coating technique for indirect restorations. Dent Mater J 37 (2), 192-196. doi: 10.4012/dmj.2017-253. (査読あり)

Nakazawa Y, Suzuki S, Inoue G, Nikaido T, Tagami J, Moriyama K. Influence of orthodontic self-etch adhesive on acid resistance of surface enamel. Dent Mater J. 2018 Mar 28 (on line). doi: 10.4012/dmj.2017-109. (査読あり)

Sato T, Takagaki T, Matsui N, Hamba H, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Morphological evaluation of adhesive-enamel interface with 2-step self-etching adhesive and multi-mode one-bottle self-etching adhesives. J Adhes Dent 2016;18(3):223-229. doi: 10.3290/j.jad.a36135. (査読あり)

Bista B, Nakashima S, Nikaido T, Sadr Ali, Takagaki T, Maja Romero, Sato T, J Tagami. Adsorption Behavior of Methacryloyloxy Decyldihydrogen Phosphate on an Apatite Surface at Neutral pH. Eur J Oral Sci. 2016 Apr; 124(2): 195-203. doi: 10.1111/eos.12254. (査読あり)

[学会発表](計9件)

スマヤ ハラビ、松井七生子、二階堂徹、田上順次。Office Bleaching がエナメル質接着強さに及ぼす影響日本歯科保存

学会 2017 年度春季学術大会 (146 回) 青森、平成 29 年 6 月 8, 9 日。

熊谷 薬師神 ローゼ, 高垣智博, 佐藤隆明, 二階堂徹, Rodrigues JA, Reis AF, 田上順次。接着性レジンセメント - エナメル質界面における Acid-Base Resistant Zone の観察。第 36 回日本接着歯学会学術大会、タワーホール船堀、東京、平成 29 年 11 月 25 日、26 日。

Sato T, Takagaki T, Guan R, Nikaido T, Tagami J. Evaluation of the enamel/bond interfaces of multi-mode one-bottle self-etching adhesives. Brazil-Japan Joint Research Workshop on Adhesive Dentistry, UNICAMP, Sao Paulo, Brazil, Oct 31, Nov 1, 2017.

Nikaido T. Minimal invasive approach using advanced adhesive materials and technology. University of Vale do Itajai (UNIVALD), Itajai, Brazil, May 2, 2017.

Nikaido T. Acid-Base Resistant Zone (ABRZ) - New concept of adhesive-tooth interface. Taiwan Academy of Operative Dentistry, Taipei, Taiwan, Oct 14, 2017.

Nikaido T. Assessment of adhesive materials for direct composite restorations. Brazil-Japan Joint Research Workshop on Adhesive Dentistry, UNICAMP, Sao Paulo, Brazil, Oct 31, Nov 1, 2017.

柿内裕輔、高垣智博、池田正臣、佐藤隆明、松井七生子、二階堂徹、田上順次。2 ステップセルフエッチシステムにおけるボンド中の MDP、NaF がエナメル質接着性能に及ぼす影響日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会(145 回)、松本、平成 28 年 10 月 27, 28 日。

佐藤隆明, 高垣智博, 二階堂徹, 田上順次。新規ワンステップセルフエッチングシステムとエナメル質との接着界面における ABRZ 形態の観察。第 35 回日本接

着歯学会学術大会、北海道大学学術交流
会館、平成 28 年 12 月 3 日。

Nikaido T. Clinical application of advanced
adhesive materials and technology, Special
lecture program, Faculty of Dentistry,
Masaryk University, Brno, Czech Republic,
Dec 14, 2015.

〔図書〕(計 3 件)

二階堂徹 . 歯学の行方 ; 歯質に対する接
着研究の行方、日本歯科評論 2016
April;76(4):11-13.

二階堂徹 . 臨床のヒント、セルフエッチ
ングシステムのエナメル質の接着は大
丈夫か、東京医科歯科大学歯科同窓会報、
185、March, 28 - 31、2016.

Nikaido T, Inoue G, Takagaki T,
Takahashi R, Sadr A, Tagami J. Resin
Coating Technique for Protection of
Pulp and Increasing Bonding in
Indirect Restoration. Curr Oral
Health Rep June 2015, Volume 2, Issue
2, pp 81-86.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

二階堂 徹 (NIKAIDO, Toru)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・講師
研究者番号 : 0 0 2 5 1 5 3 8

(2)研究分担者

井上 剛 (INOUE, Go)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号 : 4 0 4 3 1 9 2 8

高垣智博 (TAKAGAKI, Tomohiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号 : 6 0 5 1 6 3 0 0