

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 18日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791859

研究課題名（和文）象牙質再石灰化能を有するボンディング材の開発に関する研究

研究課題名（英文）Development of bonding material inducing dentin remineralization

研究代表者

伊藤 修一（ITO SHUICHI）

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：50382495

研究成果の概要（和文）：*in vitro* 石灰化誘導実験系において、新規開発モノマーCMET がモデル脱灰象牙質基質(PV)より速やかにハイドロキシアパタイトを誘導した。微小引張り試験において、新規開発モノマーCMET, CMEPの配合率が5%と10%の時に、コントロールの4-META/MMA-TBBレジンと同等の高い接着強さを示した。配合率が上昇するにしたがって接着強さが有意に低下した。

研究成果の概要（英文）：In mineral induction experiments *in vitro*, the newly developed monomer, CMET, induced hydroxyapatite formation more rapidly than the model decalcified dentin matrix (PV). In the micro-tensile bond test, 4-META/MMA-TBB resin containing the newly developed monomers, CMET and CMEP at a concentration of 5 and 10% showed a high adhesive ability, equal to 4-META/MMA-TBB resin alone as a control. However, bond strength decreased significantly with the increase of the concentration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：歯学・象牙質・再石灰化・ボンディング材・生体材料

## 1. 研究開始当初の背景

近年、歯科保存修復学の分野において歯の象牙質に対する接着性材料が著しく進歩し、歯科臨床において、より頻繁に使用されている。従来は浸透性、接着性に重点をおいて接着性モノマーの開発が行われてきたが、抗菌性のモノマーの配合など接着性修復材料の多機能化が進んでいる。

しかしながら、接着修復物の脱落、修復物周囲の2次カリエスなど長期的な耐久性には、まだまだ改善すべき点が多い。脱灰象牙質においてボンディング材が浸透していないナノリーケージが存在し、この部分から経時的に修復材の崩壊が始まることが報告されている(Sano et al. Oper Dent20, 1995)。また、これまで我々は、ボンディング材が吸水

により、経時的に崩壊することを報告した (Ito et al. Biomaterials26, 2005) . 一方、接着の対象となる象牙質においては、象牙質リンタンパク質が石灰化・再石灰化に重要な役割を果たしていることを明らかにした (Ito et al. J Biomed Mater Res 2004). これらの研究を通して、象牙質接着界面が再石灰化することができれば、修復材料の耐久性が向上するという考えに至り、これらの科学的な根拠・技術をもとに再石灰化誘導能を有する接着性モノマーを開発した。

これらの知識・技術の蓄積をもとに、再石灰化能を有するボンディング材を開発することができれば、接着界面に存在する修復物の耐久性を短くする原因である、ナノリーケージを石灰化により封鎖できれば、歯科修復材料の耐久性を向上させることができる。

## 2. 研究の目的

### ー試作ボンディング材の石灰化能の評価ー

再石灰化能を有するボンディング材を開発することを目的として、特許を開発した再石灰化誘導能を有する接着性モノマーを用いたボンディング材、再石灰化誘導活性を有するイオンを徐放するボンディング材を試作し、石灰化能の評価を行う。

### (1) in vitro象牙質再石灰化モデル実験系における石灰化誘導実験

in vitro 象牙質再石灰化モデル実験系において試作ボンディング材の再石灰化能の評価を行う。フッ素徐放性コンポジットレジンからの溶出液を用いた石灰化誘導実験の結果からコントロール (モデル脱灰象牙質) と比較して、インキュベート 24 時間後において、CR 溶出液群は、石灰化誘導量が有意に高い値を示した。試作ボンディング材から溶出するイオンについて、最も再石灰化を誘導するイオンあるいは、イオン濃度の同定を行う。また、再石灰化誘導能を有する接着性モノマーについても象牙質再石灰化に最適な配合量について同様の実験を行うことにより評価する。

### (2) 象牙質接着界面における再石灰化能の評価

実験 1 において評価を行った試作ボンディング材のうち、最も石灰化誘導能を有してイオン徐放性ボンディング材、再石灰化誘導能を有する接着性モノマー含有ボンディング材について象牙質接着界面における再石灰化能の評価をナノインデンテーション法と TEM を用いて行う。

予備実験における脱灰象牙質の値は、報告されている健全象牙質の値より低い値となっている (Van Meerbeek J Dent Res72, 1993). これらの部分を再石灰化することができれば、より高い値を得ることができる。また、同様の試料を用いてTEM観察を行い、形態学的な変化を観察する。

これにより、象牙質再石灰化誘導能を有するボンディング材の開発あるいは製品化を目的とする。

### (3) 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義ー石灰化誘導能を有するボンディング材の開発ー

近年、コンポジットレジンの接着システムにおいて、接着性、簡略化を目的として開発が進められてきた。しかし、まだそれらの、長期における接着性能、耐久性については改善すべき点が多い。象牙質接着システムに再石灰化作用を付与したものが開発できれば、これらの問題点を改善できる。

また、これらの石灰化誘導能の研究においても本講座においてのみ行われており独創的である。象牙質接着界面を評価する際は、ナノレベルの検出が必要である。その機械的物性、形態学観察には、ナノインデンテーション法と TEM の評価が最適であり、未だに再石灰化誘導能を有する材料の接着界面について報告はなく、これらの評価により象牙質再石灰化誘導能を有する材料の開発が可能になると考えている。

これらの研究が進展することにより修復材が長期間口腔内に維持し、機能する事ができれば歯科臨床に大きく貢献し、発展できるものと思われる。これらは、高齢化社会に向けて自分の歯で咀嚼ができ、義歯からの開放、誤嚥の防止など口腔内にとどまらず全身の健康にも貢献できると考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) ボンディング材の象牙質石灰化に対する影響

試作ボンディング材として、再石灰化誘導能を有する接着性モノマーを用いたボンディング材、再石灰化誘導活性を有するイオンを徐放するボンディング材を用いる。ビニルスルフォンを用いてアガロースビーズに卵黄由来のホスビチン (Sigma) を架橋結合することによりホスビチン-アガロースビーズ複合体を作製し、これをモデル脱灰象牙質基質とする。これを 37°Cにてハイドロキシ

アパタイト (HAP) に対する飽和度 7.41, 7.59 および 7.74 を有するカルシウム・リン酸溶液中でインキュベートすることにより, 象牙質基質による再石灰化をシミュレートする系を作製する. さらに, また, 上記のボンディング材硬化物 (円盤状: 直径 25mm, 厚さ 1mm) を蒸留水 (13.9ml) 中に 4 日間浸漬して得られた溶液を 25, 50, 75, 100% 濃度で添加する. 同時にこれらの溶出液の溶出イオンを ICP (ICPS-8000, Shimadzu) で分析する. それぞれの試料により誘導された石灰化物中のカルシウム量を原子吸光分析 (5100, Perkin-Elmer) により経時的に測定する. これにより, 石灰化誘導時間を測定する.

また, インキュベート 24 時間後に得られた試料に関して, 走査型電子顕微鏡 (SSX-550, 島津製作所) (SEM) により石灰化物の形態学的観察を行ない, 微小領域 X 線回折装置 (Rint 2000, 理学電気) により結晶の分析を行う.

#### (2). 象牙質接着界面の超微小硬さの測定

北海道医療大学倫理委員会にて承認され, 本研究の内容を説明し, 同意を得た患者様の矯正治療の理由により抜去したう蝕を有しないヒト小臼歯を本研究に使用する. 抜去歯の歯冠半分を歯軸に対して垂直に切断する. また歯頸部より 3mm のところで歯根を切断する. 象牙質試料表面を 40% リン酸溶液にて 120 秒処理した後, 水洗乾燥を行う. その後, 再石灰化誘導能を有する接着性モノマーを用いたボンディング材, 再石灰化誘導活性を有するイオンを徐放するボンディング材を塗布する. その後, コンポジットレジンを築盛する. 試料を水中で 24 時間浸漬した後, エポキシ樹脂に包埋し, 接着界面に対して垂直に切断, シリコンカーバイドペーパーとダイヤモンドペーストを用いて研磨を行う.

超微小押し込み試験機, ENT-1100 (Elnonix) を用いて, 象牙質・樹脂含浸層・アドヒージブレジンの移行部の硬さ, 相対ヤング率の測定を行う. 測定は, 樹脂含浸層に対して直交するように, 測定温度 28.5°C, 測定間隔 5  $\mu$ m, 負荷荷重 200mgf, ステップインターバル 0.02mgf/ms の条件にて連続して 2 列 20 点行う. 得られた値は, 一元配置分散分析により  $P < 0.05$  にて統計学的に処理し, 有意差が認められた場合にはさらに Scheffé の多重比較検定で検討する.

#### (3) 微小引張り試験の測定

実験 1 で用いた試料を歯軸に対して平行に硬組織薄切器を用いてマイクロテンサイ

ルテスト試料を調製する. 試料を無作為に抽出し, クロスヘッドスピード 1mm/min にて微小引張り接着強さの測定を行う. それぞれの群につき 15 個の試験片を測定し, 引張り接着強さを求める. 微小引張り接着強さの測定によって得られたデータは, two-way ANOVA と Tukey's multiple comparison test により有意水準 5% で統計処理を行う.

#### (4). 長期浸漬における測定

長期の象牙質接着界面の超微小硬さの測定, 微小引張り強さの測定, TEM 観察を行う. これにより, 長期の接着界面の評価を行う.

### 4. 研究成果

#### (1) 象牙質再石灰化に対する影響

本研究では, 象牙質接着界面が再石灰化することができれば, 修復材料の耐久性が向上するという考えをもとに再石灰化誘導能を有する接着性モノマーを開発した. 2 種の新規に開発したカルシウム含有レジンモノマー calcium 4-methacryloxyethyl trimellitate (CMET) および calcium 2-methacryloxyethyl phosphate (CMEP) と既存の接着性モノマーである, 4-methacryloxyethyl trimellitic acid (4-MET) および 4-methacryloxyethyl trimellitate anhydride (4-META) との象牙質石灰化誘導能の比較・検討を in vitro 石灰化誘導実験系を用いて, 陽性コントロールであるモデル脱灰象牙質基質との比較・検討を行った.

その結果, 陽性コントロールである PV 群および CMET 群では, 12 時間後, 24 時間後にカルシウム量の上昇が認められたが, CMEP 群, 陰性コントロールである 4MET 群および 4META 群では認められなかった (図 1). PV 群および CMET 群によって誘導されたカルシウム量に有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ ).

また, PV および CMET による石灰化誘導時間を計算したところ, それぞれ 5.00 時間, 2.01 時間であり, CMET がより迅速に石灰化を誘導した.

ハイドロキシアパタイトに対する過飽和度  $3.85 \times 10^7$  を有する石灰化溶液中において CMET により誘導された石灰化物の SEM 観察を行った. インキュベーション前 (0 時間) には CMET 自体の板状の結晶が確認できるが, インキュベーション 24 時間後においては, インキュベーション前とは明らかに形態, 大きさが異なる板状結晶が確認できた. CMEP においては, インキュベーション前 (0 時間)

と 24 時間後の SEM 像において大きな違いは認められなかった. 4-MET および 4-META がインキュベーション中に石灰化溶液中で溶解し, 24 時間後には 4-MET と 4-META は認められず, さらに石灰化物様の沈着物も全く認められなかった.

PV および CMET により 24 時間後に誘導された石灰化物を X 線回折法により分析したところ, いずれの試料においても石灰化物の回折パターンがヒドロキシアパタイトのパターンと一致した.

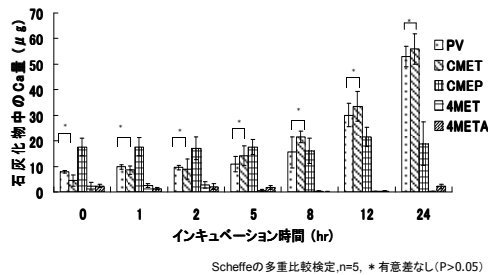


図1 モノマーによる石灰化誘導量

また, 上記と同様の象牙質再石灰化をシミュレートした *in vitro* 実験系を用いてイオン徐放性フィラーから放出される各種イオンの象牙質再石灰化に対する影響について検討を行った. イオン徐放性フィラー含有コンポジットレジンと同量のガラスフィラーを含有するコンポジットレジン (コントロール) の硬化体を作製し蒸留水中に浸漬して得られた溶液を用いて石灰化溶液を作製し, 石灰化誘導実験を行った. 誘導されたミネラル中の Ca 量を比較したところ, 24 時間後, コントロールと比較して有意に高い Ca 量を測定した (図 2). SEM 観察において板状の HAP 結晶が確認され, X 線回折パターンから HAP に特徴的なピークが認められた. これらの結果から, イオン徐放性フィラーにより放出された多量のイオンが, 象牙質接着界面において脱灰象牙質再石灰化に影響を与える可能性が示唆された.

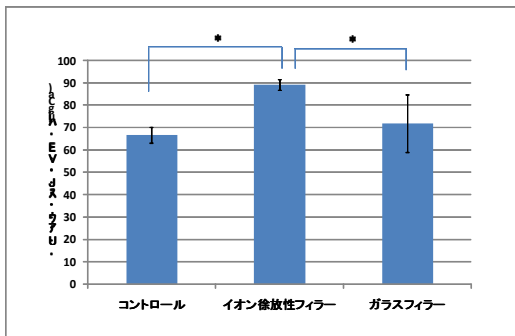


図 2 誘導された石灰化物のカルシウム量

(2). 象牙質接着界面の超微小硬さの測定  
象牙質再石灰化を誘導する材料としてバイオガラス含有材料 Endosequence Root Repair Materials (ERRM, Brasseler USA) と MTA (Pro Root MTA, Dentsply Tulsa Dental) および水酸化カルシウム製剤との比較, 検討を行った. 超微小押し込み硬さ試験による ERRM, MTA, 水酸化カルシウム製剤による人工う蝕再石灰化能の評価の結果を示す (図 3). 水中浸漬 3 か月後において, ERRM, MTA で象牙質再石灰化による硬さと弾性率の向上が認められ, *in vitro* 実験ではあるが, 水酸化カルシウム製剤と比較して再石灰化誘導能力が高いことが明らかになった.

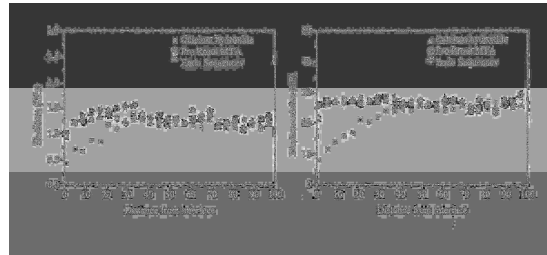


図 3 超微小押し込み硬さ試験による Endosequence, MTA, 水酸化カルシウム製剤による象牙質の硬さおよび弾性率の変化 (横軸 0 が接着界面を示す).

### (3) 微小引張り試験の測定

微小引張り試験において, 新規開発モノマー CMET および CMEP の配合率が 5 % と 10 % の時に, コントロールの 4-META/MMA-TBB レジンと同等の高い接着強さを示した. 配合率が上昇するにしたがって接着強さが有意に低下した.

象牙質接着界面 SEM 観察において, 30 %, 50 % および 70 % CMET 配合レジンの象牙質接着界面には多孔質な欠陥構造が認められ, さらにレジntagの形成が不完全な像が認められた.

### (4). 長期浸漬における測定

ワンステップボンディング材 (HC) に CMET を 5% 配合したシーリングコート材を試作し, 実験に用いた (CMET 群). コントロールとして HC を用いた (HC 群). 試料として大白歯 16 本を用いて, 24 時間後及び 3, 6 ヶ月後の微小引張接着強さの測定を行い, Mann-Whitney 検定で有意水準 5% にて統計処理を行った. また SEM にて, 引張試験後の破断面の観察及び, 24 時間後, 3, 6 ヶ月後の接着界面の観察を行った. 微小引張接着強さの測定において, CMET 群と HC 群の間で 24 時間後, 6 か月後において有意差が認められ, CMET 群が有意に

高い値を示した ( $p < 0.05$ ) (表1)。微小引張試験後の破壊様式は HC 群, CMET 群, 共に混合破壊が最も多く認められたが, HC 群の6か月後においては界面破壊も多く観察された。CMET 群は混合破壊と共に, コンポジットレジンでの凝集破壊も多く認められた。接着界面の観察においては, HC 群では24時間後では良好な接着状態が確認できたが, 3, 6ヶ月後では接着界面に亀裂が多く入っていることが認められた。CMET 群では24時間後, 3, 6ヶ月後共に良好な接着状態が確認された。

MBS(MPa)	24時間後	3か月後	6ヶ月後
HC	30.9±8.7 <sup>b,c</sup>	28.7±7.9 <sup>b,c</sup>	19.8±10.1 <sup>d</sup>
CMET	41.8±4.0 <sup>a</sup>	34.0±7.8 <sup>c</sup>	27.9±7.0 <sup>e</sup>

Mann-Whitney検定( $P > 0.05$ )。同じ右肩英字は有意差がないことを示す。  
(mean±SD, n=15)

表1. 長期水中浸漬における微小引張り試験

近年, 修復材料, 特にコンポジットレジンの接着システムにおいて, 接着性, 簡略化を目的として開発が進められてきた。しかし, まだそれらの, 長期における接着性能, 耐久性については改善すべき点が多い。象牙質接着システムに再石灰化作用を付与したものが開発できれば, これらの問題点を改善できる。

本研究の実験結果を踏まえ上で, さらに高度に再石灰化誘導する材料の開発, 研究が進展することが示唆された。これにより修復材が長期間口腔内に維持し, 機能する事ができれば歯科臨床に大きく貢献し, 発展できると思われる。これらは, 高齢化社会に向けて自分の歯で咀嚼ができ, 義歯からの開放, 誤嚥の防止など口腔内にとどまらず全身の健康にも貢献できると考えている。

## 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 9 件)

①大熊一豊, 伊藤修一, 塚本尚弘, 齋藤隆史: 象牙質再石灰化促進作用を有するモノマーの開発に関する研究; 日歯保存誌 52, 査読有, 330-339, 2009.

②Ito S, Hoshino T, Iijima M, Tsukamoto N, Pashley DH, Saito T: Water

sorption/solubility of self-etching dentin bonding agents; Dent Mater 26, 査読有, 617-626, 2010.

③Ito S, Iijima M, Hashimoto M, Tsukamoto N, Mizoguchi I, Saito T: Effects of surface pre-reacted glass-ionomer fillers on mineral induction by phosphoprotein; J Dent 39, 査読有, 72-79, 2011.

[学会発表] (計 19 件)

①Ito S, Iijima M, Mizoguchi I, Saito T: Effects of S-PRG fillers on remineralization of model-decalcified dentin; PAPF (Wuhan), September, 2009.

②Ito S, Iijima M, Mizoguchi I, Saito T: Effects of fluoride ions released from materials on dentin remineralization; 89th IADR (San Diego), March, 2011.

③Ito S, Motai F, Saito T: Effects of several ions released from surface pre-reacted glass-ionomer fillers on dentin remineralization; 3th International Symposium on Surface and Interface of Biomaterials (Sapporo), July, 2011.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 修一 (ITO SHUICHI)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号: 50382495