

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592924

研究課題名(和文)細胞の電子伝達系をモデルにしたレジンの高耐久接着による歯根象牙質の新規再生

研究課題名(英文) New restoration system of root dentin by durable bonding of resin modeled on electron transport system

研究代表者

平 曜輔 (TAIRA, Yohsuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：40226725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、電子伝達体類を含有するプライマーを試作し、象牙質の接着に対する効果を調べるとともに、その接着メカニズムについて分析することを目的とした。

結論として、特定のクロロフィル誘導体(CLD)と2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)を含有するプライマーが、象牙質と4-META/MMA-TBBレジンの接着強さを改善した。さらに、示差走査熱量計(DSC)分析の結果、CLDには濃度依存性に4-META/MMA-TBBレジンの重合促進効果が認められた。したがって、エッチングされた象牙質に浸透したレジンの重合をCLDが促進していることが高い接着強さに寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate experimental primers containing electron carriers on adhesive bonding to dentin, and to analyze the bonding mechanism.

In conclusion, a primer containing a certain chlorophyll derivative (CLD) with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) improved bond strength between 4-META/MMA-TBB resin and dentin. In addition, differential scanning calorimetry (DSC) analysis revealed that CLD accelerated polymerization of 4-META/MMA-TBB resin depending on its concentration. Accordingly, it was suggested that CLD accelerates polymerization of monomers diffused into the etched dentin, which contribute high bond strength.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：接着

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 支台築造された歯根の破折が原因でやむを得ず抜歯せざるを得ない症例はしばしば経験される。永久歯の抜歯原因調査報告書(8020 推進財団 2005)によれば、破折を原因とする抜歯は全体の 11.4%であり、歯周病とウ蝕に次いで3番目に多いことが明らかにされている。破折した歯根の全てを接着によって元に戻すことができれば理想的だが、たとえ破折した歯根を接着したとしても、破折部位や被着面の汚染の程度によっては、接着耐久性が不十分であるために再び剥離してしまうことも少なくない。したがって、破折した歯根を抜歯しない保存的治療の開発は極めて重要な課題であり、我々は象牙質の接着を駆使してこれを実現したいと考えていた。

(2) 象牙質接着に関して、4-メタクリロキシエチルトリメリット酸無水物(4-META)、メタクリル酸メチル(MMA)、トリブチルボラン(TBB)から成る接着性レジン(4-META/MMA-TBB レジン)は、10%クエン酸と3%塩化第二鉄の水溶液(10-3 液)で表面処理した象牙質との間に樹脂含浸層が形成され、20 MPa 前後の引っ張り接着強さが発揮される(Nakabayashi et al. 1982)。しかし、接着された象牙質試料を1年間水中に浸漬すると、この樹脂含浸層は不明瞭となり、接着強さも半分以下に低下してしまうため、接着耐久性の改善が課題であった(清村 1987)。

(3) 10-3 処理した象牙質と 4-META/MMA-TBB レジンの接着メカニズムは、浸透説と重合説の2つによって説明されている。浸透説によれば、象牙質表層が塩化第二鉄を含まないクエン酸やリン酸によって脱灰されると、露出した象牙質コラーゲン線維の網目様立体構造が乾燥時に収縮し、モノマーが管間象牙質に浸透しにくくなるため、十分な微小機械的維持が得られない。しかし、象牙質表層が10-3 液で脱灰された場合は、たとえ乾燥してもコラーゲン線維に付着した鉄イオンがコラーゲン線維の収縮を抑制するため、レジン成分の浸透阻害が生じないとされている(Nakabayashi et al. 1998)。一方重合説によれば、コラーゲン線維に付着した10-3 液中の鉄イオンが4-META/MMA-TBB レジンの重合を促進し、接着界面付近の重合が比較的早く起こる。その結果、レジンの重合収縮に起因するコントラクションギャップは生じず、接着が改善されると考えられている(Imai et al. 1996)。

(4) 我々の過去の研究では、象牙質をエッチングした後に微量の塩化第二鉄、塩化第一鉄、過塩素酸鉄などをプライマーとして塗布すると、4-META を含有しない MMA-TBB レジンで接着しても 20 MPa 以上の接着強さが得られることが明らかになった(Taira et al. J

Dent Res 1996, Taira et al. J Dent 1998)、ヘム鉄(シトクロムcやマイクロペルオキシダーゼ)をプライマーとした場合は、さらに接着が改善された(Taira et al. J Biomed Mater Res B 2007, Taira et al, Eur J Oral Sci 2009)。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞内に存在する電子伝達系をモデルとして、電子伝達体を象牙質プライマーとして応用し、4-META/MMA-TBBレジンの象牙質に対する接着強さを評価し、接着耐久性の改善を試みることを、さらにその接着メカニズムについて明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 電子伝達体のスクリーニング

象牙質プライマー成分として応用するために、真核細胞やバクテリアや植物細胞由来の電子伝達体、あるいはこれらの分解産物や化学的に修飾された物質のうち、生体安全性が高く、水、HEMA、MMA に対する溶解性が良好で、極端な酸性や塩基性ではなく、しかも入手が比較的容易な物質を探索した。

#### (2) 牛歯象牙質の接着耐久試験

リン酸エッチング液、候補として挙げられた電子伝達体類とHEMAを含有するプライマー、4-META/MMA-TBBレジン接着材から構成される接着システムを試作した。またコントロールとして、電子伝達体類を使用しない接着システムを準備した。これらを用いて牛象牙質と金属製被着体を直径5 mmの被着面で接着した。接着した試験片を37 水中に24時間浸漬した後、万能試験機(オートグラフ)を用いて破断するまで荷重を加え、引っ張り接着強さを求めた。

さらに、接着した牛象牙質試験片を37 水中に24時間浸漬し、4 と60 の水中に各1分間浸漬する水中熱サイクル耐久試験を500回繰り返した後、引っ張り接着強さを求めた。

#### (3) 接着界面の形態学的観察

接着試験後の象牙質側破断面をカラー3Dレーザー顕微鏡を用いて観察した。表面全体にレジンが残存している場合をレジン凝集破壊、表面に全くレジンが残存していない場合を界面剥離、部分的にレジンが残存している場合をレジン凝集破壊と界面剥離の混合破壊と分類した。なお、蛍光抗体法を用いた表面観察の試みは成功できなかった。

#### (4) 重合反応の解析

4-META/MMAモノマーとTBB重合開始剤の混合液30  $\mu$ lをPMMA粉0.03gおよび各種プライマー液15  $\mu$ lと混和した。この混和物を示差走査熱量計(DSC)用のアルミパンに入れ、レジン重合反応による発熱を経時的に測定した。そして混和開始から発熱がピークに達するまでの時間を重合時間として記録した。

(5) 臨床モデルでの接着効果の確認  
ヒト歯根象牙質を用いて、試作接着システムの微小引張り接着強さを複数のコントロールの場合と比較した。切断した歯根をゼラチン中に封埋した状態では、接着操作が非常に困難であったため、大気中で接着することとした。接着完了後に37 °Cの水中に24時間浸漬した後、試験片を断面が0.9 mm×0.9 mmの棒状に切断し、小型卓上試験機 (EZ Test) を用いて引張り試験を行い、微小引張り接着強さを求めた。

#### 4. 研究成果

(1) 電子伝達体のスクリーニング結果  
各種電子伝達体とその分解産物や化学的に修飾された物質を検討した結果、象牙質接着用プライマー成分として、特定のクロロフィル誘導体 (CLD) が最有力候補のひとつと考えられた。また、4-META/MMA-TBB レジンの象牙質接着に関する文献のレビューを行った結果、CLD の象牙質接着への応用は過去に検討された例がないことが確認された。

(2) 牛歯象牙質の接着耐久試験結果  
10%リン酸エッチング液、CLD と 35% HEMA を含有する水溶性プライマー、接着材として4-META/MMA-TBB レジンから構成される接着システムを試作した。牛象牙質と金属製被着体を直径 5 mm の被着面で接着し、24 時間後に引張り接着強さを求めた結果、接着強さは  $1 \times 10^{-7}$  mol/g CLD 含有のプライマーの場合は 6.1 MPa、 $1 \times 10^{-6}$  mol/g CLD 含有のプライマーの場合は 7.3 MPa、CLD を使用しないプライマーの場合は 4.1 MPa であった。

一方、4 と 60 °C の水中に各 1 分間浸漬する水中熱サイクル耐久試験に供した後、引張り接着強さを求めた結果は、 $1 \times 10^{-7}$  mol/g CLD を含有するプライマーの場合は接着強さが 8.8 MPa、 $1 \times 10^{-6}$  mol/g CLD の場合は 9.4 MPa、CLD を含有しないプライマーの場合は 0.04 MPa であった。以上から、CLD には象牙質の初期接着強さだけでなく、接着耐久性改善効果も有していることが示唆された。

(3) 接着界面の形態学的観察結果  
接着から24時間後に引張り接着強さを求めた後、象牙質側破断面を観察した結果は、 $1 \times 10^{-7}$  mol/g CLD含有、 $1 \times 10^{-6}$  mol/g CLD含有、CLD非含有のいずれの場合においても接着界面剥離とレジンの凝集破壊が認められた。

一方、水中熱サイクル耐久試験後に観察された接着破壊様式は、 $1 \times 10^{-7}$  mol/g CLDか  $1 \times 10^{-6}$  mol/g CLDを含有するプライマーの場合には界面剥離およびレジン凝集破壊が認められたが、CLDを含有しないプライマーの場合は全て界面剥離であった。

(4) 重合反応の解析結果  
DSCを用いた4-META/MMA-TBBレジンの重合時

間測定の結果は、 $1 \times 10^{-7}$  mol/g CLD プライマーを添加した場合は6.40分、 $1 \times 10^{-6}$  mol/g CLD プライマー添加の場合は7.17分、CLDを含有しないHEMAプライマーの場合は7.24分であった。

以上の結果から接着メカニズムを考えると、エッチングされた象牙質表層に浸透しやすいことがわかっている HEMA をプライマーとして使用するだけでは高い接着力は得られないこと、象牙質表層にプライマー塗布された CLD が浸透した HEMA や MMA の重合を促進することによってはじめて接着力が改善されることが示唆された。

(5) 臨床モデルでの接着効果の確認結果  
4-META/MMA-TBB レジンで接着したヒト象牙質の微小引張り接着強さは、リン酸エッチング後に  $1 \times 10^{-7}$  mol/g CLD を含有するプライマーを塗布した場合 44.6 MPa、 $1 \times 10^{-6}$  mol/g CLD の場合 33.0 MPa、CLD を含有しない HEMA プライマーの場合 30.9 MPa であった。また市販の接着性レジンセメントシステムを用いた場合は、RelyX Ultimate (3M ESPE) が 33.3 MPa、Panavia F2.0 (Kuraray Noritake Dental) が 22.9 MPa、Multilink Automix (Ivoclar Vivadent) が 15.5 MPa であり、いずれも  $1 \times 10^{-7}$  mol/g CLD を用いた試作接着システムより低い値であった。

(6) 結論として、CLD と HEMA を含有するプライマーには象牙質の接着改善効果があることが明らかになった。さらにその接着メカニズムについては、エッチングされた象牙質表層に浸透したレジンの重合を接着界面に存在する CLD が促進していることが示唆された。

#### < 引用文献 >

- ① Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E, The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates, J Biomed Mater Res, vol.16, 1982, 265-273
- ② 清村正弥、4-META/MMA-TBB 系レジンのウシ象牙質への接着：長期安定性と水の影響、歯科材料器械、6巻、1987、860-872
- ③ Nakabayashi N, Pashley DH, Hybridization of dental hard tissues, Quintessence Publishing Co, 1998
- ④ Imai Y, Kadoma Y, Kojima K, Akimoto T, Ikakura K, Ohta T, Importance of polymerization initiator systems and interfacial initiation of polymerization in adhesive bonding of resin to dentin, J Dent Res, vol.70, 1991, 1088-1091
- ⑤ Taira Y, Matsumura H, Yoshida K, Tanaka T, Atsuta M, Adhesive bonding to dentin with ferrous chloride primers and tri-n-butylborane-initiated luting agents, J Dent Res, vol.75, 1996, 1859-1864

- ⑥ Taira Y, Matsumura H, Yoshida K, Kamada K, Tanaka T, Atsuta M, Metal chloride primers for bonding dentine with tri-n-butylborane-initiated luting agents, J Dent, vol.26, 1998, 603-608
- ⑦ Taira Y, Soeno K, Atsuta M, Microperoxidase primer promotes adhesion of butylborane-polymerized resin to dentin, J Biomed Mater Res B, vol.81, 2007, 111-115
- ⑧ Taira Y, Soeno K, The effect of a peroxidase primer on bond strength of three luting systems to dentin, Eur J Oral Sci, vol.117, 2009, 306-311

## 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)

Taira Y, Imai Y, Review of methyl methacrylate (MMA)/tributylborane (TBB)-initiated resin adhesive to dentin, 査読有, vol.33, 2014, 291-304

[学会発表](計1件)

Taira Y, Abe A, Soeno K, Shinohara A, Yoshida K, Sawase T, Microtensile bond strength between four resin cements and dentin, International Association for Dental Research, Boston(USA) March 11-14, 2015

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

平 曜輔 (TAIRA, Yohsuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号: 4 0 2 2 6 7 2 5

### (2)研究分担者

添野光洋 (SOENO, Kohyoh)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号: 5 0 3 1 5 2 5 6

鎌田幸治 (KAMADA, Kohji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号: 6 0 2 6 4 2 5 6