

〔学位論文〕

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

大熊 一豊

北海道医療大学大学院 歯学研究科

緒 言

近年、保存修復学分野において、ミニマルインターベンション (MI) の概念 (Tyas et al., 2000) の普及とともに接着性修復材料の開発が著しく進展した。従来から、「浸透性」、「接着性」に重点をおいた接着性材料の開発が進んでいたが、最近では、抗菌性モノマーの配合によって接着界面の耐久性向上をめざした接着性修復材料が登場し (Imazato et al., 1997) 材料開発の視点が抗う蝕性をはじめとする「機能性」に移行してきた。

しかし依然、修復物の脱落や二次う蝕等の不快事項が発生している。これまでに、歯面処理後の脱灰象牙質コラーゲンにボンディング材が浸透しないナノスペースが存在し、経時的に露出コラーゲンおよびそれに接するボンディング材の加水分解が起こり、接着界面の崩壊が引き起こされることが報告されている (Sano et al., 1999; Hashimoto et al., 2000; 2003; De Munck et al., 2003; Nishitani et al., 2006)。

そこで、象牙質再石灰化誘導活性を有する接着性モノマーを配合した修復材料を用いてナノスペースを石灰化物で緊密に封鎖することにより、修復材料の耐久性を向上させることができると考え、新規の接着性モノマーを開発するという着想に至った。

本研究では、象牙質再石灰化を目的として新規に開発した接着性モノマーの石灰化誘導能について、モデル脱灰象牙質基質の石灰化能と比較・検討した。また、新規開発接着性モノマーを配合したレジンを試作し、微小引張試験を行うことによって象牙質に対する接着強さの検討を行った。さらに、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた接着界面の観察を行い、新規開発接着性モノマー配合の影響に関して検討を行った。

材料と方法

1. *in vitro* 石灰化誘導実験

受付：平成21年3月30日

接着システムにおいて従来から使用されている接着性モノマーとして4 METおよび4 META, 新規開発接着性モノマーとしてAK-100およびTSM-47を実験に用いた。モデルリントタンパク質として卵黄由来のホスビチン (Sigma Chem. Co.) を用いた。これをジビニルスルフォン (Sigma Chem. Co.) を用いてアガロースビーズ (Sepharose 4 B, GE Healthcare Bio-Science) に架橋結合し (Lihme et al., 1986), ホスビチン-アガロースビーズ複合体 (モデル脱灰象牙質基質, 以下PV) を作製した。これらをHepes-KCl buffer (pH7.40) に加え20% (w/v) 溶液を作製し、さらにハイドロキシアパタイトに対する過飽和度 3.85×10^7 を有するカルシウム-リン酸溶液中 (Plummer et al., 1984) で37°Cにてインキュベートした。それぞれの試料により誘導されたミネラル中のカルシウム量を0, 1, 2, 5, 8, 12, 24時間後に原子吸光分析法 (5100, Perkin-Elmer, U.S.A.) により測定し、接着性モノマーおよびPVによる石灰化誘導時間を計算した (Saito et al., 1997)。SEM (SSX-55, 島津製作所) により誘導された石灰化物の形態学的な観察を行い、さらにX線回折法により結晶学的な分析を行った (Rint2000, 理学電気)。

2. *in vitro* 接着試験

う蝕のないヒト大白歯22歯を用いた。抜去歯の歯冠中央部を歯軸に対して垂直に精密低速切断機 (Isomet, low speed saw, Buehler) を用いて切断し、健全な象牙質を露出させた後、表面を#320の耐水研磨紙を用いて30秒間研削した。4-META/MMA-TBBレジン (スーパーボンドC&B, サンメディカル) のポリマー粉末に新規開発接着性モノマーAK-100およびTSM-47をそれぞれ0 (コントロール), 5, 10, 30, 50, 70%配合したものを象牙質表面に指示書通りに塗布し、 $1 \times 1 \times 1$ cmのアクリル棒を乗せて硬化させ接着試料を調製した。試料を水中で24時間浸漬した後、接着試料を歯軸に対して平行に硬組織薄切器を用いて厚さ約1 mmに切断し、接着面

積が1mm³になるように試料をスティック状に切断した。その後、シアノアクリレート接着材（モデルリペアーII，デンツプライ三金）を用いてデバイスに接着し、万能試験機（EZ test，島津製作所）を用いて、クロスヘッドスピード1mm/minにて微小引張接着強さの測定を行った。それぞれの群につき15個の試験片を測定し、引張接着強さを求めた。得られたデータはtwo-way ANOVAとTukeyの多重比較検定により有意水準5%で統計処理を行った。さらに、同様に接着させた試料を精密低速切断機で接着界面に対して垂直に切断し、アルミナバフ研磨して6N塩酸処理、1%次亜塩素酸ナトリウム処理を行い、イオンコーターで金蒸着後に接着界面のSEM観察を行った。

結果および考察

1. *in vitro*石灰化誘導実験

PV群およびAK-100群では24時間後にカルシウム量の上昇が認められたが、TSM-47群、4MET群、4META群では認められなかった。PV群およびAK-100群による石灰化誘導時間を計算したところ、それぞれ5.00時間および2.01時間であり、AK-100がより迅速に石灰化を誘導した。SEM観察において、PV群およびAK-100群では24時間後に板状の結晶が確認されたが、TSM-47、4MET、4METAでは観察されなかった。また、PVとAK-100により24時間後に誘導された石灰化物のX線回折パターンから、石灰化物はハイドロキシアパタイトであると同定された。

これらのことから、象牙質再石灰化においてAK-100が強力な誘導因子となり得ることが示唆された。

2. *in vitro*接着試験

AK-100群における接着強さは、配合率0%、5%および10%でそれぞれ28.3、25.6および27.3MPaであり有意差は認められなかった（ $P>0.05$ ）。またこれらは配合率30%、50%および70%と比較して有意に高い値を示した（ $P<0.05$ ）。同様に、TSM-47群における接着強さも、配合率0%、5%および10%でそれぞれ28.3、27.5および27.3MPaであり有意差は認められなかった（ $P<0.05$ ）。またこれらは配合率50%、70%と比較して有意に高い値を示した（ $P>0.05$ ）。さらに、AK-100群とTSM-47群の間では、同じ配合率間で有意差は認められなかった（ $P>0.05$ ）。

SEM観察では、5%および10%AK-100配合レジンの象牙質接着界面はコントロールと同様に良好な接着状態が観察できた。しかし30、50および70%AK-100配合レ

ジンの象牙質接着界面は、コントロールおよび5、10%AK-100配合レジンの接着界面と比較して短いレジクタグが観察された。特に70%AK-100配合レジンにおいては、象牙質への浸透が不十分で、レジクタグが崩壊しており、レジクタグが長さ2 μ m程度しか観察されなかった。さらに接着界面において多孔質な欠陥構造が認められた。

結 論

象牙質再石灰化を目的として新規に開発したレジンモノマーの*in vitro*石灰化誘導能について、モデル脱灰象牙質基質の石灰化能と比較・検討した。また、新規開発モノマーを配合した4-META/MMA-TBBレジンを試作し、微小引張試験によって象牙質に対する接着強さの検討を行った。さらに、SEMを用いた接着界面の観察を行い、新規開発モノマー配合の影響に関して検討を行った。

以上の実験から、次の結論が得られた。

- 1) *in vitro*石灰化誘導実験系において、新規開発モノマーAK-100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。
- 2) 微小引張試験において、新規開発モノマーAK-100およびTSM-47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。
- 3) 象牙質接着界面SEM観察において、30%、50%および70%AK-100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、さらにレジクタグの形成が不完全な像が認められた。
- 4) これらの結果から、新規開発接着性モノマーAK-100が象牙質接着界面においてAK-100が脱灰象牙質の再石灰化を促進する可能性が示唆され、AK-100配合4-META/MMA-TBBレジンのAK-100至適濃度は10%であることが示唆された。

参 考 文 献

- De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts Vanherle G: Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. J Dent Res 82: 136-140, 2003.
- Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H: In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. J Dent Res 79: 1385-1391, 2000.

- Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H : In vitro degradation of resin–dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials* 24 : 795–803, 2003.
- Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Torii M, Russell RRB, McCabe JF : Incorporation of antibacterial monomer MDPB into dentin primer. *J Dent Res* 76 : 768–772, 1997.
- Lihme A, Schafer–Nielsen C, Larsen KP, Muller KG, Bog–Hansen TC : Divinylsulfone–activated agarose. Formation of stable and non–leaking affinity matrices by immobilization of immunoglobulins and other proteins. *J Chromatogr* 376 : 299–305, 1986.
- Nishitani Y, Yoshiyama M, Donnelly AM, Agee KA, Sword J, Tay FR, Pashley DH : Effects of Resin Hydrophilicity on dentin bond strength. *J Dent Res* 85 : 1016–1021, 2006.
- Plummer LN, Jones BF, Truesdale AH : WATEQF–A fortran IV version of WATEQ, A computer program for calculating chemical equilibrium of natural waters. U.S. Geological Survey, Reston, 1984.
- Saito T, Arsenault AL, Yamauchi M, Kuboki Y, Crenshaw MA : Mineral induction by immobilized phosphoproteins. *Bone* 21 : 305–311, 1997.
- Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Moriguchi M, Tagami J et al. : Long–term durability of dentin bonds made with a self–etching primer in vivo. *J Dent Res* 78 : 906–911, 1999.
- Tyas M, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ : Minimal intervention dentistry–a review. *Int Dent J* 50 : 1–12, 2000.