原 著 論 文

象牙質内タンパク質の変性が接着に及ぼす影響

—樹脂含浸層モデルの強度について—

伊藤 博子 根津 尚史 福田 匡輔 永留 初実 寺田 善博

Effects of Denaturation of Dentinal Proteins on Adhesion

—Strength of Resin-Impregnated Layer Model—

Hiroko Ito, Takashi Nezu, Kyouzuke Fukuda,
Hatsumi Nagadome and Yoshihiro Terada

Abstract : The purpose of this study was to examine the effect of heat denaturation of dentinal protein on adhesive strength. In this study, a model system for resin-impregnated layers (RILs) was proposed, and compression test was tried in order to clarify the relationship between RIL and adhesion strengths. Bovine incisors were heated in 93+1°C water for 1 hr to denature the dentinal protein uniformly (heat-treated). Superbond (SB) and Panavia 21 (PA) were used as the resin adhesives. Heat-treated and untreated dentins were powdered respectively, decalcified by hydrochloric acid, washed with distilled water, and dried. Dentin powder thus prepared and resin adhesive were mixed, then specimens of 3 mm in diameter and 4 mm in height were fabricated in Teflon molds. They were allowed to set at room temperature for 24 hrs. Compression tests were performed on ten specimens for each group. The compressive strength and elastic modulus were subjected to the Student's t-test to determine the statistical significance of any difference. Compressive strength of the heat-treated group was significantly weaker than that of the untreated group (SB : $p < 0.01$, PA : $p < 0.001$). The elastic modulus of the heat-treated group was significantly smaller than that of the untreated group (SB : $p < 0.001$, PA : $p < 0.01$).

Key words : adhesion, resin-impregnated layers, protein denaturation

I. 緒 言

近年歯科領域において接着剤による象牙質とレジンとの接着性の向上が著しい。象牙質には2割程度の有機質が含まれ¹⁾, その大部分がタンパク質である。このタンパク質とレジンとの相互作用が象牙質への接着の重要な鍵となると考えられ²⁾, 接着とタンパク質の構造との関連の解明が待たれる。

従来は接着システムの種類による接着力の差³⁾, エッチ

ング, プライマー処理の違いの影響^{4~7)}, 接着剤そのものの劣化⁸⁾などレジン側からの検討や, 樹脂含浸層のSEMやTEMによる観察^{4,9,10)}などに関心が向けられ, 歯質側のタンパク質の変化を科学的に検証し, 接着性への影響について考慮した研究は少ない¹¹⁾。

われわれは象牙質内タンパク質の変性が接着に及ぼす影響を知ることが目的として研究を行っているが, 前報¹²⁾にて象牙質内タンパク質の熱変性が引張接着強さに影響を及ぼすことを示した。またNMR, DTA, SEMによる分析の結果, これは樹脂含浸層の強度による可能性が大きいことを報告した。

そこで今回は, 樹脂含浸層の強度にタンパク質の変性が及ぼす影響について検討した。すなわち, 牛歯象牙質のタンパク質を熱変性させ, 接着性レジンセメントにその粉末

九州大学歯学部歯科補綴学第一講座 (主任: 寺田善博教授)
Department of Prosthetic Dentistry I, Faculty of Dentistry,
Kyushu University (Chief: Prof. Yoshihiro Terada)
平成9年4月24日受付

を混入した試料を試作し、樹脂含浸層モデルとした。この試料について圧縮試験を行い、圧縮強さと弾性係数を算出して検討を行った。さらにタンパク質の中でも特に割合が高く、構造上きわめて重要なコラーゲンに注目して考察を加えた。

II. 研究方法

抜歯後ただちに冷凍保存した牛下顎切歯を使用した。使用直前に室温にて解冻後、3本を92~94℃の水の中に1時間煮沸、放冷し（加熱処理群）、他の3本をコントロール（未処理群）とした。歯根切断後冠部歯髄を除去し、エナメル質を削除して冠部象牙質のみを採取した。ダイヤモンドポイントを用いて、注水下エアタービンにて象牙質を切削し粉末とした。さらにこれを通常の接着操作のエッチングを想定して0.1N塩酸にて部分的に脱灰、乾燥させた。得られた象牙質粉末を、スーパーボンド（サンメディカル社製）（以下SBと略す）、パナビア21（クラレ社製）（以下PAと略す）にそれぞれ混入させ、テフロンモールドを用いて直径3mm、高さ4mmの試料を各10個作製した。象牙質粉末の混合比は予備実験にて操作性の良いものを選択した。すなわちSBでは象牙質粉末をSB粉末の60wt%を混入し、PAでは全重量の5wt%を混入した。なお、SBではこの混合物に適量のモノマーとキャタリストを加え硬化させた。硬化後、SBは2時間室温放置、PAはオキシガード（クラレ社製）を塗布し24時間室温放置した。圧縮試験はオートグラフIS5000（島津製作所製）を用いてクロスヘッドスピード5mm/minで行った。SB、PAそれぞれについて未処理群、加熱処理群の圧縮強さの平均、標準偏差を算出し、Student t-testを行い比較した。また、圧縮試験時に得られた破壊曲線の最大傾斜を測定し、弾性係数を算出してStudent t-testを行い比較した。

III. 結果

SBでは未処理群の圧縮強さは 29.4 ± 2.6 MPa、加熱処理群の圧縮強さは 26.0 ± 1.8 MPaで、加熱処理群は未処理群に対して有意水準1%で圧縮強さが小さかった（図1）。弾性係数は、未処理群が 737 ± 69 MPa、加熱処理群が 618 ± 56 MPaで、加熱処理群は未処理群に対して有意水準0.1%で弾性係数が小さかった（図2）。

PAでは未処理群の圧縮強さは 171 ± 16 MPa、加熱処理群の圧縮強さは 123 ± 9 MPaで、加熱処理群は、未処理群に対して有意水準0.1%で圧縮強さが小さかった（図3）。弾性係数は、未処理群が $1,850 \pm 370$ MPa、加熱処理群が $1,380 \pm 340$ MPaで、加熱処理群は未処理群に対して有意水準1%で弾性係数が小さかった（図4）。

図1 Mean and standard deviation of compressive strength resin-impregnated layer model of SB
スーパーボンドによる樹脂含浸層モデルの圧縮強さ

図2 Mean and standard deviation of elastic modulus resin-impregnated layer model of SB
スーパーボンドによる樹脂含浸層モデルの弾性係数

図3 Mean and standard deviation of compressive strength resin-impregnated layer model of PA
パナビア21による樹脂含浸層モデルの圧縮強さ

図 4 Mean and standard deviation of elastic modulus resin-impregnated layer model of PA
パナビア 21 による樹脂含浸層モデルの弾性係数

IV. 考 察

象牙質に対する接着に関しては、エッチングやプライマー処理等の接着前処理が改良されるとともに接着力が向上してきた^{13,14)}。一般に接着前処理の目的の1つは、接着モノマーを象牙細管やコラーゲン線維の間に浸透しやすくし、樹脂含浸層を作る下地を形成することであると考えられる。象牙質内のコラーゲン線維は脱灰により表面に露出するが、気銃などによる乾燥により網目構造が収縮してモノマーの浸入が妨げられるという考えが通説である^{4,8)}。このため、現在 HEMA などコラーゲン線維の収縮を回復させる方法が用いられている^{4,8)}。

さて、象牙質を含む歯の接着修復を行うにあたって、齶蝕や処理剤等の化学物質、形成時の発熱などにより象牙質内タンパク質の変性をきたしていることを想定すべきであるが、臨床現場では変性の有無を確認する手段がなく、このような条件下でも接着技法を用いなければならない場合が多い。臨床上前予測したよりも象牙質への接着力が得られない場合があり、この原因の1つとして、接着した時点での象牙質内タンパク質の変性が十分に考えられる。しかしながら、象牙質内タンパク質の変性が接着に及ぼす影響に関して詳細な検討を加えた報告は少ない。

本研究の目的は、タンパク質の変性方法の1つとして熱変性を用いて、象牙質内タンパク質の変性とレジンとの接着強さの関連性を調べることである。われわれの以前の研究¹²⁾では、熱変性により引張接着強さに差がみられたものの、樹脂含浸層の厚さに差がみられなかった。また、Prati ら¹⁵⁾は、樹脂含浸層の厚さと引張強さには相関はないと述べている。このような背景から、熱による象牙質内タンパク質の変性が樹脂含浸層自体の強度に影響し、ひいては接着力が変化するものと考えた。そこで本研究では、

熱の影響を想定した歯質の樹脂含浸層モデルを試作して、圧縮試験と弾性係数を測定することにより、樹脂含浸層の強度について考察を加えた。今回、特に象牙質内タンパク質のなかでも最も多量に含まれ象牙質の構造上きわめて重要であるコラーゲンについて考察を行った。

1. 象牙質内タンパク質の変性方法

一般にタンパク質の変性には、物理的、化学的原因があるが、実際象牙質内タンパク質が変性する原因としては、切削時の摩擦熱、前処理剤に含まれる酸や化学物質などが考えられる。本実験では、このなかで熱による変性方法を用いた。これは熱変性は方法が簡便である上、実際に象牙質に含まれるタンパク質すべてを一様に変性させることが可能であり、実際に臨床で、不用意な注水下での切削等によって現実起こりうるものと考えられたためである。Nishiyama ら¹¹⁾は市販のコラーゲンのモデル化合物を用いて、温度を 25, 40, 60°C に変化させ NMR で測定しているが、高温では三重らせん構造から伸縮性のランダムコイル構造に構造変化が起こると述べている。われわれは加熱が実際の象牙質内コラーゲン (I 型) に及ぼす影響を知るため、NMR, DTA を用いて I 型コラーゲンおよび本実験と同様に得られた象牙質粉末との比較を行ったが、本実験で用いた方法で象牙質内タンパク質は変性していることが確認された¹²⁾。

このほか起こりうるコラーゲンの変化として、齶蝕や歯科用の化学物質に伴うものが考えられる。Ehudin ら¹⁶⁾は人工的に齶蝕にさらされた象牙質について、数種類のボンディングシステムについて引張試験を行っているが、引張強さの差が生じる原因の1つは、接着前処理剤によるコラーゲンネットワークの崩壊の程度によると考察している。また Nakajima ら¹⁷⁾は、実際口腔内で齶蝕になったヒト第三大臼歯では、接着システムによらず引張接着強さが小さいと報告している。今後変性の原因別によるコラーゲンの構造変化を確認することにより、加熱によるものと対応関係が明らかになるものと考えられる。

2. 樹脂含浸層モデルについて

前報¹²⁾では熱変性により引張接着強さに差がみられたものの、樹脂含浸層の厚みに差がみられなかったことを報告した。さらに NMR の結果、タンパク質の変性によりコラーゲンとレジンの化学結合が変化することが示唆された。われわれはこれらの結果をふまえ、タンパク質の変性状態と樹脂含浸層の強度の関係をj知することを目的としてモデルを考案した。

Van Meerbeek ら¹⁸⁾は、TEM 観察により樹脂含浸層はレジン側から象牙質側にかけて段階的に脱灰されていると報告していることから、本実験では象牙質を粉末にし、部分的に脱灰してコラーゲンを表層に露出させた粉末にし、

接着性レジンと混和することにより樹脂含浸層をモデル化した。

Van Meerbeek ら¹⁹⁾は、数種類の接着システムについて樹脂含浸層の微小硬さを直接測定して報告している。しかし特殊な装置が必要であること、また樹脂含浸層が段階的に脱灰され均一な構造でないため、層のどの部分の硬度であるか不明であることから、本法のようにモデル化するほうが樹脂含浸層全体の強度を比較しやすいものと考えられる。

一方、樹脂含浸層はポリマーでなくモノマーが象牙質に浸透して硬化したものである。したがってこのモデルについて得られた強度は樹脂含浸層の強度の相対的な指標となると考えられる。また、本研究では象牙質粉末の混合比を予備実験により操作性の良いものとしたが、実験を継続するにあたっては樹脂含浸層の構造をより詳細に分析して、モデルを実際の樹脂含浸層の構造により則したものになければならないと考えられる。なお、PA では樹脂含浸層を形成するのは主に ED プライマー中のレジン成分 (HEMA 等) であるが、今回試料作成の都合上プライマーを使用しなかった。

3. 樹脂含浸層の強度と弾性係数について

Van Meerbeek ら¹⁹⁾は、樹脂含浸層の微小硬さを健全ヒト象牙質について数種類のレジンで直接測定し、148 から 196 MPa であったと報告している。また同報告で、弾性係数は 8.16 から 9.69 GPa であったと報告しており、本実験の弾性係数より大きい値を示した。これは使用したレジンスystemが異なること、今回使用した象牙質が牛歯由来であること、モデルの象牙質粉末の適正な混合比が十分検討されていないことなどによるものと考えられる。

Nakajima ら¹⁷⁾は、齲蝕の影響を受けた象牙質に数種類のボンディングシステムを用いて引張試験を行い、樹脂含浸層の質は必ずしも有意に引張強さには影響しないと述べている。齲蝕の影響を受けた象牙質では、細菌の代謝物などにより、ある程度のコラーゲンの変性が起こっているものと考えられるが、今回の実験のように加熱によるコラーゲンの変性は、齲蝕の影響を受けたものより変性の程度が大きい、または別な変化をしているものと考えられる。加熱、非加熱の象牙質を破砕して内部を SEM 観察したが、コラーゲン線維の形態には大きな変化はみられなかった。一方、前報¹²⁾で NMR の結果から加熱、非加熱コラーゲンでモノマーの化学結合に差がみられることを報告した。I 型コラーゲンは三重らせん構造を保つ水素結合以外に、3 本鎖間で化学結合を持つので容易にほどけないものと考えられるが、加熱に伴う線維間架橋によりコラーゲン線維表面の官能基や電荷など表面性状が変化するものと推察される。その結果、線維間へのレジンの浸透性の変化よりも、接着モノマーの化学的結合の変化により接着力が

低下したと考えられる。今後は、変性の程度を変えた実験や、NMR 等による化学結合のより詳細な解析の必要がある。

本研究の結果から、SB、PA ともにタンパク質の変性により樹脂含浸層モデルの強度、および弾性係数が明らかに低下した。樹脂含浸層の構造はレジンの種類によって多様であるとは考えられるが、本研究の結果、今回使用した接着剤の種類にかかわらず、タンパク質の変性は接着強さに影響を及ぼしていることが示された。

V. 結 論

1. SB では、加熱処理群は、未処理群に対して有意水準 1% で圧縮強さが小さかった。また加熱処理群は未処理群に対して有意水準 0.1% で弾性係数が小さかった。

2. PA では、加熱処理群は、未処理群に対して有意水準 0.1% で圧縮強さが小さかった。また、加熱処理群は、未処理群に対して有意水準 1% で弾性係数が小さかった。

以上の樹脂含浸層モデルの強度についての考察より、接着性レジンセメントの基本的性質の違いをこえて、象牙質内タンパク質の変性に伴うタンパク質の構造変化が樹脂含浸層モデルの強度、ひいては接着に影響を及ぼしていることが示唆された。

本論文の要旨は、第 95 回日本補綴歯科学会学術大会 (平成 8 年 5 月 31 日、広島) にて発表した。

文 献

- 1) Provenza DV. Fundamentals of Oral Histology and Embryology 132, Philadelphia/Toronto: J.B. Lippincott Company, 1972.
- 2) Asussen E, Uno S. Adhesion of restorative resins to dentin—Chemical and physicochemical aspects—. Oper Dent Suppl 5: 68-74, 1992.
- 3) Sano H, Takatsu T, Ciucchi B et al. Tensile properties of resin-infiltrated demineralized human dentin. J Dent Res 74: 1093-1102, 1995.
- 4) 杉崎順平. コンポジットレジンの象牙質接着性に及ぼす各種プライマーの硬化に関する研究—特に樹脂含浸層の SEM および TEM 観察とプライマーの接着向上効果について—. 日歯保誌 34: 228-265, 1991.
- 5) Nakabayashi N, Takarada K. Effect of HEMA on bonding to dentin. Dent Mater J 8: 125-130, 1992.
- 6) 鈴木一臣, 中井宏之. 歯質と修復レジンの接着—HEMA 水溶液による酸処理象牙質の被着面処理について—. 歯材器 12: 34-44, 1993.
- 7) 水野良司, 鈴木一臣, 近藤康弘ほか. 象牙質とレジンの接着 (第 2 報) HEMA 水溶液による被着面の形態変化および接着性について. 歯材器 13: 475-482, 1994.

- 8) 水野良司, 鈴木一臣, 近藤康弘ほか. 象牙質とレジンの接着—HEMA 水溶液処理による被着面の形態変化および接着耐久性について—. 歯材器 12 : 637-647, 1993.
- 9) Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M et al. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. J Dent Res 71 : 1530-1540, 1992.
- 10) Walshaw PR, Mc Comb D. SEM Evaluation of the resin-dentin interface with proprietary bonding agents in human subjects. J Dent Res 73 : 1079-1087, 1994.
- 11) Nishiyama N, Asakura T, Suzuki K et al. Effects of a structural change in collagen upon binding to conditioned dentin studied by ^{13}C NMR. J Biomed Mater Res 29 : 107-111, 1995.
- 12) 伊藤博子, 根津尚史, 永留初実ほか. 象牙質内タンパク質の変性が接着に及ぼす影響. 補綴誌 39・93 回特別号 : 106, 1995.
- 13) Bowen RL, Cobb EN, Rapson JE. Adhesive bonding of various materials to hard tooth tissues : Improvement in bond strength to dentin. J Dent Res 61 : 1070-1076, 1982.
- 14) Munksgaard EC, Amussen E. Bond strength between dentin and restorative resins mediated by mixtures of HEMA and glutaraldehyde. J Dent Res 63 : 1087-1089, 1984.
- 15) Prati C, Ferrieri P, Galloni C et al. Dentine permeability and bond quality as affected by new bonding systems. J Dent 23 : 217-226, 1994.
- 16) Ehudin DZ, Thompson VP. Tensile bond strength of dental adhesives bonded to simulated caries-exposed dentin. J Prosthet Dent 71 : 165-173, 1994.
- 17) Nakajima M, Sano H, Burrow MF et al. Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesives. J Dent Res 74 : 1679-1688, 1995.
- 18) Van Meerbeek B, Dhem A, Goret-Nicaise M et al. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. J Dent Res 72 : 495-501, 1993.
- 19) Van Meerbeek B, Willems G, Celis JP et al. Assessment by nano-indentation of the hardness and elasticity of the resin-dentin bonding area. J Dent Res 72 : 1434-1442, 1993.