



う蝕治療に使用される歯質接着材の 電子顕微鏡観察

Electron Microscope Observation of Dental Adhesive for Caries Treatment

長岡 紀幸^a, 吉原久美子^b, 吉田 靖弘^c

Noriyuki Nagaoka, Kumiko Yoshihara and Yasuhiro Yoshida

^a岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

先端領域研究センター

^b岡山大学病院 新医療研究開発センター

^c北海道大学大学院歯学研究院 生体材料工学教室

要旨 う蝕治療は、患部を除去し窩洞部に詰め物が充填される。近年、コンポジットレジンによる審美性に優れた修復が多くなっている。一般的なコンポジットレジンには歯に接着する性質がなく、歯質接着材が必要である。我々は、歯質接着材に含まれる接着性モノマーに着目してきた。歯の主成分であるハイドロキシアパタイト (HAp) と接着性モノマーとの反応を、XRD, 固体 NMR で測定し、接着界面を透過電子顕微鏡観察した。

キーワード：う蝕, 歯質接着材, セルフエッチング, リン酸モノマー, コンポジットレジン

1. はじめに

う蝕 (むし歯) は歯周病 (歯槽膿漏) と並び、歯科の 2 大疾患とされる。う蝕治療は、病巣部を除去した窩洞部に詰め物を充填する。詰め物は、固体材料である金属材料, セラミクス, およびコンポジットレジン (ガラスやセラミクスフィラーとメチルメタクリレートモノマーとの複合材料, 充填後に光重合により硬化させる) やガラスイオノマーセメント (フルオロアルミノシリケートガラスとポリカルボン酸水溶液の混和により硬化) などの材料が用いられる¹⁾。ガラスイオノマーセメントは歯と接着する性質を有しているが²⁾, 他の材料は歯質と接着する性質を有していない (最近のコンポジットレジンの一部には、歯質に接着する性質を付与したものがあるが、接着強度が弱い)。そこで、固体材料を歯質に接着する際には合着セメント, コンポジットレジンで充填する際には歯質接着材を用いて、歯質に固定する。

歯の歯冠部は、外側にエナメル質, 内側に象牙質がある。エナメル質は約 95wt% がハイドロキシアパタイト (HAp) で、5wt% がタンパク質等の有機成分や水分である。象牙質は約 70wt% が HAp, 20wt% がコラーゲン線維を主成分とした有機成分, 10wt% が水分であり、コラーゲン線維を囲むように HAp が存在している¹⁾。歯質接着材は、これらの異なる部分に強固な接着が求められる。エナメル質との接着部は詰め物の辺縁にあたるため、漏洩のない接着が求められる。象牙質との接着部は、多くのう蝕治療において接着面積が広い。このため、十分な接着強度を得ることが特に重要とされる³⁾。

歯質接着システムは大別すると、エッチ&リンスシステムとセルフエッチングシステムの 2 種類の方法がある^{4,5)}。

エッチ&リンスシステムは窩洞形成した研削面に強酸溶液 (一般的に 35 ~ 45% の正リン酸水溶液) を塗布し、数秒間放置後に水洗する。これにより歯質の HAp が脱灰される。エナメル質ではエナメル小柱のエッチングレートの差による微細凹凸構造が現れる。象牙質ではコラーゲン線維が露出される。ここに、メタクリレートモノマー, 溶媒, 光重合触媒, 安定化材からなるプライマーを塗布することで、エナメルの微細凹凸構造内、象牙質のコラーゲン線維の隙間にメタクリレートモノマーを浸透させる。エアブローにより、溶媒を揮発させた後、ジメタクリレートモノマー, 光重合触媒, 安定化材からなるボンディング材を塗布する。照射により、メタクリレートモノマーを重合させることで、ボンディング層を形成する。ボンディング層表面には、酸素による重合阻害層があり、この上にコンポジットレジンで充填し、光重合することで、コンポジットレジンで歯質に固定できる。この接着システムで重要なポイントは、象牙質表面に露出したコラーゲン線維の間に、隙間無くメタクリレートモノマーを浸透させ、重合硬化させることである。このため、プライマーにはコラーゲン線維の間に浸透しやすい性質が必要であり、hydroxyethyl methacrylate (HEMA) や glycerophosphate dimethacrylate (GPDM) などの親水性基を持つメタクリレートモノマーが添加されている。近年、プライマーとボンディング材を 1 本にまとめた製品が開発されているが、コラーゲン線維の隅々までモノマーの浸透がされにくい。このため、メタクリレート樹脂に覆われないコラーゲン線維が残存し、脆弱部となり耐久性が劣る^{6~8)}。

セルフエッチングシステムは、酸による歯質のエッチングとプライミングを同時に行い、エッチング後の水洗を不要とした接着システムである。このため、窩洞形成した研削面に直接プライマーを塗布する。プライマーは、リン酸基やカルボキシル基が導入された接着性メタクリレートモノマー (機能性モノマー, 酸性モノマーとも呼ばれる), 水やエタノール, アセトンなどの溶媒, メタクリレートモノマー, 光重合触媒, 安定化材から構成されている。歯質にプライマーを塗布すると、接着性モノマーが HAp を脱灰しながら、できた隙間にメタクリレートモノマーが浸透していく。エアブローにより、溶媒を揮発させた後、ジメタクリレートモノマー, 光重合触

〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1

TEL: 086-223-7151

E-mail: nagaoka@okayama-u.ac.jp

2017年4月18日受付, 2017年5月2日受理

媒、安定化材からなるボンディング材を塗布する。光照射により、メタクリレートモノマーを重合させることで、ボンディング層を形成する。ここにコンポジットレジンを充填する。セルフエッチングシステムでも、プライマーとボンディング材を1本にまとめた製品が開発され、主流となっている。セルフエッチングシステムは、脱灰によりできた隙間が緻密にメタクリレート樹脂で満たされるため、脆弱部ができにくく、特に最近の製品は接着強度の劣化が少ない⁹⁾。

歯質接着システムは、エナメル質エッチングによりできる微細凹凸構造中や、象牙質のエッチングによりできるコラーゲン線維の隙間にメタクリレートモノマーが浸透し、硬化することによる機械的勘合が接着力に大きく影響する。さらに、HApと接着性モノマーのリン酸基、カルボキシル基との化学結合が接着に寄与している¹⁰⁾。本稿では、セルフエッチングシステムの接着システムに着目し、接着性モノマーとHApとの反応、接着界面の観察について報告する。

2. 接着性モノマーと接着メカニズム

接着性モノマーは、酸としてエッチングによる脱灰効果を示し、他の架橋モノマーを浸透させる役割の他、HApと化学結合する。さらに、メタクリロイル基を有することから、架橋モノマーと重合して硬化する。このため、歯質接着材の性質、性能を決める重要な成分である。よく用いられる接着性モノマーは、図1に示すように、リン酸エステルモノマーであるMDP (methacryloyloxi-decyl-dihydrogen-phosphate)、トリメリット酸エステルモノマーである4MET (methacryloxy-ethyl-trimellitic acid) がある。中でもMDPは、クリアフィルメガボンド、クリアフィル トライエスボンド (共にクラレノリタケデンタル)、スコッチボンド ユニバーサル (3M)、アドヒース ユニバーサル (Ivoclar Vivadent) など、現在よく用いられる歯質接着材に添加され、高い接着強度と耐久性を兼ね備えている。歯質接着材中のMDPは、水/エタノール溶媒中で強酸性を示し、HApを脱灰する。HApとMDPとの反応は非常に複雑である^{11,12)}。最終的に観察可能な生成物として、MDPとカルシウムの反応生成物であり、自己組織化したMDP-Ca塩、およびリン酸水素カルシウム2水和物

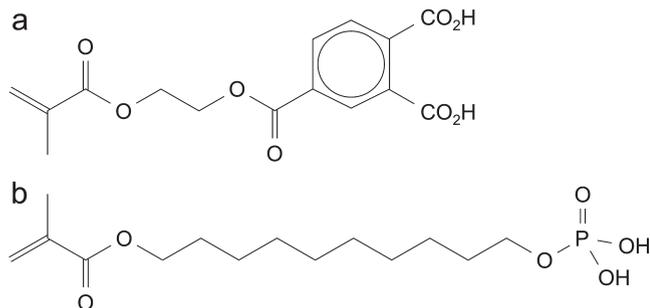


図1 接着性モノマーの構造 (a) 4MET (methacryloxy-ethyl-trimellitic acid), (b) MDP (methacryloyloxi-decyl-dihydrogen-phosphate)

(DCPD; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) がある。MDP-Ca塩は、MDPのリン酸イオンとカルシウムイオンが結合し、さらにMDPのアルキレン基とメタクリロイルオキシ基同士が疎水性相互作用により会合することで、自己組織化したものであり、水およびエタノールに対して難溶である¹³⁾。MDP-Ca塩およびDCPDは、各生成物の溶解度、化学反応の平衡により析出する。

図2は、ヒト象牙質に15wt%MDP溶液 (MDP; クラレノリタケデンタル, 溶媒: 水40wt%, エタノール45wt%) を塗布したときのX線回折図形 (薄膜法) である。d = 3.94 nmの位置に、MDP-Ca塩の構造に起因するピークが観察された^{11,12)}。市販のMDPを含有する歯質接着材には、水溶性メタクリレートモノマーであるHEMAが添加されることが多い。これは、MDPによる歯質のエッチング後に、メタクリレートモノマーの浸透をよくするため、また歯質接着材の相分離を抑制するために添加される。HEMAを添加すると、HEMAの水酸基がHAp表面に水素結合すること、またMDP-Ca塩の自己組織化の際に成長阻害すると考えられ、MDP-Ca塩の生成が抑制されることが指摘されている¹⁴⁾。しかしながら、MDPの他、HEMAやジメタクリレートモノマーなど、様々な添加剤を含有する市販の歯質接着材であるクリアフィル メガボンド プライマーおよびクリアフィル トライエスボンド ND クイックを塗布したときのX線回折図形には、MDP-Ca塩の構造に起因するピークが観察された。市販の歯質接着材とHApとの反応においても、MDP-Ca塩

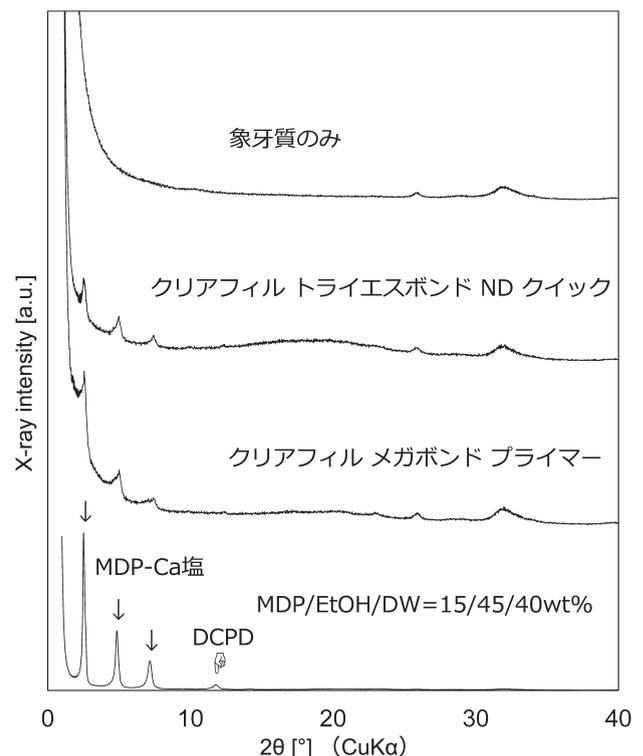


図2 MDPを含む溶液および市販の歯質接着材を象牙質 (#600のSiC耐水紙で研磨して健全象牙質を露出) に塗布したときの薄膜X線回折図形

が生成されることが示された。さらに、市販の歯質接着材を歯質に塗布した際には、機械的性質や安定性におとる DCPD が XRD にてほとんど観察されない。これは、大きな DCPD の結晶析出が起こっていないことを示している。歯質の HAp を脱灰することで、大きな析出物となるのは MDP-Ca 塩のみである。MDP-Ca 塩は難溶性で安定であると思われ、このことが歯質接着でよい耐久性を示す要因と示唆された。

3. 歯質接着界面の電子顕微鏡観察

生物の骨や歯を含む組織は硬組織と呼ばれる。一般的に、硬組織はダイヤモンドナイフで薄切しにくいいため、硬さの原因である HAp を脱灰しながら、露出したコラーゲン線維や細胞などの軟組織を化学固定する脱灰が行われる。HAp を完全に脱灰させるため、軟組織と同様の硬さになる。この方法は HAp が存在する骨や歯、本来の形態、構造を観察できない。歯質接着界面の観察は、接着性モノマーによる HAp 脱灰の様子など、HAp の形態、構造を詳細に観察する必要があるために、非脱灰での観察が主となる。歯質接着界面の電子顕微鏡観察試料は、一般的に健全な象牙質を研磨により露出させ、その面に歯質接着材を塗布し、光重合する。さらに、コンポジットレジン（フィラーの小さな、薄切しやすいものを使用）を築盛して光照射により硬化させる。これを $1 \times 1 \times$ 数 mm に切断し、脱水、樹脂置換し、樹脂包埋する。四酸化オスミウムによる後固定は、一般的に行われない。この試料をウルトラミクロトームとダイヤモンドナイフで薄切する。これにより、良好な電子顕微鏡観察試料を作製することができる。エッチ&リンスシステムで、HAp が完全に脱灰された歯質を含む試料や、セルフエッチングシステムでも接着性モノマーが浸透する領域で HAp が完全に脱灰される

試料は、コラーゲン線維を観察するために 2 重染色を行うことがある。

図 3 はクリアフィル メガボンドによる象牙質接着界面の無染色 TEM 像である¹⁵⁾。クリアフィル メガボンドはプライマーとボンドから構成されている。プライマー塗布により歯質が脱灰され、モノマーが浸透する。次に、ボンド塗布により接着材層が形成される。健全象牙質の HAp を脱灰し、モノマーが浸透、重合した樹脂含浸層が観察された(図 3a)。この樹脂含浸層の象牙質は、HAp が完全に脱灰されていないことが観察された(図 3a, b)。MDP-Ca 塩は、樹脂含浸層からボンディング層にかけて成長しており、層状構造が観察された(図 3c, d)。MDP-Ca 塩の層間隔は、電子回折図形(図 3d)から 3.9 nm であることが示された。図 4 は同じ試料を用い、HAADF 像および、EDS による元素マップを観察した結果である¹⁵⁾。MDP-Ca 塩は、シリカフィラーが存在するボンディング層と、象牙質の間に成長しており、プライマー塗布により生成したと考えられた。MDP-Ca 塩は、MDP モノマーが高密度に自己組織化しているため、Ca, P, O の元素マップで高濃度領域として観察された。MDP-Ca 塩は緻

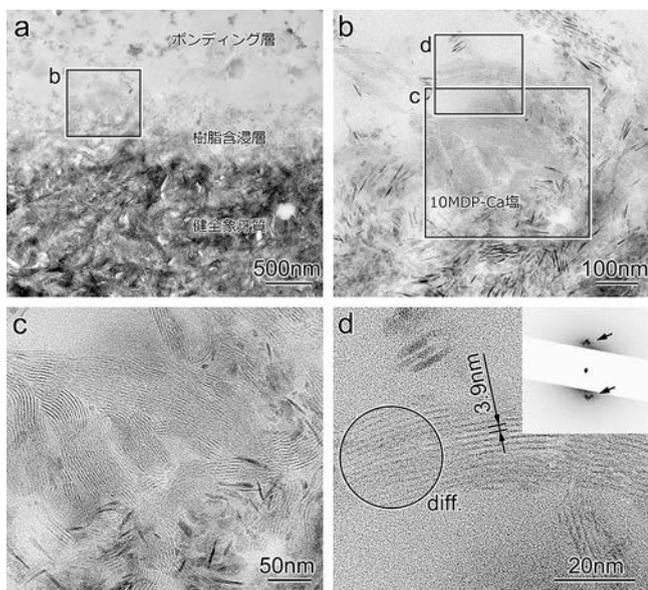


図 3 象牙質/クリアフィル メガボンド接着界面の TEM 像 (JEOL JEM-3010), 各図の枠は拡大領域と電子回折の制限視野領域を示す¹⁵⁾

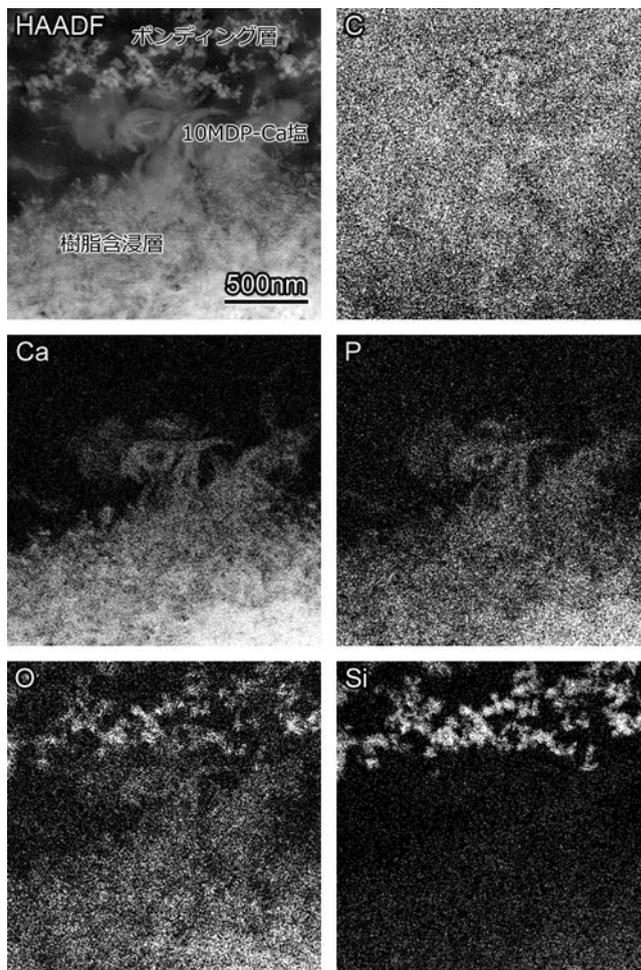


図 4 象牙質/クリアフィル メガボンド接着界面の HAADF 像および元素マップ (JEM-2100F Cs, JED-2300T)¹⁵⁾

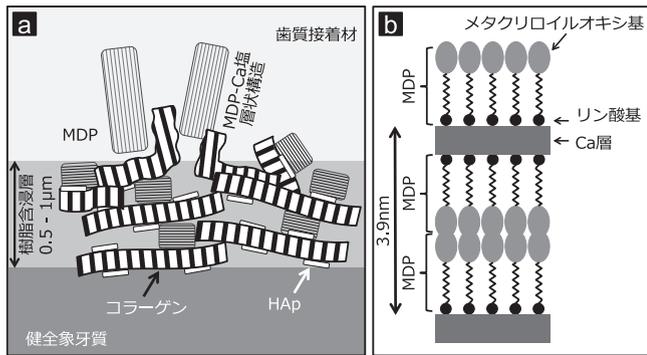


図5 MDP-Ca 塩形成メカニズムと構造¹⁵⁾

密で疎水性が強く、口腔内の湿潤環境下における安定性に寄与すると示唆された。

図5は、健全象牙質にメガボンド プライマーを塗布したときのMDP-Ca 塩形成メカニズムの模式図と、XRD、固体NMR、電子顕微鏡観察結果から考案したMDP-Ca 塩の構造である¹⁵⁾。プライマーに含まれるMDPにより、コラーゲン線維周囲にあるHApを脱灰すると同時に、MDP-Ca 塩が析出する。急速にMDP-Ca 塩が析出することで、HApのさらなる脱灰を抑制し、コラーゲン線維周辺のHApが完全に脱灰されるのを防いでいると考えられた。樹脂含浸層のコラーゲン線維周辺にHApが残ることは、コラーゲン線維の保護に役立ち、長期耐久性に寄与すると考えられた。MDP-Ca 塩は、実際の歯科治療で10年間口腔内に存在した接着界面においても観察されることから、安定な塩であると示された¹⁶⁾。

4. おわりに

口腔内は、体温のもと常に唾液が存在する湿潤環境である。さらに、熱い/冷たい食品の摂取、咀嚼による荷重がかかる過酷な環境である。う蝕を除去し、人工材料で修復する際には、口腔内で耐久性の良い接着材、修復材料が求められる。生体組織である歯は、水分を含んでいるだけでなく、エナメル質、象牙質で構造が異なり、これらの組織に対して強く接着する必要がある。また、低毒性や、審美性が求められる。このような要求を満たす歯科材料が開発されてきた。

MDPの接着メカニズムの研究成果、長期にわたる優れた臨床評価から、国内外の歯科材料メーカーからMDPを用いた歯質接着材が市販されている。しかし、数10年におよぶ耐久性があるわけでない。歯質接着メカニズムは非常に複雑で、未解明な部分が多い。歯科材料の開発では、ナノ構造が観察

できる電子顕微鏡は重要な役割を果たしている。特に、ナノ領域での電子状態解析など電子顕微鏡分析技術に期待される部分が多い。今後の研究で、これらが明らかになり、新たな歯科材料開発に役立つ情報が得られることを期待できる。

文 献

- 1) 中嶋 裕, 西山典宏, 宮崎 隆, 米山隆之 (編集幹事): スタンダード歯科理工学 第6版—生体材料と歯科材料—, 学建書院, (2016)
- 2) Fukuda, R., Yoshida, Y., Nakayama, Y., Okazaki, M., Inoue, S., Sano, H., Suzuki, K., Shintania, H. and Van Meerbeek, B.: *Biomaterials*, **24**, 1861–1867 (2003)
- 3) 坂本 猛, 木村洋明, 大川内一成, 水田悠介, 林 未季: 日本接着学会誌, **52**, 152–165 (2016)
- 4) Van Landuyt, K.L., Snauwaert, J., De Munck, J., Peumans, M., Yoshida, Y., Poitevin, A., Coutinho, E., Suzuki, K., Lambrechts, P. and Van Meerbeek, B.: *Biomaterials*, **28**, 3757–3785 (2007)
- 5) 吉原久美子, 長岡紀幸, 井上 哲, 吉田靖弘: 接着歯学, **33**, 196–203 (2015)
- 6) 吉田靖弘: 日本補綴歯科学会誌, **4**, 353–363 (2012)
- 7) Van Meerbeek, B., Yoshida, Y., Lambrechts, P., Vanherle, G., Duke, E.S., Eick, J.D. and Robinson, S.J.: *J. Dent. Res.*, **77**, 50–59 (1998)
- 8) Van Meerbeek, B., Yoshida, Y., Snauwaert, J., Hellems, L., Lambrechts, P., Vanherle, G., Wakasa, K. and Pashley, D.H.: *J. Adhes. Dent.*, **1**, 7–23 (1999)
- 9) Inoue, S., Koshiro, K., Yoshida, Y., De Munck, J., Nagakane, K., Suzuki, K., Sano, H. and Van Meerbeek, B.: *J. Dent. Res.*, **84**, 1160–1164 (2005)
- 10) Yoshida, Y., Nagakane, K., Fukuda, R., Nakayama, Y., Okazaki, M., Shintani, H., Inoue, S., Tagawa, Y., Suzuki, K., De Munck, J. and Van Meerbeek, B.: *J. Dent. Res.*, **83**, 454–458 (2004)
- 11) Fukeygawa, D., Hayakawa, S., Yoshida, Y., Suzuki, K., Osaka, A. and Van Meerbeek, B.: *J. Dent. Res.*, **85**, 941–944 (2006)
- 12) Yoshihara, K., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Fukeygawa, D., Hayakawa, S., Mine, A., Nakamura, M., Minagi, S., Osaka, A., Suzuki, K. and Van Meerbeek, B.: *Acta Biomater.*, **6**, 3573–3582 (2010)
- 13) Yoshihara, K., Yoshida, Y., Hayakawa, S., Nagaoka, N., Irie, M., Ogawa, T., Van Landuyt, K.L., Osaka, A., Suzuki, K., Minagi, S.A. and Van Meerbeek, B.: *Acta Biomaterialia*, **7**, 3187–3195 (2011)
- 14) Yoshida, Y., Yoshihara, K., Hayakawa, S., Nagaoka, N., Okihara, T., Matsumoto, T., Minagi, S., Osaka, A., Van Landuyt, K. and Van Meerbeek, B.: *J. Dent. Res.*, **91**, 1060–1065 (2012)
- 15) Yoshida, Y., Yoshihara, K., Nagaoka, N., Hayakawa, S., Torii, Y., Ogawa, T., Osaka, A. and Van Meerbeek, B.: *J. Dent. Res.*, **91**, 376–381 (2012)
- 16) 吉原久美子, 長岡紀幸, 吉田靖弘: 接着歯学, **34**, 107 (2016)