# 学 位 請 求 論 文

歯質と修復用レジンの接着における アスパラギン酸誘導体の被着面処理効果

伊 東 孝

介

岡山大学大学院歯学研究科歯学専攻 研究分野:歯科保存学第一

(主任・指導: 井上 清 教授)

# 目次

ŧ., .

第1章	序論	.1
	文献	.3
始9音	マフパラギン酔話道休の今山	5
<b>匊</b> 4早	ノスハノイン 取 弱 母 仲 の 日 成	
2-1	緒言	5
2-2	**** こ 実験材料および方法	. 6
	1)アスパラギン酸誘導体の合成	. 6
	2)反応物の構造確認	.7
	(1)赤外分光分析	7
	(2)核磁気共鳴分析	.7
	3)アスパラギン酸誘導体のpKa測定	7
2-3	結果および考察	. 8
	1)IRスペクトル	. 8
	2)NMRスペクトル	8
	3)アスパラギン酸誘導体のpKa	10
2-4	結論	11
	文献	12
第3章	アスパラギン酸誘導体水溶液による象牙質被着面処理効果について.	13
3-1	緒言	13
3-2	実験材料および方法	13
	1)被着面処理材の調整	13
	2)引張接着強さ試験	13
	3) 被着面および接着界面のSEM観察	14
3-3	結果および考察	14
	1) 引張接着強さ試験	14
	2) 被着面および接着界面のSEM所見	18
3-4	結論	18
	文献	20
htter 4 540		01
第4早	N-AAspと歯質との脱灰反応およびその生成物について	21
A 1	☆ <b>#</b> 言	<b>9</b> 1
4-1	粕 言	21 1
4-2	夫駅 / 村 や よ い 力 は	21 91
	1)N <sup>-</sup> AASP処理圏囲VP口側と 9)を毎日広告は枷の返販	21 22
	<ul> <li>4) 台裡 区心 生 成物 切 休 収</li></ul>	22
	ロルトータイト アドレン スル 目析木 ていいいがい しょうしょうしょう	1.1.

	(2)N-AAspと第3リン酸カルシウムとの反応	22
	(3)N-AGlyと第3リン酸カルシウムとの反応	22
	3)反応物の構造確認	22
	(1)赤外分光分析	22
	(2)元素分析	23
4-3	結果および考察	23
	1)20wt%N-AAsp処理後の牛歯歯面のpH	23
	2)反応生成物の構造	23
4-4	結論	27
	文献	28
第5章	N-AAspが樹脂含浸層の生成に及ぼす影響	29
5-1	緒言	29
5-2	実験材料および方法	29
	1)N-AAsp処理歯面のSEM観察	29

	2)引張接着強さの測定	29
	3)接着界面のSEM観察	30
	4)樹脂含浸層の電子線マイクロアナライザ(EPMA)による分析	
5-3	結果および考察	30
	1)N-AAsp処理象牙質のSEM像	30
	2)引張接着強さの測定	32
	3)接着界面のSEM観察	34
	4)エネルギー分散型X線マイクロアナライザー(EDX)による樹脂	皆含浸層
	の分析	
5-4	結論	
	文献	36

第6章	総括	37
	謝辞	39

### 第1章 序論

生体硬組織である歯に人工材料を組み込み一体化させることは、歯科保存修復では最重 要事項の一つである.これにより、う蝕などの疾患に罹患した歯の機能回復がはかれ、口 腔内での長期的な機能発揮が望める.歯科修復法の中でも、コンポジットレジン修復は修 復物を窩壁歯質に接着することによって生体と人工材料を一体化できる可能性のある唯一 の修復法である.しかし、修復用レジンは本来歯質に対して接着性を有しないので、歯質 に接着させるためには被着面処理材およびボンディング材の併用が必須である.

ほとんどが無機質からなるエナメル質への接着では、酸によってエナメル質表層を脱灰 するとエナメル小柱に沿って脱灰が進み、微細凹凸構造が形成される.この処理面にボン ディング材を塗布すると微細凹凸構造にレジンが浸透、硬化して機械的嵌合力が発揮さ れ、歯質とレジンの接着が可能になることをBuonocore<sup>11</sup>が報告した.この接着機構の概 念は酸処理およびボンディング材が大きく変遷した現在においてもさほど変わっていな い.しかしながら、エナメル質と異なり、有機質および水分を多量に含有する象牙質への 接着法は多くの議論がなされているが、未だ確立されたとは言い難いのが現状である.

象牙質接着の基本メカニズムとして中林は10%クエン酸-3%塩化第二鉄水溶液で処理し た象牙質に4-META/MMA-TBB系レジンが良好に接着し、その界面に樹脂含浸象牙質が 生成していることを報告した<sup>20</sup>. 樹脂含浸層は脱灰象牙質層にボンディング材が浸透・拡 散してできた層で様々な接着システムにおいても確認されており<sup>30</sup>,現在においては象牙 質とレジンの接着機能の主体を成すものと考えられる様になった. これ以来、脱灰象牙質 層へのボンディング材の浸透・拡散による樹脂含浸層の生成を目的とし各種接着促進モノ マー<sup>40</sup>が合成された. 一方、Munksgaardら<sup>50</sup>は、EDTA処理象牙質にグルタルアルデヒド -HEMA水溶液を作用させるとボンディング材の接着強さが向上することを報告し、象牙 質接着においてプライマーによる表面改質の概念を提示した. この接着促進モノマー含有 溶液であるプライマーの使用により、脱灰された管間象牙質へのボンディング材の浸透・ 拡散状態が変化し、接着強さに大きな影響を及ぼすことが、Pashleyら<sup>60</sup>,Nakabayashi ら<sup>71</sup>およびWatanabeら<sup>80</sup>など多くの研究者によって指摘されている. プライマーと樹脂含 浸層の関わりについては、HEMA系プライマーにおいてプライマーがコラーゲン線維の 構造変化をもたらし、樹脂含浸層の生成に関与していることが報告<sup>9~111</sup>されており、プラ イマー処理と樹脂含浸層の生成が密接に関わっていることが明らかになってきた.

ところで、上述のような象牙質を脱灰した後にプライマーを応用させる接着システム は、複数の処理を伴うもので、操作性が煩雑である.そこで、プライマーに本来の表面改 質効果のみならず脱灰能を導入し、操作ステップを簡略化した歯面処理材、いわゆるセル フエッチングプライマーの研究<sup>8).12~16)</sup>がさかんに行われている.このセルフエッチング プライマーには、スミヤー層の除去、基質象牙質の脱灰作用およびボンディング材の浸 透・拡散性の促進などの複数の機能が要求されるため、材料として複数モノマーおよび溶 媒が使用され、そのため作用機序は複雑となり、接着機構については未だ十分に明らかに されていない.

著者はセルフエッチングプライマー中に使用するモノマーとして、鈴木ら<sup>17)</sup>が報告して いるアミノ酸誘導体の中でもジカルボン酸であるアスパラギン酸に重合基を付加した誘導 体に着目した.アスパラギン酸は、1分子中にpKaの異なる2つのカルボキシル基を有す るため、解離状態にあるカルボキシル基は酸性モノマーとして歯質を脱灰し、解離状態に ないカルボキシル基は機能性モノマーとしてボンディング材の浸透・拡散を促進するとい う2つの作用が期待できる.またアスパラギン酸はコラーゲン線維を構成するアミノ酸の 1つであり、その誘導体には生体親和性も期待できると考える.そこで、アスパラギン酸 に重合基を付加したアスパラギン酸誘導体を分子設計し、合成を行い、その水溶液をセル フエッチングプライマーとして象牙質被着面処理法に応用し、レジンと象牙質との接着性 について検討した.さらにその接着機構の解明を歯質との反応および樹脂含浸層の形成能 の点から試みた.

## 文献

1) Buonocore M : A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surface, *J Dent Res*, 34(6), 849–853, 1955

2)中林宣男:接着界面の象牙質に生成した樹脂含浸象牙質について、歯材器、1(1)、 78-81、1982

3) Meerbeek BV, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G : Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems, *J Dent Res*, 71(8), 1530–1540, 1992

4) 中林宣男(編): 最新歯科接着用語解説集, クインテッセンス出版, 1992, 110-112

5) Munksgaard EC, Asmussen E : Bond strength between dentin and restorative resins mediated by mixtures of HEMA and glutaraldehyde, *J Dent Res*, 63(8), 1087–1089, 1984

6) Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner J : Permeability of dentin to adhesive agents, Quintessence Int, 24, 618–631, 1993

7) Nakabayashi N, Watanabe A, Ikeda W : Intra-oral bonding of 4-META/MMA-TBB resin to vital human dentin, *Am J Dent*, 8(1), 37-42, 1995

8) Watanabe I, Nakabayashi N, Pashley DH : Bonding to ground dentin by a Phenyl-P self-etching primer, *J Dent Res*, 73(6), 1212–1220, 1994

9)水野良司,鈴木一臣,近藤康弘,矢谷博文,中井宏之,山下 敦: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(5),637-647,1993

10)水野良司, 鈴木一臣, 近藤康弘, 矢谷博文, 中井宏之, 山下 敦 : 象牙質とレジンの接着(第2報)HEMA溶液処理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(5), 475-482, 1994

11) 鈴木一臣,水野良司,近藤康弘,矢谷博文,山下 敦:歯質とレジンの接着-酸処 理象牙質に対するHEAおよびHEMA系プライマーの役割-,接着歯学,11(2),95, 1993

12) Chigira H, Koike T, Hasegawa T, Itoh K, Wakumoto S, Hayakawa T : Effect of the self etching dentin primer on the bonding efficacy of a dentin adhesive, *Dent Mater*, 8(1), 86–92, 1989

13)西田幸二,山内淳一:新しい接着システムの開発,歯科材料・器械,12(特), 118,1993

14)福島忠男,宮崎光治,井上 廣: N-メチロールメタクリルアミドのセルフエッチ ングデンチンプライマーへの応用,歯材器,11(4),679-684,1992

15) 早川 徹:コンポジットレジンの未前処理研磨象牙質への接着に関する研究,歯材器,12(4),455-465,1993

16)高橋 貢,鈴木一臣,中井宏之:歯質と修復用レジンの接着-アミノ酸誘導体-HEMA水溶液による被着面処理-,歯材器,9(1),65-73,1990

17) 鈴木一臣, 宗近 忠, 松川正一郎, 堀江港三: 歯質と接着するポリマーの研究 (その2)-α-アミノ酸を骨格としたメタクリレートの合成とその接着性について-, 歯理工 誌, 37(1), 114-119, 1980

## 第2章 アスパラギン酸誘導体の合成

2-1 緒言

現在,研究もしくは市販されている接着促進モノマーのほとんどは,レジンと共重合を 期待して重合基であるビニル基の他に,歯質との親和性を高めるために,水酸基<sup>1),2)</sup>,カ ルボキシル基<sup>3),4)</sup>,アルデヒド基およびリン酸基<sup>5),6)</sup>などの構造を有した分子設計となっ ている.しかしながら,これらの官能基の歯質接着に対する作用機序についての報告はわ ずかに散見<sup>7)</sup>されるのみである.

官能基としてカルボキシル基を有するアミノ酸誘導体については、高橋ら<sup>81</sup>は、アミノ 酸誘導体であるN-メタクリロイルアラニンとHEMAの混合水溶液処理が象牙質およびエ ナメル質との接着における被着面処理法として有効であると報告し、彼らはその作用機序 として、N-メタクリロイルアラニン水溶液が酸としてアパタイトを脱灰しコラーゲンを 露出させ、コラーゲンにHEMAが作用して接着性が発揮されたと考察している.一方、 西山ら<sup>81</sup>は、象牙質をリン酸で脱灰した後にアミノ酸誘導体であるN-メタクリロイルグリ シン水溶液をプライマーとして使用した場合、そのカルボキシル基の解離状態が象牙質と レジンの接着強さにどのような影響を与えるかを調べ、N-メタクリロイルグリシンのカ ルボキシル基が解離しない状態で象牙質に作用させると高い接着強さが得られたと報告し ている.

高橋らの報告は、アミノ酸誘導体が歯質を脱灰する酸として働き、また西山らの報告は アミノ酸誘導体がボンディング材の脱灰象牙質への浸透・拡散を促進する機能性モノマー として作用することを意味している.これらの報告はアミノ酸誘導体が異なった複数の機 能を発揮する可能性を示唆していると考える.

ところで中林は、同一分子内に疎水基と親水基を有し、かつそのバランスがとれている モノマーが歯質との接着に有効である<sup>10)</sup>と述べている.しかし、当時は酸で処理した後に ボンディング材を塗布することが提唱されており、接着性モノマーはボンディング材中に 配合することが考えられていた.すなわち、歯質の脱灰作用とボンディング材の浸透・拡 散促進作用という複数機能をもつセルフエッチングプライマーの概念はまだ確立されてい なかった.セルフエッチングプライマーはボンディング材の脱灰象牙質への浸透・拡散を 促進するだけでなく、歯質の脱灰能も発現しなければならない.よって、モノマーをセル フエッチングプライマー中に配合し、歯質脱灰作用を発現させるためには溶媒として水の

存在が必須であり、使用されるモノマーは水溶性であることが要求される.

上述した歯質の脱灰作用,ボンディング材の浸透・拡散促進作用および水溶性を満たす モノマーとして,著者はアミノ酸の中でもアスパラギン酸に重合基を付与した誘導体に着 目した.アスパラギン酸は、1分子中にpKaの異なるカルボキシル基を2つ有する.そこで アスパラギン酸に重合基を付加した誘導体を合成すれば,誘導体の解離状態にあるカルボ キシル基は酸性モノマーとして歯質を脱灰し,解離状態にないカルボキシル基は機能性モ ノマーとしてボンディング材の浸透・拡散を促進することが考えられる.また、ジカルボ ン酸構造をもつアミノ酸としては分子量も小さく、その誘導体は水に対する溶解性に優れ ると予想された.

本章ではアスパラギン酸に重合基としてメタクリロ基もしくはアクリロ基を付加し,ア スパラギン酸誘導体の合成を試みた.また,合成したアスパラギン酸誘導体が酸性モノマ ーおよび機能性モノマーとしての作用を発現することに深く関与すると思われるカルボキ シル基の電離定数(pKa)の測定も行った.

2-2 実験材料および方法

1)アスパラギン酸誘導体の合成

Fig.1に本研究で合成を試みたアスパラ ギン酸誘導体の示性式を示す.以下,Nmethacryloyl aspartic acidをN-MAsp, N-acryloyl aspartic acidをN-AAspと略 す.

合成にあたり,アスパラギン酸は市販の DL-アスパラギン酸(東京化成)をそのまま 用いた.メタクリル酸クロリドおよびア クリル酸クロリドは市販試薬(東京化成)を 減圧蒸留して用いた.

アスパラギン酸誘導体の合成過程を Fig.2に示した.

$$CH_{2} = C$$

$$CH_{2} = C$$

$$C = NH = CH = COOH$$

$$H$$

$$CH_{2} = COOH$$

$$CH_{2} = COOH$$

N-methacryloyl aspartic acid

$$CH_2 = C$$

$$CH_2 = C$$

$$C - NH - CH - COOH$$

$$U$$

$$U$$

$$U$$

$$CH_2 - COOH$$

$$H_2 - COOH$$

$$H_2 - COOH$$

$$H_2 - COOH$$

$$H_2 - COOH$$

Fig.1 Rational formula of synthsized monomers

三口フラスコに3N-NaOH200mlおよびDL-アスパラギン酸0.2molを入れ,アスパラギン酸が完全に溶解するまで十分に撹拌した.次に三口フラスコに圧力平衡側管付分液ロート2つと二重管冷却器を連結した.その後,分液ロートの内一つには6N-NaOH,他方に

はメタクリル酸クロリドあるいは、ア クリル酸クロリドを入れた. このメタ クリル酸クロリドあるいは、アクリル 酸クロリドを約2時間かけて滴下し た. 滴下中は、反応溶液のpHを7~8 になるように他方の分液ロート中の 6N-NaOHを加えて調節した.次に, 反応溶液に6N-HClを加えてpHを1~ 2に下げて反応物のNaを遊離させて、 反応物を酢酸エチルにて抽出して結晶 化した. なお収率は、N-MAspでは53 %, N-AAspでは44%であった.

2)反応物の構造確認

(1)赤外分光分析

合成した反応物の結晶1mgと

た. 試料を錠剤成型器で円盤状に成型

KBr200mgを混合し粉砕して試料とし Fig.2 Syntheses of aspartic acid derivatives

した後, IR分光光度計(IR-810, 日本分光)を使用して測定した. 測定は波数400~4000 cm -1の範囲を透過法で行った.

(2)核磁気共鳴分析

反応物をDMSOもしくは重水に溶解して、これに基準試薬としてテトラメチルシランを 添加し測定した.なお、NMR装置はEX-270(日本電子)を使用した.

3)アスパラギン酸誘導体のpKa測定

機能性モノマーをプライマーとして使用する場合には、そのカルボキシル基の解離状態 が接着性の発現に大きく関与する9)ことから、合成したアスパラギン酸誘導体の電離定数 (pka)の測定を行った.

まず、重水2mlにN-AAsp1.5mmolもしくはN-MAsp0.75mmolを溶解した. これに塩 酸または水酸化ナトリウム水溶液を添加し、pHを0.5から8.0まで0.5間隔で変化させ NMR装置を用いてカルボキシル基の化学シフトを測定した.次にpH-化学シフト曲線をS 状曲線の1つであるロジスティク曲線(y=k/(1+ae<sup>-bx</sup>),変曲点(log a/b, k/2)<sup>11)</sup>に当ては め、定数a,bおよびkを求めた.そしてこの曲線の変曲点のX座標(log a/b)をそれぞれのカ



ルボキシル基のpKaとした.

2-3 結果および考察

1)IRスペクトル

Fig.3にN-MAspおよびN-AAspのIRスペクトルを示した. N-MAspには3510cm<sup>-1</sup>に シャープなピークが現れ,これは-NHの伸縮振動に帰属された. 3100~3000cm<sup>-1</sup>にみら れる吸収帯には-OHの振動が、2700cm<sup>-1</sup>には-CH<sub>3</sub>に、1770cm<sup>-1</sup>にはC=O、1690cm<sup>-1</sup>には C=Cに由来するピークが認められた. N-AAspも同様に3370cm<sup>-1</sup>に-NH、3200~3000cm<sup>-1</sup> <sup>1</sup>に-OHの振動が、2600cm<sup>-1</sup>には-CHに、1750cm<sup>-1</sup>にはC=O、1660cm<sup>-1</sup>にはC=Cに由来す るピークが認められた.





2)NMRスペクトル

Fig.4にN-MAspおよびN-AAspの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示した. N-MAspの各ピーク は1.7ppmにメタクリロ基の-CH<sub>3</sub>, 2.5ppmにアスパラギン酸の-CH<sub>2</sub>, 4.4ppmにアスパ ラギン酸の-CH, 5.2ppmおよび5.5ppmにメタクリロ基の=CH<sub>2</sub>, 7.9ppmにアスパラギ ン酸の-NHにそれぞれ帰属された. N-AAspの各ピークは2.7ppmにアスパラギン酸の-CH<sub>2</sub>, 4.6ppmにアスパラギン酸の-CH, 5.7ppmにアクリロ基の-H, 6.3ppmにアクリ ロ基の=CH<sub>2</sub>, 8.4ppmにアスパラギン酸の-NHにそれぞれ帰属された.



Fig.4 <sup>1</sup>H-NMR spectra of synthesized monomers



Fig.5 <sup>13</sup>C-NMR spectra of synthesized monomers

Fig.5にN-MAspおよびN-AAspの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示した. N-MAspの各ピーク は17.5ppmにメタクリロ基の-CH<sub>3</sub>, 35.4ppmにアスパラギン酸の-CH<sub>2</sub>, 49.3ppmにア スパラギン酸の-CH, 121.8ppm, 138.5ppmおよび171.7ppmにメタクリロ基のCにそれ ぞれ帰属された. N-AAspの各ピークは35.5ppmにアスパラギン酸の-CH<sub>2</sub>, 49.0ppmに アスパラギン酸の-CH, 128.5ppm, 129.2ppmおよび168.1ppmにアクリロ基のCにそれ ぞれ帰属された.

以上のIRスペクトルおよびNMRスペクトル分析の結果から、合成物が目的とするN-MAspおよびN-AAspであることが確認できた.

3)アスパラギン酸誘導体のpKa

酸あるいはアルカリを添加したN-MAspおよびN-AAsp水溶液のpHとカルボキシル基 のNMR化学シフトの関係をFig.6に示した. 図中の曲線の変曲点からN-MAspのカルボキ シル基のpKaは3.80および4.27, N-AAspのカルボキシル基のpKaは3.67および4.19で あった.

アスパラギン酸のカルボシキル基のpKaはアミノ基に近い(主鎖)カルボキシル基が2.09 であり、一方(側鎖)のカルボキシル基のpKaが3.86である.これは、アミノ基が電子求引 性置換基であるために、アミノ基に近いカルボキシル基が強い酸性を示すことによる.し たがって、アミノ基に重合基が付加されているN-MAspおよびN-AAspのpKaにおいても 同様な傾向を示すことが推察され、N-MAspにおいてはアミノ基に近いカルボキシル基の pKaが3.80、アミノ基から離れているカルボキシル基のpKaが4.27を示し、N-AAspにお いてはアミノ基に近いカルボキシル基のpKaが3.67、アミノ基より離れているカルボキシ ル基のpKaが4.19を示したものと考えられた.

アスパラギン酸誘導体のpKaが異なることから、主鎖のカルボキシル基が側鎖のカルボ キシル基と比較して解離しやすい状態にあることがわかり、また水に対する最大溶解度を 測定したところ、N-AAspは25wt%、N-MAspは6wt%であるため、重合基としてアクリ ロ基を導入することによってカルボキシル基の性質を大きく変化させずに、アスパラギン 酸誘導体の水への溶解度を増加させることが可能となることが明らかになった.





N-acryloyl aspartic acid

 1.62

pKa=log

(pH)

-4.19

2-4 結論

IRスペクトルおよびNMRスペクトルからの分析結果より、合成物が目的とするN-MAspおよびN-AAspであることを確認した.

 $pKa = log \frac{381}{1.62}$ 

=3.67

(pH)

N-MAspのカルボキシル基のpKaは主鎖3.80, 側鎖4.27, N-AAspのカルボキシル基 pKaは主鎖3.67、側鎖4.19であり、アスパラギン酸誘導体においては重合基としてメタク リロ基よりもアクリロ基を付加した方が水への溶解性が高いことがわかった.

## 文献

1) Munksgaard EC, Asmussen E : Bond strength between dentin and restorative resins mediated by mixtures of HEMA and glutaraldehyde, *J Dent Res*, 63(8), 1087–1089, 1984

2) Nakabayashi N, Takarada K : Effect of HEMA on bonding to dentin, *Dent Mater*, 8(2), 125–130, 1992

3) 中林宣男:接着界面の象牙質に生成した樹脂含浸象牙質について、歯材器、1(1)、 78-81、1982

4) 井上勇介: 歯科用レジンの歯質への接着に関する研究-カルボキシル基を有する各種 脂肪族メタクリレートの合成と歯質への接着性-, 歯材器, 8(3), 307-323, 1989

5)山内淳一:リン酸エステル系メタクリルモノマーを含有する歯科用接着性レジンの 研究,歯材器,5(1),144-154,1986

6) Wang T, Nakabayashi N : Effect of 2–(methacryloxy)ethyl phenyl hydrogen phosphate on adhesion to dentin, *J Dent Res*, 70(1), 59–66, 1991

7) 鈴木一臣,中井宏之,西山典宏,根本君也:コラーゲンと機能性モノマーとの相互 作用に関する研究(その8) - プライマーの官能基が象牙質コラーゲンにおよぼす影響-,歯 材器,14(特26),192-193,1995

8) 高橋 貢, 鈴木一臣, 中井宏之: 歯質と修復用レジンの接着-アミノ酸誘導体-HEMA水溶液による被着面処理-, 歯材器, 9(1), 65-73, 1990

9) 西山典宏,村松安盛,根本君也,堀江港三,鈴木一臣,中井宏之:コラーゲンと機 能性モノマーとの相互作用に関する研究 その5 NM α A プライマーのpHによる影響,歯 材器,13(特24),82-83,1994

10) 中林宣男:機能性モノマーと歯質への接着,人工物と生体のハイブリッド化,有合 化誌,42(11),1031-1040,1984

11)東京大学教養学部統計学教室編:自然科学の統計学,東京大学出版会,1993,231-250

## 第3章 アスパラギン酸誘導体水溶液による象牙質被 着面処理効果について

3-1 緒言

近年,プライマーに本来の表面改質効果のみならず脱灰能を導入し,操作ステップを簡略化したセルフエッチングプライマーの開発,研究<sup>1~3)</sup>が精力的に行われており,安定した接着性を示す接着システム<sup>4)</sup>も出現してきた.これらのセルフエッチングプライマーはいずれも脱灰能を有する酸あるいは酸性モノマーと樹脂含浸層の生成能<sup>5)</sup>を有する機能性モノマー<sup>6)</sup>などから構成されている.

著者はセルフエッチングプライマー中に使用するモノマーとしてアミノ酸の中でもアス パラギン酸に重合基を付加した誘導体に着目した.アスパラギン酸は、1分子中にpKaの 異なるカルボキシル基を2つ有するため重合基を付加し誘導体を合成すれば、誘導体の解 離状態にあるカルボキシル基は酸性モノマーとして歯質を脱灰し、解離状態にないカルボ キシル基は機能性モノマーとしてボンディング材の浸透・拡散を促進することが考えられ た.

本章では、第2章で合成したアスパラギン酸誘導体であるN-AAspとN-MAspと水から 調製したセルフエッチングプライマーを試作し、その象牙質被着面処理効果について検討 した.

3-2 実験材料および方法

1)被着面処理材の調整

アスパラギン酸誘導体の24℃の蒸留水に対する溶解度はN-MAspは6wt%, N-AAspは 25wt%であった.そこでN-MAspは1, 2, 3, 4, 5および6wt%, N-AAspは5, 10, 15、20および25wt%の各濃度で蒸留水に溶解し被着面処理材とした.

2) 引張接着強さ試験

引張接着強さ試験の試料体作製は以下の手順で行った.被着体は,抜去後に冷凍保存した牛下顎切歯を使用直前に解凍し,歯根部を切断して歯髄を除去したものを用いた.唇面をMODEL TRIMMER(モリタ)で研削後,シリコンカーバイドペーパー(#600)を用いて注水下で仕上げ研磨して被着面とした.被着面にポリエチレン製リング(直径3.8mm,高さ2.0mm)を仮着して模擬窩洞とし,被着面処理は1)で調整した被着面処理材を塗布し,

60秒後にエアーブローを行った.次に通法に従ってボンディング材(クリアフィルフォト ボンド,クラレ)を塗布し,20秒間光照射した.その後コンポジットレジン(クリアフィル AP-X,クラレ)を充填し,40秒間光照射を行った.充填終了10分後ポリエチレン製リン グを除去し、37℃蒸留水中に24時間浸漬した後、引張接着強さを測定した.なお測定に 際しては、試料に引張試験用アタッチメントをシアノアクリレート系接着材で固定し、オ ートグラフ(AGS-10kND,島津)を用いてクロスヘッドスピード2.0mm/minにて行っ た.試料数は各群10とした.また、N-MAspおよびN-AAsp処理群において最大引張接着 強さを示した5wt%N-MAspおよび20wt%N-AAsp処理群には4℃と60℃の恒温水中に各 1分間浸漬するサーマルサイクルを20,000回加えた後の接着強さも測定し、接着耐久性 を検討した.

3)被着面および接着界面のSEM観察

被着面を観察するための試料は以下の手順で行った. 牛下顎切歯唇面の象牙質を研削 し,注水下においてシリコンカーバイドペーパー(#600)を用いて仕上げ研磨し,最大引 張接着強さを示した5wt%N-MAspおよび20wt%N-AAspで60秒間処理し,エアーブロー 後に4%グルタールアルデヒド水溶液にて固定,上昇アルコール系列による脱水,酢酸イ ソアミルで置換して,CO<sub>2</sub>移行溶液による臨界点乾燥を行った.さらに試料を割断して象 牙細管縦断方向観察用試料を作製した.接着界面を観察するための試料は,2)の引張接着 強さ試験用試料と同様にして作製した試料をエポキシレジン(エポフィクス,Struers)に 包埋し,接着界面に対して垂直に研削した後に鏡面研磨を行い,観察面を40%リン酸水溶 液で10秒間処理し,次に有機物を除去するために10%次亜塩素酸ナトリウム水溶液(ネオ クリーナー,ネオ製薬)に10分間浸漬して,水洗後乾燥した.

上記のそれぞれの試料をイオンコーター(IB-3,エコーエンジニアリング)を用いて金蒸着を施し,走査型電子顕微鏡(S-430,日立)にて観察した.

3-3 結果および考察

1) 引張接着強さ試験

Fig.7にN-MAspおよびN-AAsp濃度がボンディング材と象牙質の引張接着強さに及ぼ す影響を示した.N-MAsp処理群においては、3wt%までは濃度の増加に伴い引張接着強 さは低下傾向にあった.その後5wt%で最大引張接着強さ10.4±3.2MPaを得た.引張試 験後の試料の破壊形態は、ほとんどが界面剥離とボンディング材の凝集破壊の混合破壊で あったが中には象牙質の被着体破壊を示す試料もあった(10試料中2試料).N-AAsp処理

群では濃度とともに引張接着強さは 増加傾向にあり、20wt%で最大引張 接着強さ16.0±5.9MPaが得られた. 破壊形態はN-MAsp処理とほぼ同様 であったが、象牙質における被着体 破壊を示す試料の割合が増加した(10 試料中4試料).5wt%における引張接 着強さは、N-MAspでは10.4MPa, N-AAspでは8.0MPaを示し両者に有 意差は認めなかった。このことから アミノ酸誘導体水溶液をセルフエッ チングプライマーとして使用する場 合には、付加された重合基の違いよ りも、水溶液中に溶解しているアミ ノ酸誘導体の濃度が影響していると 考えられた.

Fig.8にサーマルサイクル20,000回負荷 後の引張接着強さ試験の結果を示した. サーマルサイクル20,000回負荷後におけ る引張接着強さは、5wt%N-MAsp処理群 では13.7±5.1MPaであった.この値はサ ーマルサイクル負荷前と比較し減少傾向 にあるものの、統計的有意差(*t*-*test*,p< 0.05)を認めるものではなかった.このこ とからアスパラギン酸誘導体での処理に よって生じたレジンと象牙質の接着耐久 性は良好であると思われる.斉藤<sup>71</sup>は、接 着界面におけるボンディング材層を厚く すると初期接着強さが向上することを報 告しているが、一方で、ボンディング材



Fig. 7 Effect of the concentration of aspartic acid derivatives on the bond strength to dentin



Tensile bond strength connected with the line are not significantly different.(0.05level)

Fig. 8 Effect of thermalcycles on bond strength to dentin promoted by aspartic acid derivatives









Fig. 9 SEM views of dentin surface treated with aspartic acid derivatives







 $10.75 \,\mu$  m 20wt%N-AAsp

Fig. 10 SEM views of sectional dentine treated with aspartic acid derivatives







5wt%N-MAsp

20wt%N-AAsp

Fig. 11 SEM views of resin-dentin interface treated with aspartic acid derivatives

層が厚いとサーマルサイクルおよび長期水中浸漬後にボンディング材層の機械的強さの低下が起こり、良好な接着耐久性が得られないことも報告されている<sup>4)</sup>.今回の実験では、 ボンディング材としてクリアフィルフォトボンド(クラレ)を使用した.このボンディング 材を使用することで生成されるボンディング材層の厚みは50 μ m以下であり、合成した アスパラギン酸誘導体処理が良好な接着性を促進したことに加え、この層がサーマルサイ クルの影響を受けなかったことが優れた接着耐久性を得られた要因であると思われた.

2)被着面および接着界面のSEM所見

5wt%N-MAspおよび20wt%N-AAsp処理歯面のSEM像をFig.9に,同様に処理し臨界 点乾燥後に割断したものをFig.10に,またボンディング材と象牙質の接着界面のSEM像 をFig.11に示した.

5wt%N-MAspおよび20wt%N-AAsp処理歯面はほぼ同様の様相を呈しており,脱灰に より表層のスミヤー層は除去されているものの,象牙細管にはデンチナルプラグが幾分脱 灰された状態で残存していた.この所見から,アスパラギン酸誘導体処理の脱灰量が非常 に少ないことがうかがえた.これは従来のエッチング材である40%リン酸,10%クエン 酸および10%マレイン酸処理材のpHはいずれも1以下であり、5wt%N-MAspのpHは 2.4,20wt%N-AAspのpHは1.8とアスパラギン酸誘導体水溶液の酸性度は他の処理材と 比較して弱いためと考えられる.

また,割断面のSEM像において5wt%N-MAspおよび20wt%N-AAspの脱灰深さはそれ ぞれ0.7μm,1.8μmであった.一方,接着界面のSEM像において確認された樹脂含浸層 の厚みは,5wt%N-MAspでは0.7μm,20wt%N-AAspでは1.8μmであった.脱灰深さ と樹脂含浸層の幅の値がほぼ同じであることは,脱灰象牙質にボンディング材が十分に浸 透・拡散していることを示している.水沼<sup>8)</sup>はボンディング材の浸透・拡散が不良である と,樹脂含浸層と健全象牙質との間にボンディング材の浸透・拡散していない層が形成さ れ,この層は強度的に弱く,劣化しやすいため,接着耐久性を低下させる要因となると報 告している.合成したアスパラギン酸誘導体水溶液処理ではそのような層は認められず, このことが良好な接着耐久性をもたらした一因と考えられる.

3-4 結論

N-MAspもしくはN-AAspと水からなる被着面処理材を調製し、その処理材が処理歯 面、象牙質とボンディング材の接着強さおよび接着界面の構造に及ぼす影響について検討 し、次の結果を得た.

1)象牙質とボンディング材の接着強さは、N-MAspは5wt%において10.4MPa, N-AAspは20wt%において16.0MPaの最大引張接着強さが得られた.

2)被着面処理材作用後の象牙質面SEM像より,アスパラギン酸誘導体による脱灰量は非 常に少ないことがわかった.

3)アスパラギン酸誘導体処理により,接着界面に樹脂含浸層が生成されることが確認された.

以上の結果より,アスパラギン酸誘導体がセルフエッチングプライマーとして機能する ことが確認された.

## 文献

1) Watanabe I, Nakabayashi N, Pashley DH : Bonding to ground dentin by a Phenyl-P self-etching primer, *J Dent Res*, 73(6), 1212–1220, 1994

2) Chigira H, Koike T, Hasegawa T, Itoh K, Wakumoto S, Hayakawa T: Effect of the self etching dentin primer on the bonding efficacy of a dentin adhesive, *Dent Mater*, 8(1), 86–92, 1989

3) 福島忠男, 宮崎光治, 井上 廣:N-メチロールメタクリルアミドのセルフエッチン グデンチンプライマーへの応用, 歯材器, 11(4), 679-684, 1992

4) 伊東孝介,鳥井康弘,鈴木一臣,中井宏之,井上 清:修復用レジンと歯質との接着-ライナーボンドIIの歯質接着性について-,接着歯学,12(3),174-181,1994

5) Nakabayashi N, Takarada K : Effect of HEMA on bonding to dentin, *Dent Mater*, 8(2), 125–130, 1992

6) Munksgaard EC, Asmussen E : Bond strength between dentin and restorative resins mediated by mixtures of HEMA and glutaraldehyde, *J Dent Res*, 63(8), 1087–1089, 1984

7) 斉藤英夫:光重合型レジンに関する研究-とくにボンディング材の厚さが象牙質に対 する接着強さにおよぼす影響について-,日歯保誌,34(5),1366-1375,1991

8) 水沼徹: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-,歯材器,6(6),860-872,1987

# 第4章 N-AAspと歯質との脱灰反応およびその生成 物について

4-1 緒言

セルフエッチングプライマーは、窩洞形成によって歯面に生じるスミヤー層を除去し、 表層の無機質であるハイドロキシアパタイトを部分的に溶解し、脱灰された歯質内へのボ ンディング材の浸透・拡散を促進して、樹脂含浸層の形成に寄与しなければならない.と ころで、第3章ではアスパラギン酸誘導体水溶液がセルフエッチングプライマーとしての 機能を有していることが明らかとなった.これはアスパラギン酸誘導体が酸性モノマーと して作用するだけでなく、同時に機能性モノマーとして作用することを示唆している.

酸性モノマーは上述したスミヤー層およびハイドロキシアパタイトの溶解のみではなく カルシウムとのキレート反応を生じ、またアパタイトと反応して生成物を生じて歯質との 接着に関与すると考えられる<sup>1)</sup>. つまり、象牙質面処理後は水洗を行わないため、プライ マー中の酸性モノマーとハイドロキシアパタイトとの反応生成物が脱灰象牙質層表面およ び内部に沈着すると予想され、ボンディング材の浸透・拡散性および樹脂含浸層の物性等 に関係して、接着強さに影響を及ぼす可能性がある. 従って、アスパラギン酸誘導体によ る接着機構を理解するためには、歯質脱灰作用についての情報が必要で、そのためには処 理された象牙質表面における脱灰反応、またその際に生成すると思われる反応生成物など を解析する必要があると考える. 本章では、アスパラギン酸誘導体のうち優れた被着面処 理効果を発揮したN-AAsp水溶液を用いて処理した歯面のpHの経時的変化の測定および 処理面のSEM観察を行うとともに、N-AAsp水溶液とハイドロキシアパタイトとの反応生 成物について検討した.

4-2 実験材料および方法

1)N-AAsp処理歯面のpH測定

20wt%N-AAsp処理後の牛歯歯面のpHの測定は以下の手順で行った. 牛下顎切歯唇面 を研削し注水下において象牙質を露出させ、シリコンカーバイドペーパー(#600)で仕上 げ研磨して37℃水中に24時間浸漬後、20wt%N-AAspを60秒塗布し、エアーブローを 行った. エアーブローから60秒後に、30秒間隔で10分経過するまでそれぞれ処理歯面に pH7.0の蒸留水0.03mlを滴下し、先端径4mmの複合電極(#6210-06T、ホリバ)を接触さ

せてpHを測定した.

2)各種反応生成物の採取

(1)N-AAspと牛歯エナメル質粉末との反応

牛歯エナメル質をボールミル型 粉砕器(Type-7,Fritsch)のメノー 容器に投入し,回転数500ppmで 15分間粉砕し,100メッシュを通 過したものを実験に供した.エナ メル質とN-AAspの反応は,蒸留 水10gにN-AAsp3mmol(0.52g)を 溶解し,次に牛歯エナメル質粉末 4gを加えスターラーにて60秒撹拌

した. 撹拌中は中和熱によるN-

AAspの重合を防ぐために反応液の

温度を0~4℃に保ち, Fig.12に示

した手順で試料A、BおよびCを採取した.

(2)N-AAspと第3リン酸カルシウムとの反応

第3リン酸カルシウム(和光純薬)3mmol(3.3g)とN-AAsp3mmol(0.52g)を反応させ, (1)と同様の方法で試料D, EおよびFを採取した.

(3)N-AGlyと第3リン酸カルシウムとの反応

N-AAspはカルボキシル基を2つもち、そのpKaが異なっていることを第2章で確認した.そこで、リン酸カルシウムとの反応がN-AAspの主鎖および側鎖のカルボキシル基で同時に起こっているのかあるいはどちらか一つのカルボキシル基のみで起こっているのかを検討するために、モノカルボン酸であるN-acryloyl glycine(N-AGly)を合成し、N-AGlyと第三リン酸カルシウムの反応生成物の構造についての分析を行った.

N-AGlyの合成は,第2章におけるアスパラギン酸誘導体の合成と同様の方法で行った.次に(1)と同様な方法で第3リン酸カルシウム(和光純薬)3mmol(3.3g)とN-AGly3mmol(0.3g)を反応させ,(1)と同様の方法で試料G,HおよびIを採取した.

3)反応物の構造確認

(1)赤外分光分析

赤外分光分析は、試料A~I、既知試料である第3リン酸カルシウム(和光純薬)、N-



AAspおよびN-AGlyのそれぞれ1mgとKBr225mgを混合し,粉砕した後に錠剤成形器で 円盤状に成形したものを,赤外分光光度計(IR-810,日本分光)を使用して測定した.測定 は,波数400~4000cm<sup>-1</sup>の範囲を透過法で測定した.

(2)元素分析

第3リン酸カルシウムとN-AAspを反応させ採取した試料Eをカーボン両面テープ(日新 EM)を用いて試料台に固定し,カーボン蒸着(CC7650, FISONS)を施した後,エネルギ ー分散型X線マイクロアナライザー(VOYAGER, NORAN)を用いて元素分析を行った. なお分析条件は,加速電圧15kV,倍率100倍とした.

4-3 結果および考察

1)20wt%N-AAsp処理後の牛歯歯面のpH

20wt%N-AAsp処理後の牛歯象牙質面のpH の測定結果をFig.13に示した.20wt%N-AAsp水溶液のpHは1.8であるが、この水溶 液を用いて歯面処理を行うと牛歯象牙質面の pHは1分後で4.4、3分後で4.7、5分後で4.9 であり、時間経過ともに緩やかに上昇した. これは、処理歯面上でN-AAspの中和反応が 起こっていることを示し、アパタイトの溶解 により溶出したカルシウムイオン等の陽イオ ンと解離して陰イオンとなったN-AAspとが 反応しているものと考えられる.歯面のpH



が1分後で4.4にまで上昇しその後緩やかになっていることより、アパタイトとN-AAspの 反応はN-AAsp塗布直後から短時間で起こっていることが推察される.

2)反応生成物の構造

N-AAsp処理歯面のpHの測定結果より、N-AAspとハイドロキシアパタイトが反応して いると考えられたことから、モデル実験として、N-AAspとハイドロキシアパタイトをin

vitroで反応させ、反応生成物の構造確認を行った. 試料としては第3リン酸カルシウムもしくは牛歯エナメル質粉末をハイドロキシアパタイトとして用いた. エナメル質の無機成分は結晶アパタイトのみからなるが、一方、象牙質中の無機質は約65~70%が結晶性アパタイトで、残りは無定型リン酸カルシウムである<sup>2)</sup>. これら無定型リン酸カルシウム



Fig.14 IR spectra of reaction products of N-AAsp and enamel



Fig.15 IR spectra of reaction products of N-AAsp and calcium phosphate





は構造的に不安定であるために、反応物の同定を困難にすると思われたので、結晶アパタ イトのみからなるエナメル質粉末を実験に使用した.

N-AAspと牛歯エナメル質粉末の反応から得られた試料A~CのIRスペクトルをFig.14 に、N-AAspと第3リン酸カルシウムの反応から得られた試料D~FのIRスペクトルを Fig.15に示す. 試料AとD, BとEおよびCとFのIRスペクトルはそれぞれ一致し、同じ構 造をもつ反応生成物と考えられた. つまりN-AAspと結晶アパタイトの反応がN-AAspと 第3リン酸カルシウムの反応と同じであることが明らかになった. 従って以後の分析は N-AAspと第3リン酸カルシウムで行うこととした.

試料Dは第3リン酸カルシウムのスペクトルと相似であり、1020~1100cm<sup>-1</sup>にP=O、 1030cm<sup>-1</sup>にPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>の伸縮振動を帰属できた.よって、試料Dは未反応の第3リン酸カルシウ ムと考えられた.試料Fは既知物質のN-AAspのスペクトルと一致した.ゆえに、反応溶 液中における未反応のN-AAspと考えられた.試料Eは1020~1100cm<sup>-1</sup>および560~600 cm<sup>-1</sup>にリン酸基に由来するピークが認められた.また1650cm<sup>-1</sup>、1550cm<sup>-1</sup>および1530cm<sup>-1</sup> には有機物に由来すると考えられるピークが認められた.1410cm-1、1250cm-1および 800cm<sup>-1</sup>には-COO<sup>-</sup>由来のピーク<sup>31</sup>が認められ、N-AAspのカルボキシル基が塩を生成して いると考えられた.以上のことより試料Eが、N-AAspとハイドロキシアパタイトの反応 塩と考えられた.

第3リン酸カルシウムとN-AAspを反応させて得られた試料EのEDXによる元素分析の 結果をFig.16に示した.元素分析の結果より試料がO,PおよびCaを含むことが明らかに なった.IRスペクトルおよび元素分析の結果よりN-AAspとハイドロキシアパタイトの反 応生成物はカルシウム、リンおよびN-AAsp由来の有機物を含む構造となっていることが 明らかになり、このことからも反応生成物がN-AAspとリン酸カルシウムとの塩であるこ とが確認できた.

ところでN-AAspはカルボキシル基を2つもっているが、それぞれのpKaが異なってい ることは第2章で述べた.そこで、リン酸カルシウムとの反応が主鎖および側鎖のカルボ キシル基で同時に起こっているのかあるいはどちらか一つのカルボキシル基のみで起こっ ているのかを検討するためにモノカルボン酸であるN-acryloyl glycine(N-AGly)を合成 し、N-AGlyと第三リン酸カルシウムの反応生成物の構造についての分析を行った.N-AGlyと第三リン酸カルシウムの反応から得られた試料G、HおよびIのIRスペクトルを Fig.17に示す.N-AAspと第3リン酸カルシウムの反応と同様に試料Gは未反応の第3リ ン酸カルシウムと考えられ、また試料Iも同様にN-AGlyのスペクトルと一致し、反応溶

液中における未反応のN-AGlyと考えられた. 試料HはN-AGlyと第三リン酸カルシウム の反応生成物と考えられ, 試料Eのスペクトルに相似であったが, -COO<sup>-</sup>に由来すると思 われる1410cm<sup>-1</sup>, 1250cm<sup>-1</sup>および800cm<sup>-1</sup>ピークは試料Bのピークよりもシャープであっ た. N-AAspと第三リン酸カルシウムの反応生成物におけるこれらのピークがブロードで あるのは, N-AAspと第三リン酸カルシウムの反応物中における-COOHの存在比が影響 していると考えられた.



Fig.17 IR spectra of reaction products of N-AGly and calcium phosphate

#### 4-4 結論

N-AAspと第3リン酸カルシウムもしくは牛歯エナメル質粉末を作用させたモデル実験の結果から、リン酸カルシウムとN-AAspの反応塩が生成することが明らかになった.

以上の結果からN-AAsp水溶液で象牙質を処理すると脱灰象牙質層にN-AAspとハイド ロキシアパタイトとの反応生成物が沈着する可能性が示唆された.

## 文献

1) 鈴木一臣, 高橋 貢, 中井宏之: 歯質と修復用レジンの接着-第3リン酸カルシウム とアミノ酸メタクリレート水溶液からの反応生成物について-, 岡山歯誌, 12(1), 115-121, 1993

2) 早川太郎, 須田立雄:口腔生化学, 医歯薬出版, 1987, 67-69

3) Charles JP : The Aldrich library of infrared spectra, Aldrich chemical, 1975, 291–292

## 第5章 N-AAspが樹脂含浸層の生成に及ぼす影響

5-1 緒言

N-AAsp水溶液で研削象牙質を処理するとスミヤー層が除去され、また接着界面に樹脂 含浸層が生成されて、ボンディング材と象牙質は16.0MPaの引張接着強さを示した. こ れは、N-AAspが酸性モノマーとして象牙質の脱灰作用があることを示すと同時にN-AAspが機能性モノマーとしても作用し、N-AAspが象牙質中の無機質および有機質の両 者に作用するものと考えられた. そこで、まず第4章においてN-AAspの主に無機質に対 する作用について検討した. その結果、N-AAspとハイドロキシアパタイトをin vitro で反応させるとN-AAspとリン酸カルシウムの塩が生成されることを確認した.

セルフエッチングプライマーの歯質脱灰作用とは別の機能として脱灰歯面へのボンディング材の浸透・拡散の促進がある.N-AAsp処理後の歯面にはボンディング材が塗布され、その後重合するため、N-AAspおよび第4章で確認したN-AAspと歯質との反応物が ボンディング材の接着性に関与していると考えられる.しかし、これらの反応物が象牙質 に残存していることがレジンと象牙質の接着にどのように影響しているのかは不明であ る.そこで本章では処理面上のN-AAspおよびN-AAspとリン酸カルシウムの塩が接着強 さおよび樹脂含浸層の生成に及ぼす影響を調べた.

5-2 実験材料および方法

1)N-AAsp処理歯面のSEM観察

牛下顎切歯唇面の象牙質を研削し、シリコンカーバイドペーパー(#600)を用いて注水 下で仕上げ研磨した.次にシリコーンリングを象牙質面に仮着して、20wt%N-AAsp水溶 液にて60秒間処理して、エアーブローを行った.試料はイオンコーター(IB-3、エコーエ ンジニアリング)を用いて金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡(S-430、日立)にて観察した. また、20wt%N-AAsp水溶液にて60秒間処理後に水洗を行いN-AAspを除去した試料の観 察も行った.

2) 引張接着強さの測定

引張り接着強さ試験の試料作製は以下の手順で行った.すなわち、牛下顎切歯唇面を MODEL TRIMMER(モリタ)で研削後、シリコンカーバイドペーパー(#600)を用いて注 水下において仕上げ研磨して被着面とした.被着面に第2章で合成したN-AAspを20wt%

水溶液になるように調製した被着面処理材を塗布し,60秒間処理を行った後にエアーブ ローを行った群(非水洗群n=10),N-AAsp処理後に処理面を水洗しN-AAspを極力除去し た群も設定した(水洗群n=10). その後処理面にポリエチレン製リング(直径3.8mm,高さ 2.0mm)を仮着し,通法に従ってボンディング材(クリアフィルフォトボンド,クラレ)を 塗布し,20秒間光照射した.その後コンポジットレジン(クリアフィルAP-X,クラレ)を 充填し,40秒間光照射を行った.充填終了後にポリエチレン製リングを除去し,37℃蒸 留水中に24時間浸漬した後,引張接着強さを測定した.なお測定に際しては,試料に引 張試験用アタッチメントをシアノアクリレート系接着材で固定し,オートグラフ(AGS-10kND,島津)を用いてクロスヘッドスピード2.0mm/minにて行った.

3)接着界面のSEM観察

接着界面を観察するための試料体作製は以下の手順で行った.すなわち牛下顎切歯唇面 を研削し注水下において象牙質板を作製し,シリコンカーバイドペーパー(#600)で仕上 げ研磨して37℃水中に24時間浸漬後に使用した.この象牙質板を分割し,それぞれを引 張接着強さ試験用試料と同様にして非水洗群および水洗群それぞれの試料を作製した.こ れらをエポキシレジン(エポフィクス,Struers)にて包埋し,接着界面に対して垂直に研 削した後にシリコンカーバイドペーパー(#2000)を用いて研磨を行った.次に,接着界面 を露出させ,断面を40%リン酸水溶液で10秒間処理して研削面のスミヤー層と表層の無機 質を溶解し,さらに樹脂含浸層中のコラーゲンを溶解するために10%次亜塩素酸ナトリウ ム水溶液(ネオクリーナー,ネオ製薬)に4時間浸漬した.その後,蒸着時の真空操作中に 接着界面にかかる負荷を避けるために、4%グルタールアルデヒド水溶液で固定,アルコ ール上昇系列による脱水後,酢酸イソアミルで置換してCO<sub>2</sub>移行溶液による臨界点乾燥を 行った.通法に従って金蒸着を施して走査型電子顕微鏡(S-430,日立)にて観察した.

4) 樹脂含浸層の電子線マイクロアナライザ(EPMA)による分析

3)において作製した試料をエネルギー分散型X線マイクロアナライザー(VOYAGER, NORAN)を用いて接着界面の線分析を行った.線分析は樹脂含浸層を中心に10 µmの範囲を200分割し走査回数400回,加速電圧15Kevの条件下で,C元素の分布を観察した.

5-3 結果および考察

1)N-AAsp処理象牙質のSEM像

20wt%N-AAsp処理後の象牙質面をSEM観察すると、象牙細管上にプライマー成分が 膜状になって沈着していると思われる像が観察され、観察部位によっては粒状構造物を認



# Fig.18 SEM views of dentin surface treated with N-AAsp

A:The dentin surface was treated with 20wt%N-AAsp for 60s B:The treated dentin was rinsed with water to remove N-AAsp めた(Fig18-A). N-AAsp処理後の象牙質面を水洗しN-AAspを除去した試料(Fig18-B)で は管間象牙質の構造が明瞭に認められたことから,膜状構造物および粒状構造物はN-AAsp処理と関連があると思われ,この膜状構造物は未反応のN-AAsp,粒状構造物は第4 章で示したようにN-AAspと歯質との反応生成物すなわちN-AAspとリン酸カルシウムの 塩と予想された. N-AAsp処理象牙質面の象牙細管部は幾分開口していたが,これは金蒸 着およびSEM観察時における真空状態により象牙細管上に沈着した膜状のN-AAspが断裂 したものと考えられた.以上の所見は市販セルフエッチングプライマー処理象牙質面にも 認められ<sup>11</sup>,モノマー含有水溶液により脱灰し,その後水洗を行わないという処理手順に よる特徴的所見であると考えられる.

2)引張接着強さの測定

Fig.19に水洗群と非水洗群の引張 接着強さを示す.非水洗群の引張接 着強さは13.4(3.0)MPa,N-AAspを 水洗により極力除去した水洗群の引 張接着強さは7.0(2.3)MPaであり非 水洗群と比べ有意に低かった.象牙 質をN-AAspで処理後に水洗する と,SEM所見で示したようにN-AAspは洗い流されてしまうことか ら,N-AAspの存在が接着強さの発 現に関与していることが明らかに なった.これはN-AAspが酸性モノ マーとしての脱灰作用のみではな く,脱灰によって露出したコラーゲ





#### adhesion

The dentin surface was treated with 20wt%N-AAsp prior to application of bonding resin in unrinsed group, while in the rinsed group N-AAsp was removed from the treated surface by water rinsing.

ンに吸着してこの層の性質を変化させる機能を有している結果であると考えている.すな わち、コラーゲンの表面は、N-AAspの多分子吸着によってカルボキシル基による親水性 とアクリロ基による疎水性の両方に改質される.従ってN-AAsp処理されたコラーゲンと 両極性を有するボンディング材の親和性が高まる.なお、コラーゲンとN-AAspが水素結 合などの強い相互作用をしていることは、西山ら<sup>20</sup>のコラーゲンモデル化合物とアミノ酸 誘導体であるN-methacryloy glycineを共存させてのカルボキシル基を指標とした緩和 時間測定の結果から推定できる.





 $15 \,\mu$  m



# Fig.20 SEM views of the resin-dentin interface promoted by $$\rm N-AAsp$$

Specimen was immersed in 40%H3PO4 for 10s, and 10%NaOCl for 4-hour prior to ion-sputtering.

3)接着界面のSEM観察

非水洗群および水洗群の接着界面のSEM像(Fig.20)から接着界面に生成されている樹脂 含浸層の構造に違いがあることがわかった.前者は樹脂含浸層全域が緻密な構造であるの に対し,後者はポーラス構造を呈していた.これは、本研究ではSEM観察に先立ち接着 試料の断面をリン酸で脱灰した後、次亜塩素酸ナトリウム水溶液で処理を行ったので、接 着界面に施した処理に対する両群での樹脂含浸層の抗溶解性の違いが現れたためと考えら れた.

水洗群の接着界面は、N-AAsp水溶液処理後に象牙質被着面を水洗、乾燥してボンディ ング材を塗布して重合しており、その接着界面に生成した樹脂含浸層はリン酸水溶液およ び次亜塩素酸ナトリウム水溶液処理もしくは臨界点乾燥時における処理によって溶解、流 出してできたと思われる空隙が層全域に観察できた.この現象は、脱灰被着面層に存在し ていたN-AAspおよびN-AAspとリン酸カルシウムの塩が水洗によってほとんど除去され たためにボンディング材の浸透・拡散性に影響したこと、コラーゲン線維とボンディング 材の親和性が低減して酸素の介在によるボンディング材の未重合部分<sup>3)</sup>ができたことおよ びこれらに伴ってのコラーゲン線維単独領域が生じてのことと考えている.

一方,非水洗群の接着界面には,研削象牙質にN-AAsp水溶液が作用してスミヤー層を 溶解し,基質象牙質表層が脱灰されてコラーゲン線維が露出する.SEM所見および第4章 の結果で明らかなように,この脱灰象牙質層にはN-AAspおよびN-AAspとリン酸カルシ ウムの塩が存在しているため,露出したコラーゲンにはカルボキシル基が-COOHの状態 で存在しているN-AAsp分子が吸着結合する.この様に表面改質されたコラーゲンを主体 とした微細構造にボンディング材が浸透・拡散して,N-AAspおよびN-AAspとリン酸カ ルシウムの塩とともに重合したことで均一な緻密構造となったと考えている.

以上の所見より、N-AAspを主成分とするセルフエッチングプライマーが歯質の脱灰、 ボンディング材の浸透・拡散促進作用だけでなく、樹脂含浸層の組織構造を改質する作用 を有することが明らかになった.

4)エネルギー分散型X線マイクロアナライザー(EDX)による樹脂含浸層の分析

上述したSEM観察と同一の試料における接着界面のEDXによる分析結果をFig.21に示 す.この結果より、水洗群の樹脂含浸層のC元素濃度が非水洗群と比較して低いレベルを 示した.このことは、前述したように後者の層から未重合ボンディング材およびコラーゲ ンが次亜塩素ナトリウム水溶液等によって溶解除去されたためで、接着界面層でのN-AAspの機能発現の重要性を裏付けている.



Fig. 21 Line analysis of resin-dentin interface promoted by N-AAsp

5-4 結論

N-AAsp水溶液処理が接着強さ、樹脂含浸層の生成、および樹脂含浸層の性状に及ぼす 影響について検討した結果、脱灰象牙質におけるN-AAspおよびN-AAsp-リン酸カルシ ウム塩の存在が樹脂含浸層の次亜塩素酸ナトリウム水溶液処理後の構造に大きく影響する ことが明らかになった.

以上の結果より、N-AAspを主成分とするセルフエッチングプライマーが歯質の脱灰、 ボンディング材の浸透・拡散促進作用だけでなく、樹脂含浸層の組織構造を改質する作用 を有することが明らかになった.

## 文献

1) 伊東孝介, 鳥井康弘, 鈴木一臣, 中井宏之, 井上 清: 修復用レジンと歯質との接着-ライナーボンド II の歯質接着性について-, 接着歯学, 12(3), 174-181, 1994

2) 西山典宏, 根本君也, 堀江港三, 鈴木一臣, 中井宏之: コラーゲンと機能性モノマ ーとの相互作用に関する研究 その6<sup>13</sup>C-NMRによる検討, 歯材器, 13(特), 280-281, 1994

3) 若林 元: 増粘剤を添加した有機質溶解剤による新しい象牙質被着面処理ならびに ボンディング材に関する研究, 歯材器, 12(2), 279-294, 1993

## 第6章 総括

歯質と修復用レジンの接着は、修復物の保持、歯髄保護、健全歯質の保全および二次カ リエスの予防などの観点から保存修復において重要な位置を占めている.また近年では臼 歯部においても審美的要求が高まり、コンポジットレジンやセラミック材料によるインレ ー修復が行われるようになって、接着技法が益々拡大されつつある.その背景には、被着 面処理法およびレジン系ボンディング材の発達があるといっても過言ではない.しかし、 咀嚼による繰り返し荷重および熱膨張率の変動を始めとして過酷な口腔環境の他に、接着 界面に発生しているボンディング材の重合収縮に伴う残留応力の存在などは、接着を長期 的に満足させないことが予想できる.

修復用レジンは本来歯質に対して接着性を有しないので、歯質に接着させるためには被 着面処理材およびボンディング材の併用が必須である.現在、各種被着面処理材およびボ ンディング材の開発が盛んに行われているものの、特に簡便な操作性の探求から発展した セルフエッチングプライマーを導入した接着システムは、有機質および水分を多量に含有 し、組織構造が複雑な象牙質への接着において接着性能および接着機構を含めて未だ解決 すべき問題を多く残している.

そこで著者は、上述した接着に関わる諸因子を考慮してアスパラギン酸誘導体を分子設 計して合成し、この化合物と水からなるセルフエッチングプライマーを調製してその象牙 質被着面処理効果および接着機構の解明を試みた. すなわち、アスパラギン酸誘導体は蛋 白構成化合物であって生体親和性が期待でき、さらにpKaの異なるジカルボン酸であるこ とから、その誘導体はセルフエッチングプライマーとしての多機能性を有すことが考えら れる.

まず、第2章においてアスパラギン酸に重合基としてメタクリロ基を付加したNmethacryloyl aspartic acid(N-MAsp)もしくはアクリロ基を付加したN-acryloyl asparatic acid(N-AAsp)を合成した. その基礎物性から、重合基としてアクリロ基を導 入することによってアスパラギン酸誘導体の水への溶解度を増加させることが可能となっ た. 一方、それら誘導体が1分子中にpKaの異なるカルボキシル基を2つ有し、歯質の脱灰 作用、ボンディング材の浸透・拡散作用という複数機能を発現する可能性をみいだした.

第3章においては、合成したN-MAspおよびN-AAspを水に溶解した被着面処理材を調 製し、象牙質を処理したところ、象牙質とボンディング材の接着強さが、5wt%N-MAsp

において10.4MPa, 20wt%N-AAspにおいて16.0MPaの最大引張接着強さが得られた. また,被着面処理材作用後の象牙質面のSEM像から,本処理材による脱灰量が非常に少 ないことおよび接着界面に樹脂含浸層が生成されることが確認された. これらの結果よ り,アスパラギン酸誘導体がセルフエッチングプライマーとしての機能を十分に発揮する ことがわかった.

そこで、本セルフエッチングプライマーの象牙質への作用機構を解明する目的から、よ り良好な機能を発揮したN-AAspを使用して第4および5章では、N-AAsp水溶液の歯質脱 灰作用およびボンディング材の浸透・拡散促進作用の面から解析した.すなわち、N-AAspと第3リン酸カルシウムもしくは牛歯エナメル質粉末を作用させたモデル実験の結 果から、N-AAsp処理歯面上にリン酸カルシウムとN-AAspの塩が生成することがわかっ た.さらに処理面上のN-AAspおよび前述した反応塩の存在がボンディング材の浸透・拡 散にどのような効果があるのかを、樹脂含浸層の性質を酸および蛋白質溶解剤による溶解 抵抗性などから検討した結果、脱灰象牙質にこれらが存在することが樹脂含浸層の組織構 造に大きく影響することが明らかになった.

以上,N-AAspプライマーを用いた接着システムは、まずN-AAspのカルボキシル基が 水溶液中で解離して酸性モノマーとしての機能を発揮し、スミヤー層の除去、基質象牙質 の脱灰を行う.同時にN-AAspおよび脱灰過程において生成したN-AAsp塩が脱灰象牙質 層中に沈着するとともに象牙質表層には未反応のN-AAsp分子が膜状になり吸着する.こ の脱灰象牙質層にボンディング材が浸透・拡散して重合し、樹脂含浸層が形成されたため に高い接着強さを示しており初期の目的を達した.しかし完全な歯質接着を求めるために は、例えば接着界面層(樹脂含浸層)の分子レベルでの組織分析、熱特性および機械的強さ とその安定性さらには唾液、プラークを含む微生物との因果関係などについての解明を行 わなければならない.本研究の成果がこれからの歯科接着科学の新展開に寄与できるもの と考える.

## 謝辞

終えるにあたり、本研究の遂行に終始御指導と御校閲を賜った歯科保存学第一講座井上 清教授に深甚なる謝意を表します.また終始御指導と御鞭撻を賜りました歯科理工学講 座中井宏之前教授,鈴木一臣助教授ならびに本講座鳥井康弘助教授に謹んで感謝の意を表 します.

また本研究におけるNMRの測定に際し、御指導、御協力頂きました日本大学松戸歯学 部歯科理工学講座根本君也教授ならびに西山典宏講師に深く感謝いたします.

さらに本研究に種々御協力下さいました歯科保存学第一講座の諸先生方に対し厚くお礼 申し上げます.

