HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	プラチナナノコロイド象牙質処理が4-META/MMA-TBBレジンのサーマルサイクリング負荷前後の接着に与える影響
Author(s)	五十嵐, 豊; 付, 佳楽; 角田, 晋一; 田中, 享; 中沖, 靖子; 佐野, 英彦
Citation	北海道歯学雑誌, 32(2), 177-192
Issue Date	2012-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/48712
Type	article
File Information	08-igarashi_gencho.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

原　著

プラチナナノコロイド象牙質処理が4-META/MMA-TBBレジンのサーマルサイクリング負荷前後の接着に与える影響

五十嵐　豊　　付　　佳楽　　角田　晋一　　田中　　享　　中沖　靖子　　佐野　英彦

抄　録：本研究は，4-META/MMA-TBBレジンのプラチナナノコロイド（CPN）処理をした象牙質に対するサーマルサイクリング（TC）試験前後での接着強さについて検討することを目的とした．0.5％ クロラミンＴ水溶液に保存されていた18本の健全ヒト抜去智歯を歯冠中央部で切断し，健全な象牙質を露出させた後，#600の耐水研磨紙を用いて研磨したものを被着面とした．Control群として被着面を10％ クエン酸３％ 塩化第二鉄溶液（10-3溶液）でエッチングした．また，10％ CPN群，100％ CPN群として，被着面を10-3溶液でエッチングし，10％または100％のプラチナナノコロイド（アプト，東京）を塗布した．その後，全ての象牙質被着面にスーパーボンド（サンメディカル，滋賀）を用いてPMMAブロックを接着させた．試料は全て１日水中浸漬後に１mm^2の棒状にした．さらに，これらを５℃および55℃の水中に各60秒間浸漬を１サイクルとするTC試験０回群，10,000回群，および20,000回群に分けて行った．TC後の試料は，クロスヘッドスピード１mm/minにて微小引っ張り接着強さを測定した．微小引張り接着強さの測定によって得られた測定値については，Games-Howell検定を用いて有意水準５％にて統計処理を行った．レジンと象牙質の接着界面はSEMとTEMを用いて観察した．

Control群の微小引っ張り強さ（μTBS）は29.3MPa（TC ０回），36.6MPa（TC 10,000回），32.8MPa（TC 20,000回）であった．10％ CPN群のμTBSは30.4MPa（TC 0回），40.3MPa（TC 10,000回），32.1MPa（TC 20,000回）であった．100％ CPN群のμTBSは24.2MPa（TC ０回），12.0MPa（TC 10,000回），10.7MPa（TC 20,000回）であった．Control群と10％ CPN群はTC試験前後で接着強さに有意差は認められなかった．100％ CPN群の接着強さはTC試験後に有意に低下した．接着界面のSEM観察において100％ CPN群ではTC試験後にControl群と10％ CPN群と比べて短いレジンタグが観察された．接着界面のTEM観察では10％ CPN群，および100％ CPN群において，樹脂含浸層の上縁に細かい粒子状構造物の存在が認められた．プラチナナノコロイド表面処理した象牙質接着強さには濃度が影響していると考えられた．

キーワード：4-META/MMA-TBBレジン，象牙質接着，ナノテクノロジー，サーマルサイクリンング，プラチナナノコロイド

緒　　言

ナノテクノロジーは素材，情報技術，生物工学など幅広い分野において根幹技術となって，応用範囲は多岐にわたっている[1]．ナノテクノロジーとはナノメートル（10^{-9}m）のオーダーで原子，分子を操作，制御することによりナノサイズ特有の物質特性等を利用して全く新しい機能を発現させ，科学技術の新たな領域を切り拓き，幅広い産業の技術革新を先導するものである[2]．歯科においてもナノテクノロジーは応用され，コンポジットレジン[3,4]，口腔内インプラント[5]，歯磨材[6]などに応用されている．また，カーボンナノチューブ[7,8]を歯科に応用する研究も盛んに行われ，期待を集めている．

プラチナナノコロイド（Colloidal Platinum Nanoparticles ; CPN）は宮本らによって開発された[9]．プラチナナノコロイドは粒径２nmのプラチナナノ粒子の全周をクエン酸ナトリウムでコーティングすることでコロイド化したもので，活性酸素種（ROS）の強い除去能があり，抗酸化作用が期待されている[9,10]．プラチナナノコロイドは次世代の抗酸化物質として，健康食品や化粧品などに添加され一般に使用されている[11]．さらには，脳梗塞[12]や口腔粘膜疾患[13]の治療に応用するための研究も進んでいる．片岡ら[15]は次亜塩素酸ナトリウムで処理した象牙質に4-META/MMA-TBBレジンを接着させると接着強さが低下するが，

〒060-8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯科保存学教室（主任：佐野英彦 教授）

その後アスコルビン酸処理をすると接着強さが回復すると報告している．そこで，長野ら[14]はアスコルビン酸と同じく還元作用をもつプラチナナノコロイドでも接着強さが回復するのではないかと考え実験を行ったが，次亜塩素酸ナトリウムで処理したヒト象牙質に対して，プラチナナノコロイド処理の有無による有意差は認められなかった．しかしこの実験で思いがけず，ヒト象牙質にプラチナナノコロイドを単独処理することで4-META/MMA-TBBレジンの接着強さが未処理に比べて約２倍高くなることが示された．星加ら[16]はプラチナナノコロイドを象牙質に処理する条件として，プラチナナノコロイド原液を脱イオン水で10倍に希釈した溶液を30秒塗布し，その後20秒水洗したものが最も接着強さが高かったと報告した．さらにプラチナナノ粒子は象牙質処理面に残存し，その量はプラチナナノコロイドの濃度によって変化することを示した[17]．

近年，レジンと象牙質接着界面との劣化が問題となっている[18]．接着性レジンシステムの開発が進み，初期接着強さは著しく改善しているが，長期的には接着強さは低下すると報告されている[19-22]．長期的な接着強さ低下の原因としては，ボンディングレジン成分の溶出やコラーゲン線維の加水分解が考えられている[18,23,24]．象牙質はエッチングによって脱灰し程度の差こそあれコラーゲン線維が露出する．その後，ボンディング処理により脱灰象牙質にレジンが浸透しコラーゲン線維を包み込む．しかし，脱灰象牙質への浸透が不十分な場合，露出したコラーゲン線維が接着界面に残存する．この残存したコラーゲン線維が長期的に加水分解し，接着強さを低下させると言われている[25-27]．また，コラーゲン線維の劣化には象牙質基質から放出されるMatrix Metalloproteinaise（MMP）が関わっているとの報告もある[28,29]．本研究で使用した4-META/MMA-TBBレジンは，時間の経過とともに象牙質との接着強さが低下すると報告されている[30-32]．Kitasakoら[31]はウシ象牙質に4-META/MMA-TBBレジンを用いて光重合型レジンを接着し，水中浸漬後３年では接着強さが有意に低下すると報告した．長期接着耐久性を検討するための試験の一つにはサーマルサイクリング（TC）試験がある[33]．TC試験を行うことで接着強さ，あるいは接着界面の長期的変化を検討することが可能である．

本研究の目的は4-META/MMA-TBBレジンのプラチナナノコロイド処理をした象牙質に対するナノレベルにおけるプラチナナノ粒子の局在と接着強さの長期耐久性についてTC試験を用いて検討することであった．

材料と方法

１．被着歯面の調整

0.5％クロラミンＴ水溶液中に保存した18本の健全ヒト抜去第三大臼歯の咬合面をモデルトリマー（MT-7，モリタ，東京）を用いて平坦にし，健全な象牙質を露出させた後，#600の耐水研磨紙を用いて研磨したものを被着面とした．なお，本研究に使用した抜去歯牙は北海道大学大学院歯学研究科臨床・疫学研究倫理審査委員会に承認された研究計画（承認番号　2010第２号）に従って収集された．

２．試料の製作

今回用いた材料はスーパーボンド（サンメディカル，滋賀）とプラチナナノコロイド（アプト，東京）であり，表１に示す．表面処理操作手順は以下の３通り，すなわちControl群は表面処理材グリーン（10-3水溶液，サンメディカル，滋賀）を５秒塗布後に５秒水洗し乾燥したもの，10％ CPN群は10-3水溶液を５秒塗布後に５秒水洗し乾燥，その後に10％ CPNを30秒塗布し20秒水洗し乾燥したもの，並びに100％ CPN群は10-3水溶液を５秒塗布後に５秒水洗し乾燥，その後に100％ CPNを30秒塗布し20秒水洗し乾燥したものであり，表２に示す．10％ CPNとはプラチナナノコロイド（CPN）原液を脱イオン水で10％に希釈したもの，100％ CPNとはプラチナナノコロイド（CPN）原液のものである．

表２に示す３種の表面処理操作後，スーパーボンドを混和法にて塗布，PMMAブロックを圧接し，６分硬化を待ち，37℃の脱イオン水中で24時間保存した．

表１　本実験に用いた材料

材　料	組　成	製造元	Lot#
スーパーボンド		サンメディカル	
表面処理材（グリーン）	10％クエン酸 ３％塩化第２鉄 水		RT1
クイックモノマー液	５％ 4-META, MMA, dimethacrylate		VF1
キャタリスト	TBB		VF31
ポリマー粉末（混和ティースカラー）	PMMA，顔料		TR4
プラチナナノコロイド	0.02％白金 0.29％クエン酸ナトリウム 99.69％水	アプト	231080821

4-META：4-methacryloxyethyl trimellitate anhydride
MMA：methyl methacrylate
TBB：tri-n-butylborane
PMMA：polymethyl methacrylate

表２　本実験に用いた表面処理操作手順

Control	表面処理材グリーン塗布後放置（５秒），水洗（５秒）後乾燥
10％ CPN	表面処理材グリーン（５秒）塗布，水洗（５秒）後乾燥，10％ CPN塗布後放置（30秒），水洗（20秒）後乾燥
100％ CPN	表面処理材グリーン（５秒）塗布，水洗（５秒）後乾燥，100％ CPN塗布後放置（30秒），水洗（20秒）後乾燥

CPN：colloidal platinum nanoparticles

３．サーマルサイクリング試験

３種の表面処理後に接着操作を行った試料全ては精密低速切断機（Isomet low speed saw，Buehler，USA）を用いて，注水下で１mm×１mmのスティック状に切断した．その後，これらは５℃および55℃の水中に各60秒間浸漬を１サイクルとするサーマルサイクリング（TC）試験０回の群，10,000回の群，および20,000回の群に分けて行われた．なお，TC試験はスティック状試料をPCRチューブ内の脱イオン水中に浸漬し，PCRサーマルサイクラー（Mastercycler gradient，eppendorf，Germany）を用いた．したがって，９群の試料が作製され，各群とも試料は20本であった．

４．微小引張り接着強さの測定

各群15本の試料について，小型卓上試験機（EZ-Test，島津製作所，京都）を用い，クロスヘッドスピード１mm/minにて微小引っ張り接着強さを測定した．微小引張り接着強さの測定によって得られた測定値については，Games-Howell検定を用いて有意水準５％にて統計処理を行った．

５．破断面の走査型電子顕微鏡観察

微小引っ張り試験後の象牙質側の破断面をPt-Pd蒸着（E-1030，日立製作所，東京）し，走査型電子顕微鏡（SEM：S-4000，日立製作所，東京）を用いて加速電圧10kVで観察した．破断面の破壊形態は象牙質とスーパーボンドの界面剥離，スーパーボンドでの凝集破壊，象牙質での凝集破壊，および混合破壊の４種類に分類した．

６．接着界面の走査型電子顕微鏡観察

各群２本の試料をエポキシ樹脂（Epon812，Polysciences，USA）に包埋し，注水下で#600，#800，#1000，#1200，#2000の耐水研磨紙でレジン－象牙質界面と垂直な方向に研磨した．次いで湿潤下で６μm，３μm，１μmのダイヤモンドペースト（DP－Paste，Struers，Denmark）を用いて鏡面研磨し，超音波洗浄した．その後，６mol/lの塩酸に30秒，１％次亜塩素酸ナトリウムに30秒浸漬し，水洗した．これらの試料を室温で乾燥後，Pt-Pd蒸着を行い，走査型電子顕微鏡を用いて加速電圧10kVで観察した．

７．接着界面の透過型電子顕微鏡観察

各群２本の試料を包埋が用意な大きさにするために注水下で#600の耐水研磨紙を用いてトリミングした.その後，pH7.4の2.5％グルタールアルデヒド0.1Mカコジル酸緩衝溶液で６時間固定し，0.1Mカコジル酸溶液で１分ずつ３回洗浄した．次いで，エタノール50％・75％・95％に各10分を２回，100％に10分を３回浸漬して系列脱水を行った．次に，エポキシ樹脂と100％ エタノールを１：１で混ぜたものに試料を入れ，ローテーターで８時間回した後に100％ エポキシ樹脂に３時間浸漬した．その後，ゴム枠の中に試料と100％ エポキシ樹脂を入れ，60℃で48時間加熱した．包埋した試料はダイヤモンドナイフ（Diatome，Switzerland）を使い，ウルトラミクロトーム（Ultracut UCT，Leica Microsystems，Switzerland）を用いて，接着界面に垂直な方向に厚さ約80nmの超薄切を行った．薄切切片は，未脱灰未染色の状態で透過型電子顕微鏡（TEM：H-800，日立製作所，東京）にて加速電圧75kVで接着界面の観察が行われた．

結　　果

１．TC負荷試験後の微小引っ張り接着強さ

微小引っ張り接着試験の測定結果を図１に示す．TC ０回の条件下では，Control群の接着強さが29.3MPa，10％ CPN群は30.4MPa，100％ CPN群は24.2MPa，と接着強さに有意差は認められなかった．また，TC10,000回の条件下ではControl群の接着強さが36.6MPa，10％ CPN群は40.3MPa，100 ％ CPN群 は12.0MPaと100 ％ CPN群 が，Control群と10％ CPN群に比べ有意に低かった．TC20,000回の条件下ではControl群の接着強さが32.8MPa，10％ CPN群は32.1MPa，100％ CPN群は10.7MPaと100％ CPN群がControl，10％ CPN群に比べ有意に低かった．

Control群，10％ CPN群ではTC負荷試験後の接着強さに有意差は認められなかった．100％ CPN群ではTC負荷試験後に接着強さが有意に低下した．

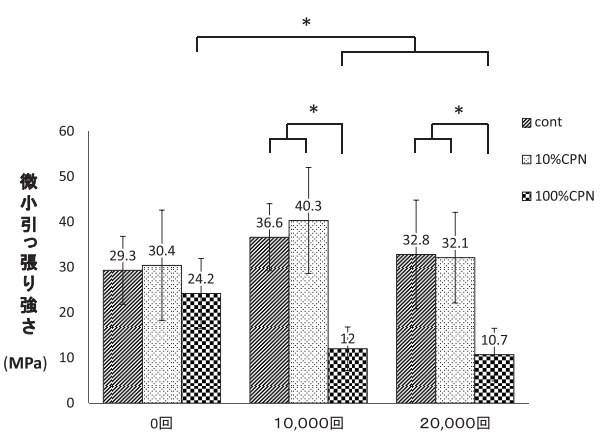

図１　TC負荷試験後の微小引っ張り接着強さ

TC10，000回，TC20，000回において100％ CPN群はコントロール群および10％ CPN群に比べ有意に接着強さを示した．

＊は２群間の有意差を示す．（Games-Howell検定，$p<0.05$）

２．破断面のSEM観察

微小引っ張り接着試験後のSEM観察による破断面の分類を図２に示す．Adは象牙質とスーパーボンドの界面剥離，CoSBはスーパーボンドでの凝集破壊，CoDは象牙質での凝集破壊，並びにMixは混合破壊とした．また，破断

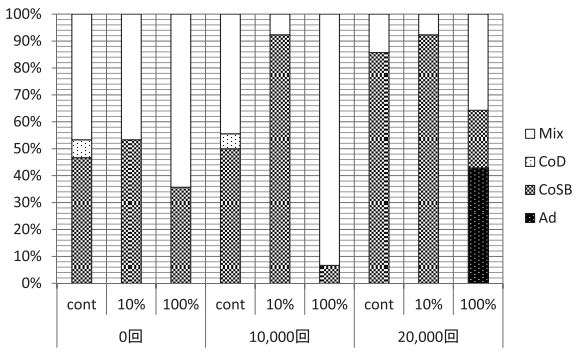

図２　微小引っ張り接着強さ試験後の破断面の分類
象牙質とスーパーボンドの界面剥離をAd，スーパーボンドでの凝集破壊をCoSB，象牙質での凝集破壊をCoD，混合破壊をMixとした．

面の典型的な状態を図３に示す．

TC ０回の条件下ではControl群，10％ CPN群ともにCoSBとMixが同程度で圧倒的に多く観察された．100％ CPN群では混合破壊が最も多く，次いでスーパーボンド凝集破壊が観察された．TC10,000回の条件下ではControl群で，ほとんどがCoSBとMixで，これらは同程度に観察された．10％ CPN群では，ほとんどにおいてCoSBが観察された．100％ CPN群ではMixが最も多く観察された．TC20,000回の条件下ではControl群，10％ CPN群でCoSBの割合が最も多く観察された．100％ CPN群ではAd，Mixが同程度に多く観察された．

３．接着界面のSEM観察

図４にTC ０回条件下の接着界面におけるSEM像を示す．図４a，bはControl群，図４c，dは10％ CPN群，図４e，fは100％ CPN群である．Dは象牙質，Rはレジン（スーパーボンド），HLは樹脂含浸層である．全ての群で，レジンタグが象牙細管内に入り込んでいる像が観察された．Control群に比べ10％ CPN群，100％ CPN群ではレジンタグは長く観察された（図４a，c，e）．レジンタグの太さに各群大きな差異はなかった．樹脂含浸層は各群とも約２－３μmであり，顕著な差異は観察されなかった（図４b，d，f）．

図５にTC10,000回の接着界面におけるSEM像を示す．図５a，bはControl群，図５c，dは10％ CPN群，図５e，fは100％ CPN群である．Control群，10％ CPN群に比べ100％ CPN群はレジンタグが短く観察された（図５a，c，e）．また，10％ CPN群ではレジンタグの中に空洞が見られる部位が観察された（図５d）．樹脂含浸層の厚みは約２-３μmで各群に差異は観察されなかった（図５b，d，f）．

図６にTC20,000回の接着界面におけるSEM像を示す．図６a，bはControl群，図６c，dは10％ CPN群，図６e，fは100％ CPN群である．レジンタグはControl群と10％ CPN群に比べて100％ CPN群では少なく，さらに短かった（図６a，c，e）．また，10％ CPN群ではレジンタグの中に空洞が見られ，この空洞が見られる部位はTC10,000回の10％ CPN群と比べて多く観察された（図６d）．樹脂含浸層の厚みは各群２-３μmで変わらなかった（図６b，d，f）．10％ CPN群と100％ CPN群では接着界面近くのスーパーボンドに亀裂が観察された（図６d，f）．

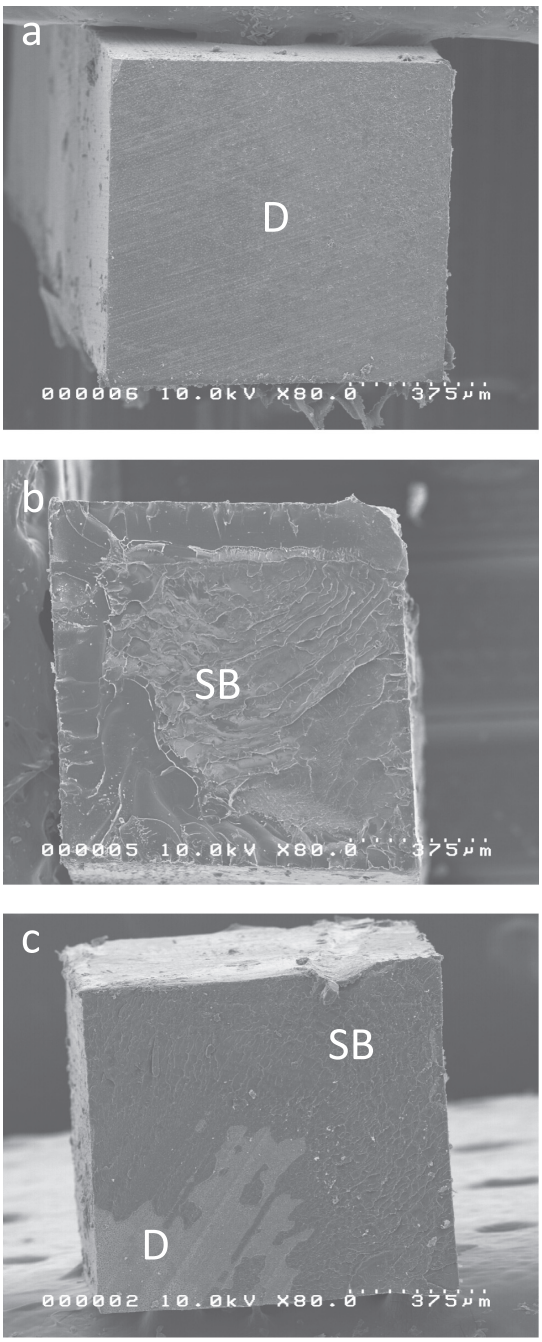

図３　微小引っ張り接着強さ試験後の典型的な象牙質側破断面写真
a：象牙質/スーパーボンド間の界面剥離（Ad）b：スーパーボンドでの凝集破壊（CoSB）c：混合破壊（Mix）．D：界面剥離部分，SB：スーパーボンドでの凝集破壊部分を示す．

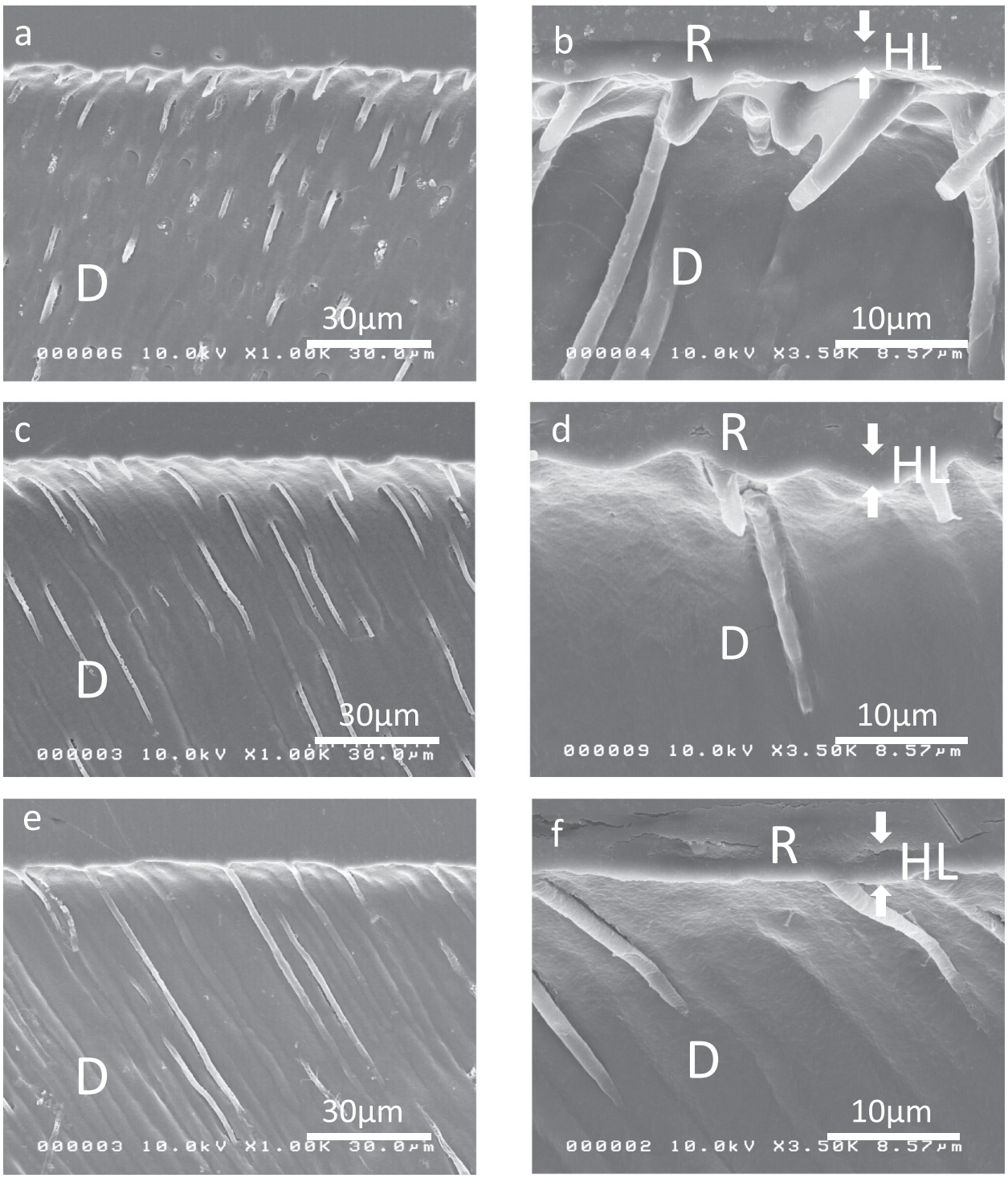

図４　TC ０回の接着界面のSEM像

(a), (b) Control, (c), (d) 10% CPN, (e), (f) 100% CPN. (a), (c), (e) ではレジンタグが象牙細管内に入り込んでいるのが観察され，(b), (d), (f) では約２μmの樹脂含浸層が観察された．D：象牙質，R：レジン（スーパーボンド），HL：樹脂含浸層.

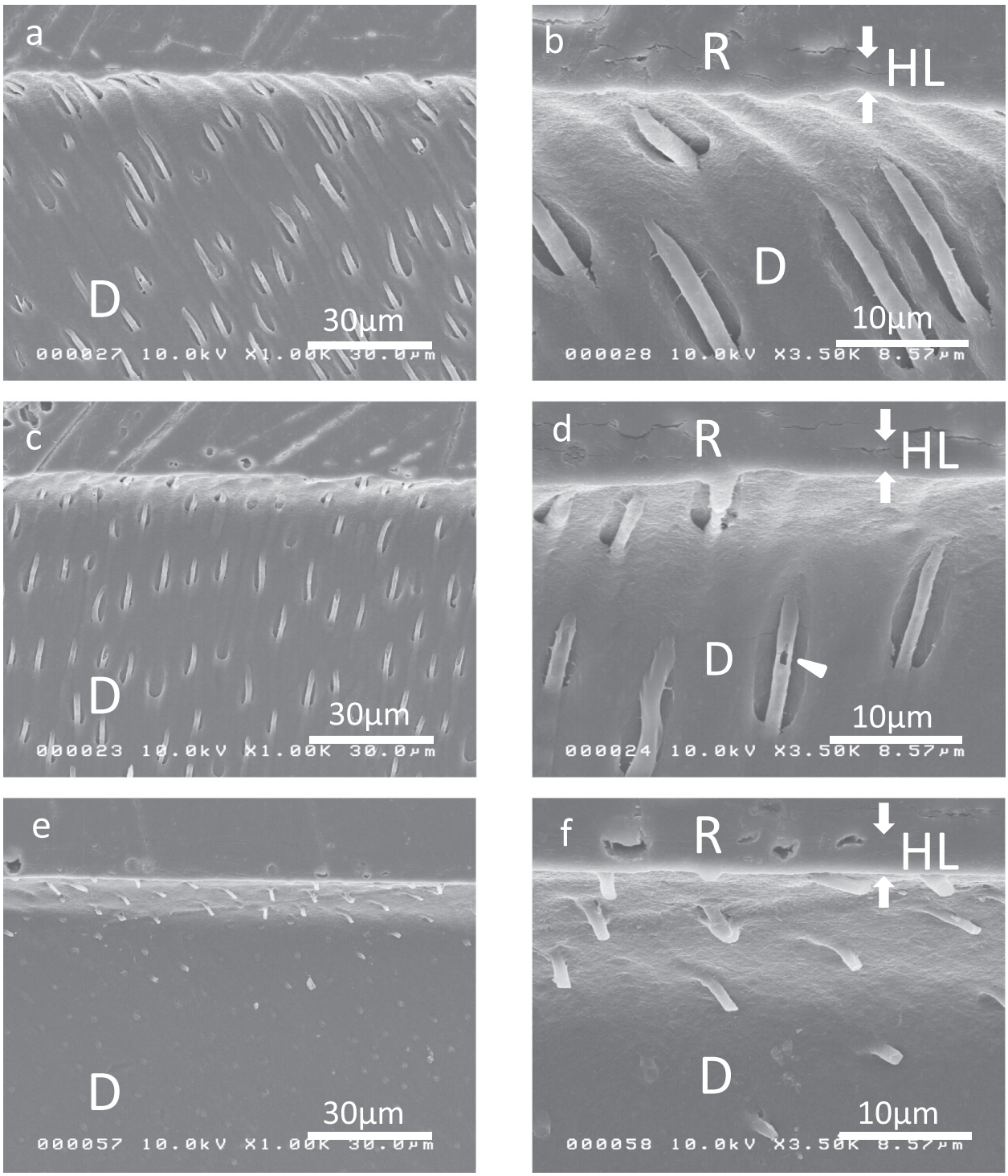

図５　TC10,000回の接着界面のSEM像

(a), (b) Control, (c), (d) 10% CPN, (e), (f) 100% CPN. (a), (c), (e) ではレジンタグが象牙細管内に入り込んでいるのが観察され, (b), (d), (f) では約２μmの樹脂含浸層が観察された. (e)では(a), (c) に比べレジンタグが短く観察された. (d) ではレジンタグの中に空洞（三角形で示した.）が見られる部位があった. D：象牙質, R：レジン（スーパーボンド）, HL：樹脂含浸層.

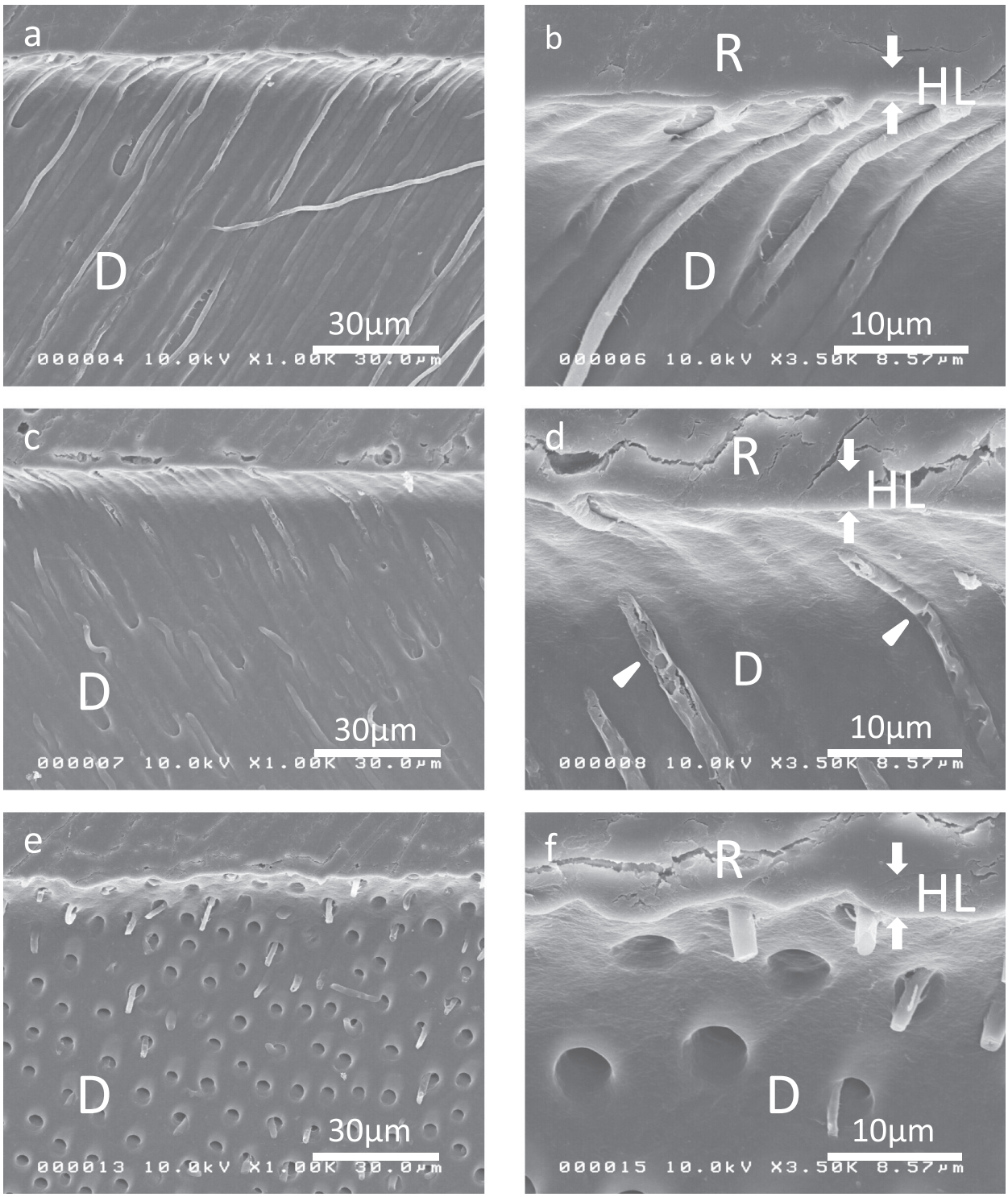

図６　TC20,000回の接着界面のSEM像

(a), (b) Control, (c), (d) 10% CPN, (e), (f) 100% CPN. (a), (c), (e) ではレジンタグが象牙細管内に入り込んでいるのが観察され, (b), (d), (f) では約２μmの樹脂含浸層が観察された. (e) では(a), (c) に比べレジンタグが短く観察された. (d) ではTC10,000回に比べてレジンタグの中に見られる空洞（三角形で示した.）の部位は多く観察された. D：象牙質, R：レジン（スーパーボンド）, HL：樹脂含浸層.

４．接着界面のTEM観察

図７にTC ０回の条件下における接着界面のTEM像を示す．図７a，bはControl群，図７c，dは10% CPN群，図７e，fは100% CPN群である．２万倍（図７a，c，e）では画面の上から電子密度の低い層，電子密度が中程度である層，並びに電子密度の高い層の３層にはっきりと分かれていた．電子密度の低い層はレジン（スーパーボンド），電子密度の低い層と電子密度が中程度である層との間は接着界面，電子密度が中程度である層は樹脂含浸層，電子密度が高い層はコラーゲン線維とハイドロキシアパタイトからなる健全象牙質である．電子密度が中程度である層には全体にむらが見られた．５万倍の写真（図７a，c，e）では電子密度が中程度である層と電子密度が高い層との間に針状結晶（ハイドロキシアパタイト）が散在しているのが見られた．これらに加えて，10% CPNでは電子密度が中程度である層の上縁に沿って，細かい粒子状構造物（直径約４-10nm）から構成されている電子密度の高い10-20nmの層が見られた（図７d）．また，100% CPNでは電子密度の高い層が存在することは10% CPNの場合と同じであったが，細かい粒子状構造物の数は10% CPNよりも多く見られた（図７f）．

図８にTC10,000回の接着界面のTEM像を示す．図８a，bはControl群，図８c，dは10% CPN群，図８e，fは100% CPN群である．Control群の５万倍では，接着界面下の電子密度が中程度である層は１μmであった．また，ハイドロキシアパタイトの散在状態はTC ０回のコントロールと比べ，大きな差異は見られなかった（図８b）．10% CPNと100% CPNの強拡大では，接着界面下の電子密度が中程度である層は0.6μmであった．また，電子密度が中程度である層の上縁に沿って見られる細かい粒子状構造物の存在する幅及び数はTC ０回と同じ傾向であった（図８d，f）．TC10,000回の全ての群でTC ０回に比べて電子密度が中程度である層に見られるむらの濃淡は大きくなった．

図９にTC20,000回の接着界面のTEM像を示す．図９a，bはControl群，図９c，dは10% CPN群，図９e，fは100% CPN群である．Control群ではTC ０回やTC10,000回のControl群と同じくハイドロキシアパタイトの散在が見られた．さらに，５万倍の写真では，接着界面下の電子密度が中程度である層は１μmであった（図９b）．10% CPN群と100% CPN群の強拡大では，電子密度が中程度である層は0.6μmであった．また，電子密度が中程度である層の上縁に沿って見られる細かい粒子状構造物の存在する幅及び数はTC ０回と同じ傾向であった（図９d，f）．10% CPN群ではControl群と100% CPN群に比べて散在しているハイドロキシアパタイトは多く見られた（図９d）．

TC20,000回の全ての群でTC ０回に比べて電子密度が中程度である層に見られるむらの濃淡は大きくなり，かつ健全象牙質側に電子密度の低い部位が増加していた（図９b，d，f）．

考　　察

プラチナナノコロイドを象牙質に処理することで4-META/MMA-TBBレジンと象牙質との接着強さが高くなると報告されている[14,17,34,35]．このプラチナナノコロイド処理による接着強さ上昇の理由としては，白金の触媒作用によりレジンの重合率が向上した可能性が考えられている[14]．しかし，これまでの接着強さは試料を24時間37℃の水中に保存した後に測定された値であり，長期的な接着強さの変化については報告されていない．そこで本研究では劣化加速試験であるサーマルサイクリング試験を行って，4-META/MMA-TBBレジンのプラチナナノコロイド処理をした象牙質に対する接着強さの長期耐久性について検討した．

これまで，4-META/MMA-TBBレジンの象牙質に対する接着強さの長期耐久性についてはいくつかの報告がある[30-32,36]．清村[30]はウシ象牙質に4-META/MMA-TBBレジンを用いてPMMAブロックを接着し，水中浸漬した条件で１年経過後に約60%接着強さが低下すると報告した．清村と同じく劣化加速試験でない実験として，MF. Burrowら[36]はウシ象牙質にスーパーボンドD-linerを用いて光重合型コンポジットレジンを接着し，その後水中浸漬した条件で１年経過後も引っ張り接着強さに有意な変化は見られなかったと報告した．Aokiら[32]はウシ象牙質にスーパーボンドC&Bを用いて光重合型コンポジットレジンを接着し，その後水中浸漬した条件で10年経過後に約70%接着強さが低下すると報告した．本研究と同じく劣化加速試験である実験としては，中田らの実験がある．中田ら[37]はスーパーボンドC&B，およびその他のレジンセメントを用い，健全ヒト抜去大臼歯の歯冠部象牙質とシランカップリング処理を施したコア用レジンブロックを接着させた．その後，１日水中浸漬し，５℃と55℃に各30秒を１サイクルとするTC試験を行った．TC試験後のスーパーボンドC&Bで接着した群の微小引っ張り接着試験では，10,000回で有意に接着強さが低下したと報告されている．清村，MF.Burrowら，およびAokiらの実験と本実験とでは，ウシ，ヒト歯の違いの他に接着時の歯髄の状況や，劣化加速試験である場合とない場合の違い等，異なる条件が多いので比較は難しい．中田らとの実験と比較すると，今回の実験ではTC10,000回，TC20,000回の負荷をかけた後もControl群では引っ張り強さの低下は見られなかった．この理由としては，本研究のTC試験では５℃と55℃に各60秒を１サイクルとしたことで，中田らの実験より55℃である時間が長くなり，レジンの重合率が向上した可能性が考えられる．

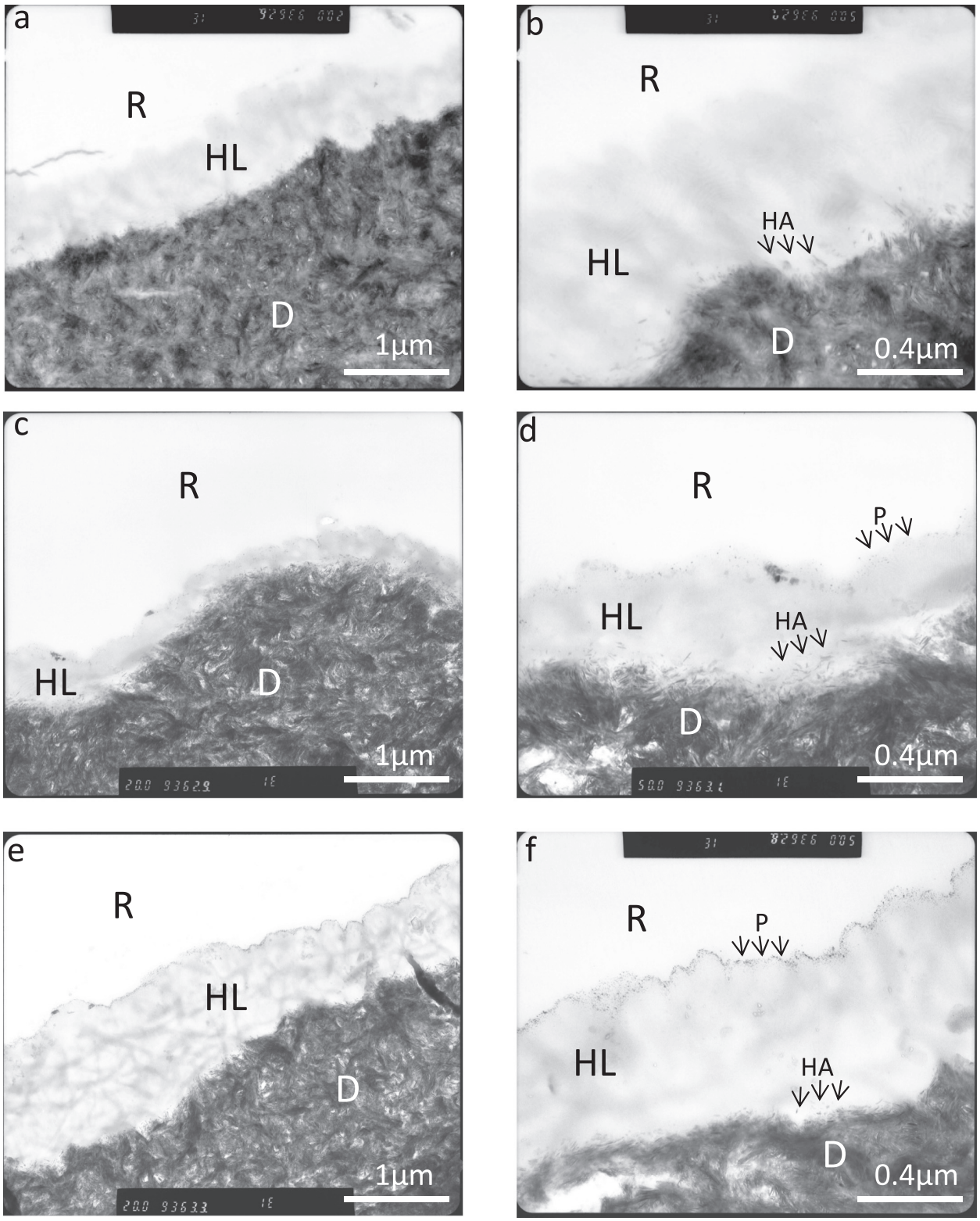

図7　TC 0回の接着界面のTEM像

未脱灰未染色の試料．象牙質と4-META/MMA-TBBレジンの接着界面を観察した．(a)，(b) Control，(c)，(d) 10% CPN，(e)，(f) 100% CPN．(c)，(d)，(e)，(f) において樹脂含浸層（HL）の上縁に沿って，細かい粒子状構造物（P）から構成されている電子密度の高い層が見られた．なお，弱拡大と強拡大の部位は対応していない．D：象牙質，R：レジン（スーパーボンド），HL：樹脂含浸層，P：粒子状構造物．HA：ハイドロキシアパタイト結晶

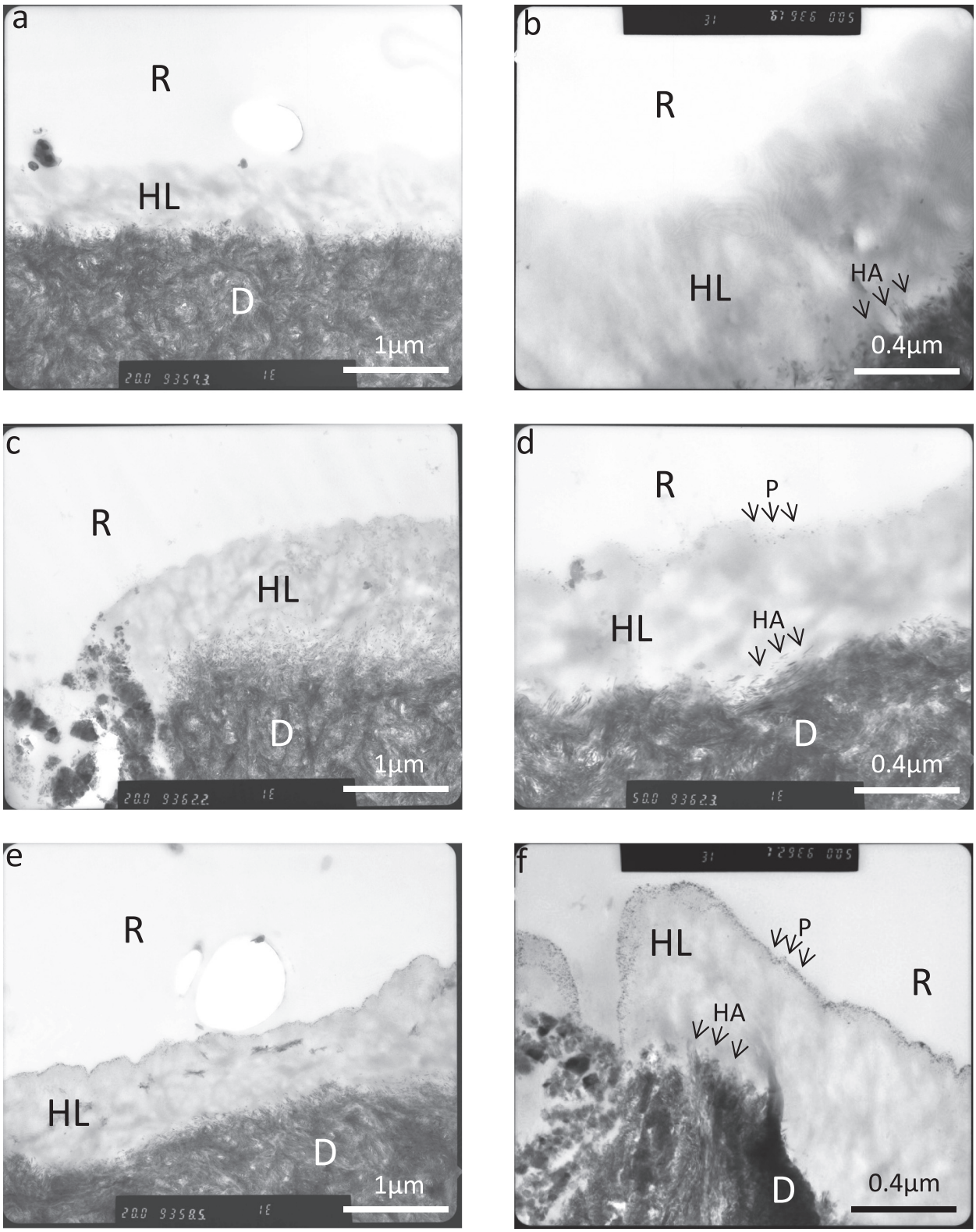

図８　TC10,000回の接着界面のTEM像

未脱灰未染色の試料．象牙質と4-META/MMA-TBBレジンの接着界面を観察した．(a)，(b) Control，(c)，(d) 10％ CPN，(e)，(f) 100％ CPN．(c)，(d)，(e)，(f)において樹脂含浸層（HL）の上縁に沿って，細かい粒子状構造物（P）から構成されている電子密度の高い層が見られた．TC ０回に比べて樹脂含浸層(HL)に見られるむらの濃淡は大きくなった．なお，弱拡大と強拡大の部位は対応していない．D：象牙質，R：レジン（スーパーボンド），HL：樹脂含浸層，P：粒子状構造物．HA：ハイドロキシアパタイト結晶

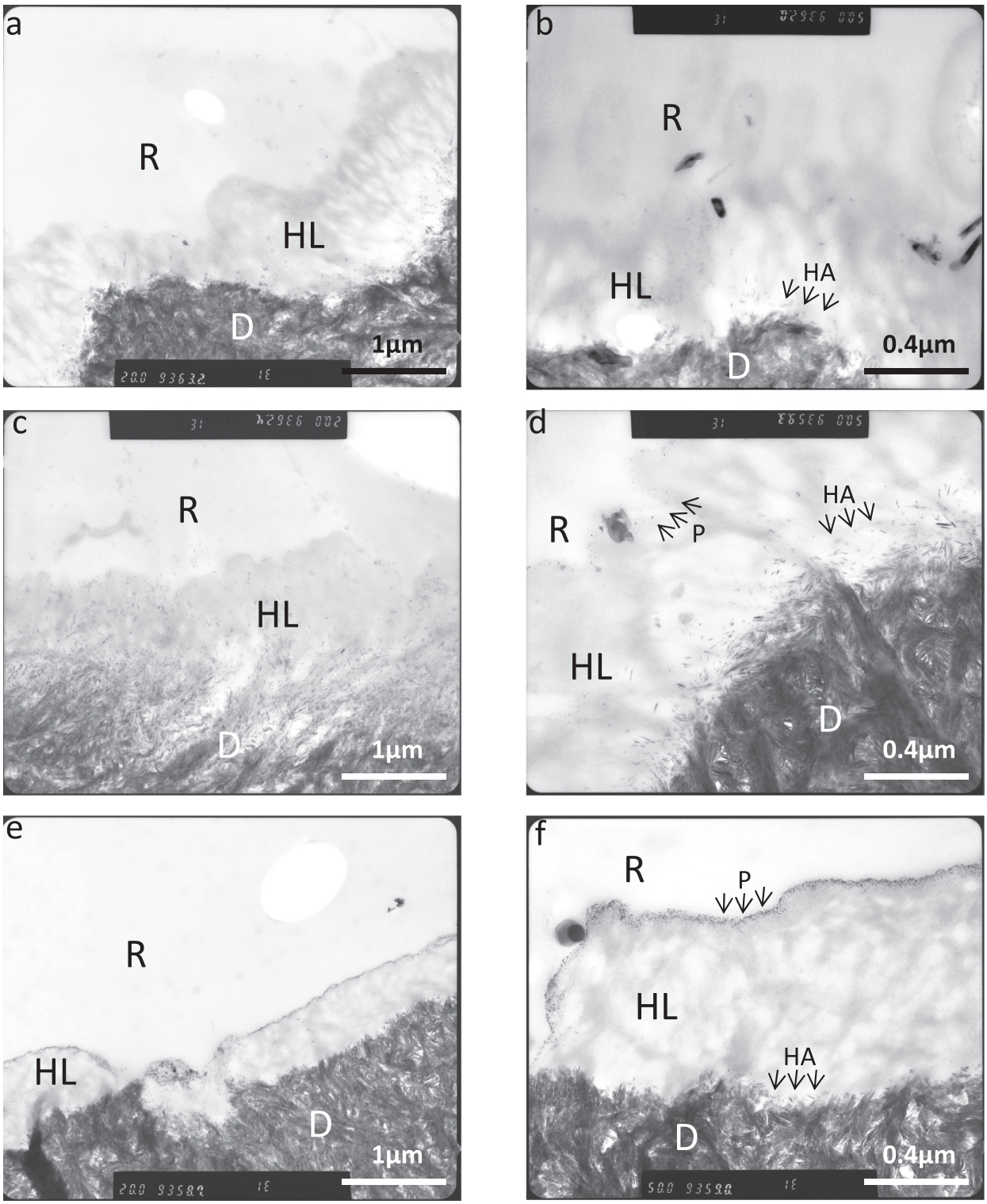

図９　TC20,000回の接着界面のTEM像

未脱灰未染色の試料．象牙質と4-META/MMA-TBBレジンの接着界面を観察した．(a)，(b) Control，(c)，(d) 10％ CPN，(e)，(f) 100％ CPN．(c)，(d)，(e)，(f)において樹脂含浸層（HL）の上縁に沿って，細かい粒子状構造物（P）から構成されている電子密度の高い層が見られた．TC ０回に比べて樹脂含浸層（HL）に見られるむらの濃淡は大きくなり，かつ健全象牙質側(D)に電子密度の低い部位が増加した．なお，弱拡大と強拡大の部位は対応していない．D：象牙質，R：レジン（スーパーボンド），HL：樹脂含浸層，P：粒子状構造物．HA：ハイドロキシアパタイト結晶

微小引っ張り接着強さ試験後の破断面の分類においては，TC 0回，TC10,000回ではCoSBとMixが同程度に多く見られ，TC20,000回では，ほとんどにおいてCoSBが見られた．4-META/MMA-TBBレジンの象牙質に対する接着では加水分解により接着界面が劣化すると，微小引っ張り接着強さ試験後の破断面は界面剥離が多くなると言われている[30]．今回の実験のTC10,000回，TC20,000回の条件下におけるControl群では接着界面の界面剥離が起らなかったことから，接着界面付近の劣化はそれほど進んでいないと考えられる．

プラチナナノコロイドを象牙質面に処理することで4-META/MMA-TBBレジンの象牙質に対する接着強さが著しく向上するということが報告されてきた[14,17,34,35]が，今回の実験ではそのような接着強さの変化は見られなかった．術者の違いにより異なる結果が得られた例としては，川本ら[38]の実験やSanoら[39]の実験がある．川本らは臨床経験が異なる術者がシングルステップボンディングシステムを用いた象牙質接着強さに及ぼす影響を検討し，術者の違いによって接着強さに差が生じることを示した．Sanoらは歯科医師と歯科学生という術者の違いが２ステップボンディングシステム，および３ステップボンディングシステムを用いた象牙質接着強さに与える影響を検討した．結果として，３ステップボンディングシステムの引っ張り強さにおいて歯科医師と歯科学生の間に有意に差が見られたと報告された．一方，星加ら[40]は，プラチナナノコロイドを象牙質処理した後の水洗時間が与える影響を検討した．その中で水洗時間によって接着強さが変化することを示した．このことから，水洗に関して水量，水勢が変われば象牙質表面に残るプラチナナノ粒子の量や場所や深さに変化が起こる可能性が考えられる．また，長野ら[14]の実験と本実験の違いとしてクイックモノマーと混和ティースカラーを使用したことが挙げられる．以上のことよりプラチナノコロイドを処理した象牙質に対する接着強さに変化が見られなかった要因として，術者の違いや水洗時における何らかの違い，並びに使用材料の違いが影響した可能性がある．

100％ CPN群では，TC負荷試験前後で接着強さが有意に低下した．しかし，10％ CPN群ではControl群と同じく，TC負荷試験前後での接着強さにおける変化がそれほどなかった．また，100％ CPN群ではTCの回数が増加するにつれて界面剥離が観察されるようになったが，10％ CPN群では界面剥離像は認められなかった．以上より100％ CPN処理群はControl群，および10％ CPN群に比べて長期接着耐久性が低下することが示唆された．

接着界面のSEM観察において，TC 0回（図４）の条件下ではControl群に比べ10％ CPN群と100％ CPN群ではレジンタグが長く観察された．これは過去の報告と一致する[14,17,34,35]．しかし，TC10,000回（図５）の条件下では10％ CPN群ではレジンタグ中に空洞がみられ，TC20,000回（図６）の条件下ではその空洞はさらに多くなった．また，同じくTC20,000回の100％ CPN群においてはControl群と10％ CPN群に比べてTC試験後のレジンタグは短かった．TC 0回の結果からは，プラチナナノコロイドは，4-META/MMA-TBBレジンの象牙細管への浸透を助長する働きがあると推測される．長期を模しているTC10,000回およびTC20,000回の結果からはプラチナナノコロイドがレジンタグの形態を変化させることが予想される．TC20,000回の条件下では10％ CPN群と100％ CPN群において，接着界面近くのレジンに亀裂が観察された．この現象は，SEM試料作製時の乾燥によるひずみの影響で接着の弱い部分に亀裂が起ったものと推測される．この理由としては，長期水中にあって樹脂含浸層とレジンの間における接着界面が脆弱になった可能性が考えられる[30,32]．なお，4-META/MMA-TBBレジンの象牙質接着に重要な樹脂含浸層はプラチナナノコロイドの濃度に関係なく，ほぼ一定の厚みだった．SEM観察では樹脂含浸層の形態に違いは認められなかった．

今までの報告では，使用された接着システムによって接着界面のTEM像には違いが見られると言われている[41]．従来の３ステップシステムあるいは２ステップのウェットボンディングシステムではリン酸処理により象牙質被着面を脱灰している．２ステップセルフエッチングシステムでは酸性機能性モノマーを含むセルフエッチングプライマーが用いられ，被着面の脱灰深さはリン酸処理に比べ浅くなる．リン酸処理では樹脂含浸層にハイドロキシアパタイトは観察されないが，セルフエッチングプライマー処理では脱灰されずに残ったハイドロキシアパタイトが樹脂含浸層中に観察される．さらに，近年のシングルステップ接着システムは脱灰深さによって，３グループに分けられる．ひとつはリン酸処理並の深さまで脱灰するグループである．二つめには中程度の脱灰深さのもので，樹脂含浸層中にはハイドロキシアパタイトが見られるグループである．ちなみにこのグループは表層の組成が連続的，および段階的に変化するグループで２ステップセルフエッチングシステムと同程度の脱灰深さである．三つめは歯質脱灰程度が極めて低いためにNano-Interaction Zone（NIZ）と呼ばれる層によって接着するとされているグループである．本実験のTEM像では，全ての群で樹脂含浸層の幅は0.6μmから１μmであり，樹脂含浸層の底部にはハイドロキシアパタイトが散在しているのが観察された．このことから，10-3溶液による象牙質の脱灰の程度は２ステップセルフエッチングシステム，もしくはシングルステップ接着システムの中で，中程度から高度であるものと同程度であると考えられる．

10％ CPN群のTEM像では樹脂含浸層の上縁に沿って，細かい粒子状構造物（直径約4-10nm）から構成されている電子密度の高い10-20nmの層（図７－９d）が見られた．

さらに，100% CPN群では観察される細かい粒子状構造物（直径約４-10nm）の数が増えた（図７－９f）．加えて，X線光電子分光分析（XPS）による表面状態の分析によって，4-META/MMA-TBBレジンの象牙質接着の際にプラチナナノ粒子が象牙質処理面に残存していると報告されている[17,35,42]．これらのことから，この細かい粒子状構造物（直径約４-10nm）はプラチナナノコロイド由来である可能性が高く，象牙質処理面に残存する粒子状構造物の量は，塗布するプラチナナノコロイドの濃度によって違いが見られることが示唆された．

また，樹脂含浸層には電子密度のむらが見られたが，プラチナナノコロイドの濃度に関係なくTC回数が増えるにつれて，むらの濃淡は大きくなり，かつ健全象牙質側に電子密度の低い部位が増加した．象牙質とレジンの接着における劣化の重要な原因の一つに，樹脂含浸層中のコラーゲンの加水分解が挙げられている[18,43]．清村[30]は4-META/MMA-TBBレジンをウシ象牙質へ接着した実験で，長期水中浸漬することによりコラーゲンの変性，膨化がすすみ，樹脂含浸層に脆弱な部分が形成されたと報告している．今回の実験でも樹脂含浸層の電子密度のむらの濃淡が大きくなったことは樹脂含浸層の劣化を示している可能性が考えられる．

本研究の結果から，接着耐久性にはプラチナナノコロイドの濃度が影響していることが示唆された．今後は10%プラチナナノコロイド処理における，20,000回よりさらに多いTC回数での接着強さの変化，並びに，他の濃度での接着耐久性を調べる必要がある．また，前述した水洗方法の再現性を高める必要もある．

接着界面のTEM像によりプラチナナノ粒子が樹脂含浸層の上縁のみに局在することが認められた．前処理時の方法を工夫することでプラチナナノ粒子の散在パターンを変え得る可能性もある．その場合には本研究の課題でもある長期接着耐久性が飛躍的に伸びることも期待できよう．

結　　論

プラチナナノコロイド象牙質処理が4-META/MMA-TBBレジンのサーマルサイクリング負荷前後の接着に与える影響を検討し，以下の結論を得た．

1．プラチナナノコロイドを処理した場合の接着界面において，プラチナナノ粒子が樹脂含浸層の上縁のみに局在することが示された．
2．プラチナナノコロイドで処理した象牙質と4-META/MMA-TBBレジンの接着耐久性にはプラチナナノコロイドの濃度が影響していることが示唆された．

謝　　辞

本稿を終えるにあたり，本研究に多大なるご支援とご協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯科保存学教室の諸先生方，また，材料の提供ならびに研究に関する助言を頂きましたサンメディカル株式会社に深く感謝致します．

参　考　文　献

1）Roco MC, Bainbridge WS : Societal implications of nanoscience and nanotechnology : Maximizing human benefit. J Nanoparticle Res 7 : 1-13, 2005.
2）文部科学省：第２期科学技術基本計画, 第２章１－２, 2001.
3）Mitra SB, Wu D, Holmes BN : An application of nanotechnology in advanced dental materials. J Am Dent Assoc 134 : 1382-1390, 2003.
4）Ernst CP, Brandenbusch M, Meyer G, Canbek K, Gottschalk F, Willershausen B : Two-year clinical performance of a nanofiller vs a fine-particle hybrid resin composite. Clin Oral Investig 10 ; 119-125, 2006.
5）Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF : Advancing dental implant surface technology -from micron- to nanotopography. Biomaterials 29 : 3822-35, 2008.
6）Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM : Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. J Dent 39 : 430-437, 2011.
7）Hirata E, Uo M, Nodasaka Y, Takita H, Ushijima N, Akasaka T, Watari F, Yokoyama A : 3D collagen scaffolds coated with multiwalled carbon nanotubes : initial cell attachment to internal surface. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 93 : 544-550, 2010.
8）Hirata E, Uo M, Nodasaka Y, Takita H, Akasaka T, Watari F, Yokoyama A : Multiwalled carbon nanotube-coating of 3D collagen scaffolds for bone tissue engineerring. Carbon 49 : 3284-3291, 2011.
9）Kajita M, Hikosaka K, Iitsuka M, Kanayama A, Toshima N, Miyamoto Y : Platinum nanoparticle is a useful scavenjer of superoxide anion and hydrogen peroxide. Free Radic Res : 615-626, 2007.
10）Watanabe A, Kajita M, Kim J, Kanayama A, Takahashi K, Mashino T, Miyamoto Y : In vitro free radical scavenging activity of platinum nanoparticles. Nanotechnology 20 : 455105, 2009.
11）高橋卓也，宮本有正：プラチナナノコロイドを用いたスキンケア治療－第２報－．日美容外会誌　44 : 21-21，2007.
12）Takamiya M, Miyamoto Y, Yamashita T, Deguchi K, Ohta Y, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K : Neurological and pathological improvements of cerebral infarction

in mice with platinum nanoparticles. J Neurosci Res 89 : 1125-1133, 2011.

13）長尾清香，佐藤拓也，加藤伸一，チェン・リ，宮本有正：白金ナノコロイドによる過酸化水素由来細胞障害性の抑制．日口腔粘膜会誌　15：29-36，2009.

14）長野二三，星加修平，田中　享，佐野英彦：4-META/MMA-TBBレジンの象牙質接着に対する次亜塩素酸ナトリウムとプラチナナノコロイドの影響．北海道歯誌　29：181-196，2008.

15）片岡博樹，吉岡隆知，須田英明，今井庸二：4-META/MMA-TBBレジンの象牙質接着に及ぼす次亜塩素酸ナトリウムの影響．日歯保誌　42：241-247，1999.

16）星加修平，安本　恵，長野二三，田中　享，佐野英彦：ナノテクノロジーを用いたTotal etching systemの接着性能改良の試み：白金ナノコロイド処理による象牙質接着への影響．接着歯学　27：84-88，2009.

17）Hoshika S, Nagano F, Tanaka T, Wada T, Asakura K, Koshiro K, Selimovic D, Miyamoto Y, Sidhu SK, Sano H : Expansion of Nanotechnology for Dentistry : Effect of Colloidal Platinum Nanoparticles on Dentin Adhesion Mediated by 4-META/MMA-TBB. J Adhes Dent 13 : 2011.

18）Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, Pashley DH : Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. J Dent Res 78 : 906-911, 1999.

19）Inoue S, Koshiro K, Yoshida Y, De Munck J, Nagakane K, Suzuki K, Sano H, Van Meerbeek B : Hydrolytic stability of self-etch adhesives bonded to dentin. J Dent Res 84 : 1160-1164, 2005.

20）Hashimoto M, Fujita S, Kaga M, Yawaka Y : In vitro durability of one-bottle resin adhesives bonded to dentin.Dent Mater J 26 : 677-686, 2007.

21）Hashimoto M, Fujita S, Nagano F, Ohno H, Endo K : Ten-years degradation of resin-dentin bonds. Eur J Oral Sci 118 : 404-410, 2010.

22）Fukuoka A, Koshiro K, Inoue S, Yoshida Y, Tanaka T, Ikeda T, Suzuki K, Sano H, Meerbeek BV : Hydrolytic stability of one-step self-etching adhesives bonded to dentin. J Adhes Dent 13 : 243-248, 2011.

23）Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y, Oguchi H, Araki Y, Kubota M : Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage.J Biomed Mater Res 63 : 306-311, 2002.

24）De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G : Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. J Dent Res 82 : 136-140, 2003.

25）Nakabayashi N, Watanabe A, Arao T : A tensile test to facilitate identification of defects in dentine bonded specimens. J Dent 26 : 379-385, 1998.

26）Wang Y, Spencer P : Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. J Dent Res 82 : 141-145, 2003.

27）Schulze KA, Oliveira SA, Wilson RS, Gansky SA, Marshall GW, Marshall SJ : Effect of hydration variability on hybrid layer properties of a self-etching versus an acid-etching system. Biomaterials 26 : 1011-1018, 2005.

28）Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S : Collagen degradation by host-derived enzymes during aging.J Dent Res 83 : 216-221, 2004.

29）Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Uchiyama T, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Thompson JM, McCracken CE, Looney SW, Tay FR, Pashley DH : Inhibition of MMPs by alcohols. Dent Mater 27 : 926-933, 2011.

30）清村正弥：4-META/MMA-TBB系レジンのウシ象牙質への接着－長期安定性と水との影響－. 歯材器　6：860-872，1987.

31）Kitasako Y, Burrow MF, Nikaido T, Tagami J : Long-term tensile bond durability of two different 4-META containing resin cements to dentin. Dent Mater 18 : 276-280, 2002.

32）Aoki K, Kitasako Y, Ichinose S, Burrow MF, Ariyoshi M, Nikaido T, Tagami J : Ten-year observation of dentin bonding durability of 4-META/MMA-TBB resin cement -a SEM and TEM study. Dent Mater J 30 : 438-47, 2011.

33）Nakata T, Fujita M, Nagano F, Noda M, Sano H : Effect of a new thermal cycling method on bond strength of two-step self-etching adhesive systems. Dent Mater J 26 : 635-641, 2007.

34）Nagano F, Selimovic D, Noda M, Ikeda T, Miyamoto Y, Koshiro K, Sano H. Improved bond performance of a dental adhesive system using nano-technology. Biomed Mater Eng 19 : 249-257, 2009.

35）Hoshika S, Nagano F, Tanaka T, Ikeda T, Wada T, Asakura K, Koshiro K, Selimovic D, Miyamoto Y, Sidhu SK, Sano H : Effect of application time of colloidal platinum nanoparticles on the microtensile bond strength to dentin. Dent Mater J 26 : 682-689, 2010.

36）Burrow MF, Tagami J, Hosoda H : The long term durability of bond strengths to dentin. Bull Tokyo Med Dent Univ 40 : 173-91, 1993.
37）中田　貴，西谷佳浩，吉山昌宏：MMA系レジンセメントのサーマルサイクリング後および水中浸漬後の象牙質接着強さ．接着歯学　28：67-72，2010.
38）川本　諒，土屋博昭，岩佐美香，坪田圭司，松村正鴻，穴田直仁，陸田明智，宮崎真至：術者の違いがシングルステップシステムの歯質接着性に及ぼす影響．日歯保誌　51：130-137，2008.
39）Sano H, Kanemura N, Burrow MF, Inai T, Yamada T, Tagami J : Effect of operator variability on dentin adhesion : student vs. dentists. Dent Mater J 17 : 51-58, 1998.
40）星加修平，田中　享，佐野英彦：象牙質接着強さに与える白金ナノコロイド塗布の影響．北海道歯誌　31：14-16，2010.
41）Koshiro K, Sidhu SK, Inoue S, Ikeda T, Sano H : New concept of resin-dentin interfacial adhesion : the nanointeraction zone. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 77 : 401-408, 2006.
42）長野二三，遠藤一彦，橋本正則，佐野英彦，星加修平，大野弘機：4-META/MMA-TBBレジンの象牙質接着における白金ナノコロイドおよび金ナノコロイドの効果．歯科材料・器械　28：227，2009.
43）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.

Hokkaido J. Dent. Sci., 32 : 177-192, 2012.

ORIGINAL

Effect of Dentin Priming of Colloidal Platinum Nanoparticles on the Adhesion of 4-META/MMA-TBB Resin to Dentin before and after Thermal Cycling

Yutaka Igarashi, Fu Jiale, Shinichi Kakuda, Toru Tanaka, Yasuko Nakaoki and Hidehiko Sano

ABSTRACT : The purpose of this study was to investigate the effects of dentin priming of Colloidal Platinum Nanoparticles (CPN) on dentin adhesion of 4-META/MMA-TBB resin before and after thermal cycling (TC). Eighteen extracted human third molars, stored in 0.5% chloramine T, were used. The occlusal dentin surfaces were prepared by cutting the mid-coronal portion of the crown segments and polishing with 600-grit silicon carbide paper under running water. The dentin surfaces were subjected to one of the following treatments: a) Etching with a 10 % citric acid-3 % $FeCl_3$ solution (control group) ; b) Etching with a 10% citric acid-3% $FeCl_3$ solution followed by applying 10% or 100% CPN as the primer solution. Following this treatment, an acrylic rod was bonded to the etched surface using 4-META/MMA-TBB resin (Super-Bond, Sun Medical). Specimens were stored in distilled water for 24 h and then were cut perpendicular to the bonded surface to obtain square-shaped beams with a cross-sectional area of approximately 1.0 mm^2. Following the preparation of the beams, TC (0, 10,000, and 20,000 cycles) was conducted between two temperatures, 5 and 55℃ , with 60 second cycles. Following the TC, the beam specimens were subjected to micro-tensile bonding tests (μTBT) at a crosshead speed of 1.0 mm/min to assess the bond strengths. The data were analyzed with the Games-Howell method ($p < 0.05$). The resin-dentin interfaces of the tested specimen groups were observed with SEM and TEM.

The micro-tensile bond strengths (μTBS) of the control group were 29.3 MPa (TC 0 cycle), 36.6 MPa (TC 10,000 cycles), and 32.8 MPa (TC 20,000 cycles). The bond strengths of the 10% CPN group were 30.4 MPa (TC 0), 40.3MPa (TC 10,000), and 32.1MPa (TC 20,000 cycles). The 100% CPN groups showed the following bond strengths; 24.2 MPa (TC 0), 12.0 MPa (TC 10,000) and 10.7MPa (TC 20,000 cycles) respectively.

The μTBS of the control and 10% CPN group showed no statistically significant differences before and after thermal cycling. The bond strength decreased significantly in the 100% CPN group after the thermal cycling. The observations of the resin-dentin interfaces using SEM showed shorter resin tags in the 100% CPN group after the thermal cycling than in the control and 10% CPN groups. The TEM observations of the resin-dentin interfaces of the groups with CPN showed the presence of fine particles at the top of the hybrid layer. It was suggested that CPN as a primer solution enhancing bond strength would be its concentration dependent.

Key Words : 4-META/MMA-TBB resin, thermal cycling, nano-technology, dentin adhesion, colloidal platinum nanoparticles.

Department of Restorative Dentistry, Division of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586 Japan (Chief : Prof, Hidehiko Sano)