



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	4-META/MMA-TBBレジンの硬化条件が レジン表面への骨形成に及ぼす影響
Author(s)	洲崎, 真希; 菅谷, 勉; 川浪, 雅光
Citation	北海道歯学雑誌, 34(2), 65-76
Issue Date	2014-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55158
Type	journal article
File Information	34-02_03_sunosaki.pdf



原 著

4-META/MMA-TBBレジン硬化条件が レジン表面への骨形成に及ぼす影響

洲崎 真希 菅谷 勉 川浪 雅光

抄 録：4-META/MMA-TBBレジン（スーパーボンド）は歯質や骨への接着性だけでなく、生体親和性に優れ、硬化したレジンに増殖した新生骨が直接接することが報告されている。一方、生体親和性は硬化条件によって異なることが報告されている。そこで本研究では、硬化条件を変えたスーパーボンドを骨髓腔内に埋植し、レジン表面への骨形成に及ぼす影響を評価した。

スーパーボンドを空気遮断条件下で硬化させ、直径1 mm、長さ5 mmの円柱形試料を作製し、10週齢ラットの大腿骨を穿孔、次の3条件で埋植を行った。骨髓液中硬化群：試料表面にスーパーボンドを塗布し、直ちに埋植。空气中硬化群：試料表面にスーパーボンドを塗布し、24時間空气中で硬化後に埋植。空気遮断硬化群：試料をそのまま埋植。術後2、8週で脱灰薄切標本を作製してH-E染色し、光学顕微鏡下で骨形成率、骨接触率などを計測した。次に、硬化条件による表面性状の違いを調べるため、スーパーボンドを空気遮断条件下で硬化させ1×5×5 mmの試料を作製した。ラットの大腿骨から骨髓液を採取し、上記と同じ3つの条件下で10分間骨髓液に浸漬した。その後20分間超音波洗浄し、SEM観察とFT-IR分析を行った。

光顕では、2週後に3群とも軟組織を介して新生骨がほぼ試料全周を取り囲み、8週後には3群とも試料と骨は近接していた。試料と骨の接触率は、2週後は3群とも低く3群間に有意差はなかった。8週後は骨髓液中硬化群が15.4%で最も高く、他の2群に比較して有意差が認められた。SEM観察では骨髓液中硬化群の試料表面に厚さ2～3 μmの粗造な層がみられ、FT-IR分析でアミド特性吸収帯のバンドがみられたことから、この層は試料表面に付着したタンパク質を含む骨髓液成分と考えられた。

以上より、4-META/MMA-TBBレジンに硬化させると、レジン表面にタンパク質を含む骨髓液成分が付着し、骨との接触率が向上する可能性が考えられた。

キーワード：4-META/MMA-TBBレジン、硬化条件、生体親和性、骨-レジン接触

緒 言

4-META/MMA-TBBレジン^{1,2)}は歯質に対する優れた接着性を有し^{1,2)}、また生体親和性もきわめて高いこと^{3,4)}が知られている。このことから、われわれは4-META/MMA-TBBレジン⁵⁻⁷⁾を歯根端切除術や再植術時のroot-end sealing⁸⁻¹⁰⁾、垂直歯根破折の接着治療¹¹⁻¹²⁾、髓床底穿孔部の封鎖^{11,12)}に応用し、良好な成績を報告してきた。これらの研究では、術後に炎症が生じることはなく良好な歯周組織の改善が得られたが、硬化したレジン上にセメント質の形成は認められず、歯頸部に大きな穿孔や幅の広い破折間隙がある場合には、上皮が根尖側移動して歯周ポケットを形成しやすいことが明らかにされている¹³⁾。

4-META/MMA-TBBレジン¹⁴⁾をラット頭蓋骨に接着さ

せた研究¹⁴⁾では、レジンが接着した骨は正常なモデリングが行われ、硬化したレジン表面にも周囲から新生骨が増生した。光学顕微鏡では、硬化したレジン上に増生した骨とレジンとの間には結合組織の介在は認められず直接接していた。このことから、4-META/MMA-TBBレジン¹⁵⁾は骨に対する親和性も高いことが明らかとなり、硬化したレジン表面にも硬組織が形成される可能性が示された。しかし、硬化したレジン上への新生骨の増生速度はきわめて遅かった。

炭酸カルシウムを4-META/MMA-TBBレジンに複合化させ、ラット大腿骨骨髓腔に埋植した研究¹⁵⁾では、炭酸カルシウムを複合化することで、レジンと新生骨との直接接合が高まっていることが光学顕微鏡観察で確認されただけでなく、SEMでもレジンと骨との間隙が認められな

い部位が多く認められ、レジンと骨が結合できる可能性が報告されている。

4-META/MMA-TBBの硬化条件を変化させ、ラット背部皮下結合組織に埋植して組織反応を比較した研究³⁾では、空気を遮断して重合したレジン空気中で重合したレジンと比較して炎症は少なく、モノマー液とポリマー粉末を混和後、ただちに血液で被覆した状態で重合した場合には、さらに炎症性細胞の浸潤は減少した。これらのことから、4-META/MMA-TBBレジンの硬化条件を変えると、レジン表面への骨形成にも違いが生じると考えられる。

そこで本研究では、硬化条件を変えた4-META/MMA-TBBレジンラット大腿骨骨髓腔に埋植し、骨形成への影響を病理組織学的に検討するとともに、硬化条件を変えた4-META/MMA-TBBレジンの表面性状について評価を行った。

材 料 と 方 法

1. 硬化条件を変えたレジン骨髄腔に埋植した場合の組織反応

1) 試料作製方法

4-META/MMA-TBBレジン（スーパーボンドC & B[®]、クリア、サンメディカル）のポリマー粉末3／4カップ、モノマー液4滴、キャタリスト1滴の割合で混和し、内径1mmのポリプロピレンチューブに填入、24時間硬化させた後にチューブから取り出し、長さ5mmに破断して円柱形試料を作製した。

2) 埋植方法

10週齢のWistar系雄性ラット17匹をジエチルエーテルおよびペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル注射液[®]、共立製薬）を用いて全身麻酔を施した後、左右の大腿部皮膚を切開、大腿骨中央部の骨膜を剥離して、直径1mmのフィッシャーバー（メルファースチールバー[®]、デンツプライ三金）を用い、生理食塩水の注水下で大腿骨

骨髄腔に2か所穿孔した。円柱形試料表面には次の3群の処置を行って穿孔部に埋植した。骨髄液中硬化群：スーパーボンドC & B[®]クリアを混和法で塗布し、直ちに埋植した。空気遮断硬化群：円柱形試料をそのまま埋植した。空気中硬化群：円柱形試料表面にスーパーボンドC & B[®]、クリアを混和法で塗布し、24時間空気中で硬化させた後に埋植した。

埋植は各試料の底面が骨髄腔内に位置するようにして、試料を骨表面にスーパーボンドC & B[®]で固定し、切開部を縫合した（図1）。

3) 光学顕微鏡観察および計測

観察期間は2、8週とし、観察期間終了後、ジエチルエーテル吸引にて安楽死させ、大腿骨を採取、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液にて浸漬固定を行った。アセトンでスーパーボンドC & B[®]を溶解させた後、5%ギ酸で脱灰し、通法に従ってパラフィン包埋して、厚さ5 μ mの薄切標本作製した。その後ヘマトキシリン・エオジン重染色（HE染色）し、光学顕微鏡観察および組織学的計測を行った。

計測は標本中央部の切片を選択し、画像解析ソフト（Image J 1.41, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA）を用いて、試料底部を対象に行った。計測項目は、試料底部の長さ（L）（ μ m）、新生骨基質の長さ（BL）（ μ m）、試料と新生骨基質の間の面積（ST）（ μ m²）、試料と新生骨基質が直接接している長さ（C）（ μ m）とし、骨基質形成率（BL/L $\times$ 100）（%）、試料と骨基質との距離（ST/BL）（ μ m）、試料と骨基質の接触率（C/L $\times$ 100）（%）を求めた（図2）。

統計処理は、医学統計ソフトSPSS10.0J[®]（SPSS）を用い、一元配置分散分析およびScheffeの多重比較検定を行った。有意水準は5%とした。

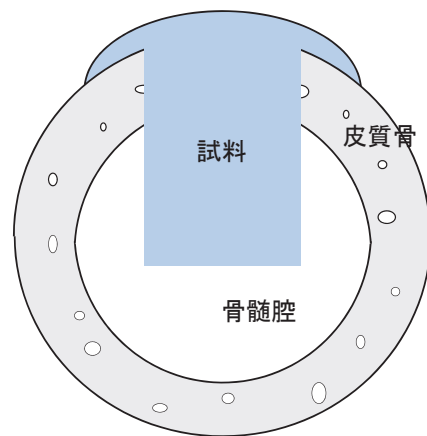
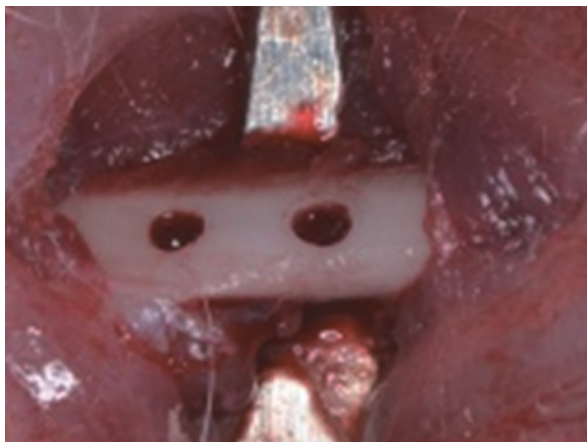


図1. 試料埋植方法
a：骨髄腔穿孔時 b：骨髄腔への埋植状態

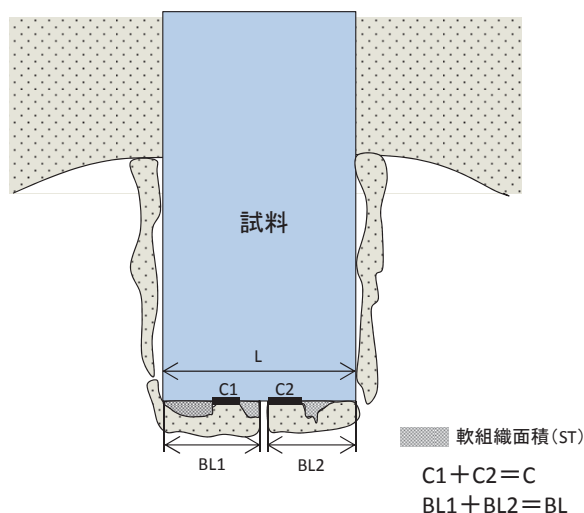


図2. 組織計測方法

L: 試料底面の長さ

BL: 新生骨基質の長さ

ST: 試料と新生骨基質の間の面積

C: 試料と新生骨基質が直接接している長さ

2. 硬化条件を変えたレジンの表面性状の評価

1) 試料作製方法

スーパーボンドC & B[®], クリアのポリマー粉末3/4カップ, モノマー液4滴, キャタリスト1滴の割合で混和し, セルロイドストリップで圧接して1×5×5mmの試料を作製した。

10週齢のWistar系雄性ラット3匹をジエチルエーテルおよびペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル注射液[®], 共立製薬)を用いて全身麻酔を施した後, 左右の大腿部皮膚を切開, 大腿骨中央部の骨膜を剥離して, 直径1mmのフィッシャーバー(メルファースチールバー[®], デンツプライ三金)を用い, 生理食塩水の注水下で大腿骨骨髓腔に穿孔した。

試料表面に次の3つの処理を行った。骨髓液中硬化群: スーパーボンドC & B[®]クリアを混和法で塗布し, 直後に穿孔部から滲出する骨髓液中で10分硬化させた。空気遮断硬化群: 試料をそのまま骨髓液中に10分浸漬した。空气中硬化群: 試料表面にスーパーボンドC & B[®]クリアを混和法で塗布し, 24時間空气中で硬化させた後に骨髓液に10分浸漬した。試料は骨髓液から取り出し, 純水中で20分間超音波洗浄し, 自然乾燥した。

2) 走査型電子顕微鏡観察

各試料を金蒸着し, JSM-5610(日本電子株式会社)を使用し, 加速電圧10kV及び5kVで走査型電子顕微鏡(SEM)観察した。さらに骨髓液中硬化群の試料は, 低速回転ダイヤモンドカッターを用いて試料のほぼ中央部で切断し, 断面をアルミナバフ研磨, 乾燥して金蒸着し, 断面のSEM観察を行った。

なお動物実験は, 国立大学法人北海道大学動物実験委員

会の承認を受け, 同指針に従って行った(承認番号: 09-0122)。

3) フーリエ変換赤外分光分析

フーリエ変換赤外分光(FT-IR)分析は, Spectrum100(PerkinElmer社)を用い, 各試料に対する赤外線入射角は48度として, 1回反射ATR法により波数4000~650cm⁻¹の領域で赤外分光分析を行った。対照群としてセルロイドストリップで圧接して硬化させ, 骨髓液に浸漬していないスーパーボンドC & B[®]を用いた。

結 果

1. 硬化条件を変えたレジンを骨髓腔に埋植した場合の組織反応

1) 光学顕微鏡観察

術後2週では, 3群とも明らかな炎症性細胞浸潤は見られなかった。試料周囲には新生骨の形成が認められ, 試料全周に及んでいる標本も見られた。

空气中硬化群では, 新生骨は梁状で類骨を含んだ幼弱な骨であり, 骨小腔内の骨細胞は類円形であった。試料と新生骨との間には数層の扁平あるいは類円形の細胞, また多核の巨細胞が認められた(図3)。

空気遮断硬化群では, 空气中硬化群と同様に幼弱な新生骨が形成されており, 骨小腔内の骨細胞は類円形であった。試料と骨との間の軟組織の幅は空气中硬化群より薄かったが, 類円形の細胞と扁平な細胞が同様に認められた(図4)。

骨髓液中硬化群では, 空气中硬化群, 空気遮断硬化群と同様に, 新生骨は厚さが不均一で幼弱であり, 骨小腔内の骨細胞も類円形であった。試料と新生骨との距離は空气中硬化群に比較するとやや近接しており, 1~数層の扁平な細胞や, 多核の巨細胞が新生骨面上に認められた(図5)。

術後8週では, 空气中硬化群は, 術後2週と比較すると新生骨はより緻密化しており, 層板構造がみられ類円形よりも扁平な骨細胞が多く認められた。新生骨と試料との距離は術後2週後より近接していたが, 直接接している部分はほとんど見られず, 1~数層の扁平な細胞や, 多核の巨細胞が認められた(図6)。

空気遮断硬化群も術後2週後と比較すると新生骨は緻密化し, 層板状の構造がみられ, 類円形, または扁平な骨細胞が認められた。骨基質と試料が直接接している部分がわずかに認められ, 直接接していない部分の軟組織の幅も術後2週後と比較すると薄く, 一層の細胞が配列している程度であった(図7)。

骨髓液中硬化群も新生骨は層板状に緻密化していた。新生骨と試料は近接しており, 骨基質と試料が直接接している部分が多く認められ, 接していない部分では一層の細胞が僅かに観察されるのみであった(図8)。

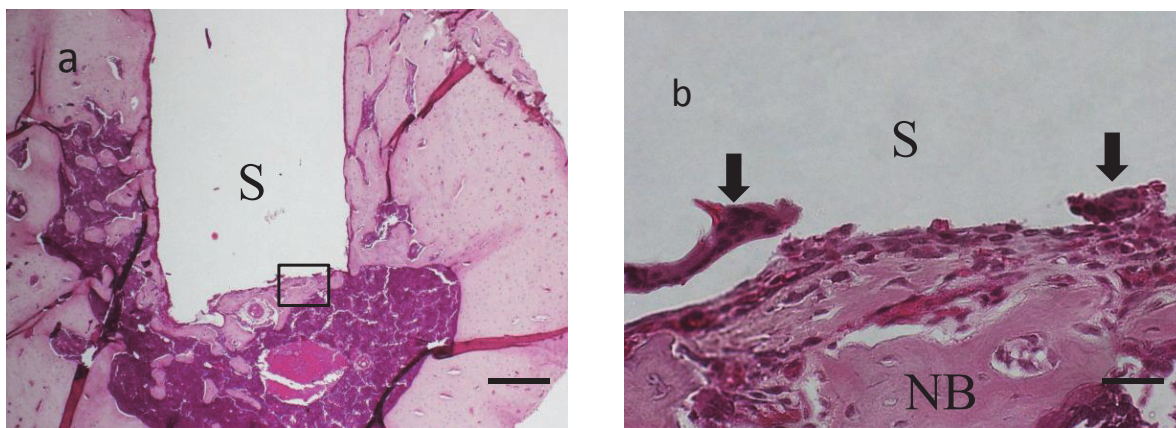


図3. 2週空气中硬化群のHE染色像

a : 全体像 (bar200 μ m) b : aの拡大像 (bar20 μ m) (S : 埋植試料 NB : 新生骨 ↓ : 多核巨細胞)

試料全周に梁状で類骨を含んだ幼弱な新生骨が形成されている。試料と新生骨との間には数層の扁平あるいは類円形の細胞や、多核の巨細胞がみられる。

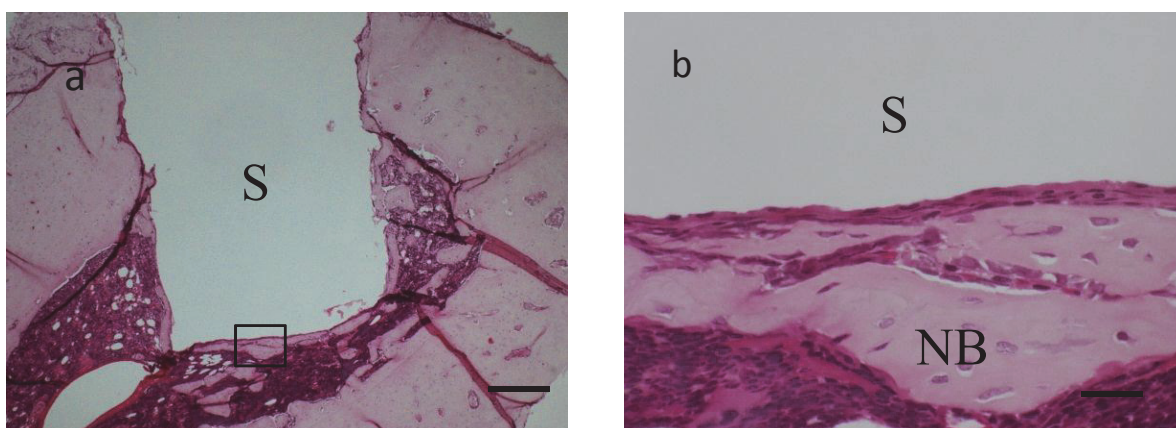


図4. 2週空気遮断硬化群のHE染色像

a : 全体像 (bar200 μ m) b : aの拡大像 (bar20 μ m) (S : 埋植試料 NB : 新生骨)

試料全周に梁状で幼弱な新生骨が形成されている。試料と骨との間の軟組織には類円形の細胞と扁平な細胞がみられる。

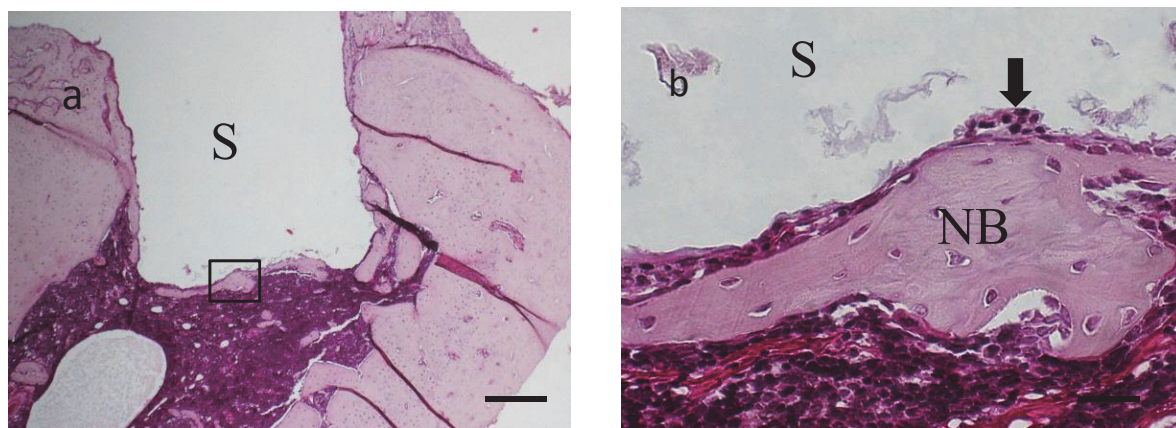


図5. 2週骨髄液中硬化群のHE染色像

a : 弱拡大像 (bar200 μ m) b : aの拡大像 (bar20 μ m) (S : 埋植試料 NB : 新生骨 ↓ : 多核巨細胞)

厚さが不均一で幼弱な新生骨が試料全周に認められる。試料と新生骨は近接しており、1～数層の扁平な細胞、多核の巨細胞がみられる。

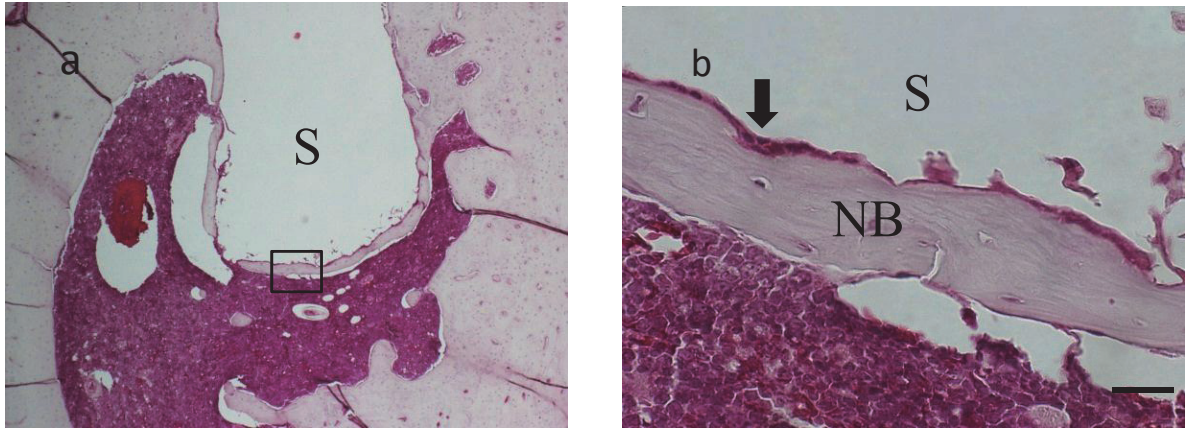


図6. 8週空气中硬化群のHE染色像

a : 弱拡大像 (bar200 μ m) b : aの拡大像 (bar20 μ m) (S : 埋植試料 NB : 新生骨 ↓ : 多核巨細胞)
 新生骨はより緻密化し層板構造がみられる。新生骨と試料との間には1～数層の扁平な細胞や多核の巨細胞がみられる。

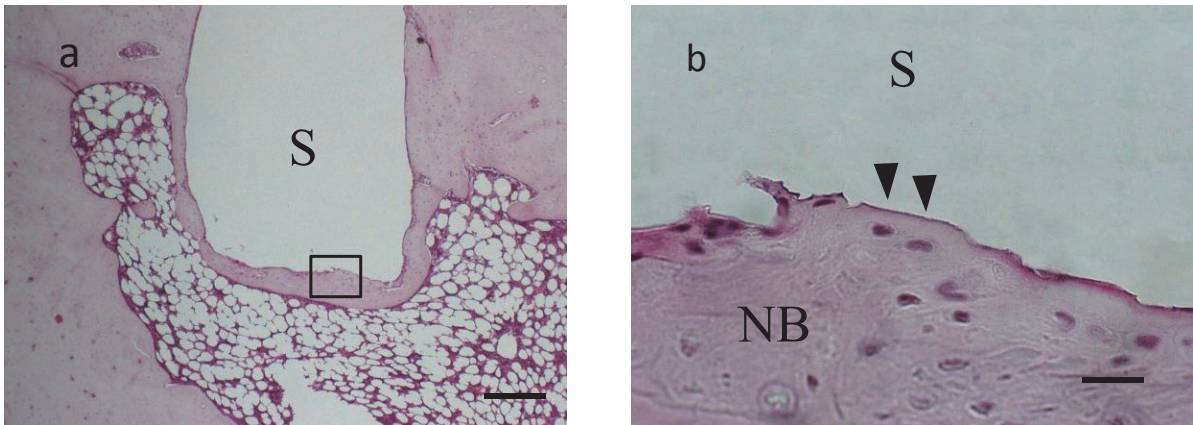


図7. 8週空気遮断硬化群のHE染色像

a : 弱拡大像 (bar200 μ m) b : aの拡大像 (bar20 μ m)
 (S : 埋植試料 NB : 新生骨 ▼ : 試料と新生骨基質が直接接している)
 新生骨は緻密化し層板状の構造がみられる。骨基質と試料が直接接している部分がわずかに認められる。

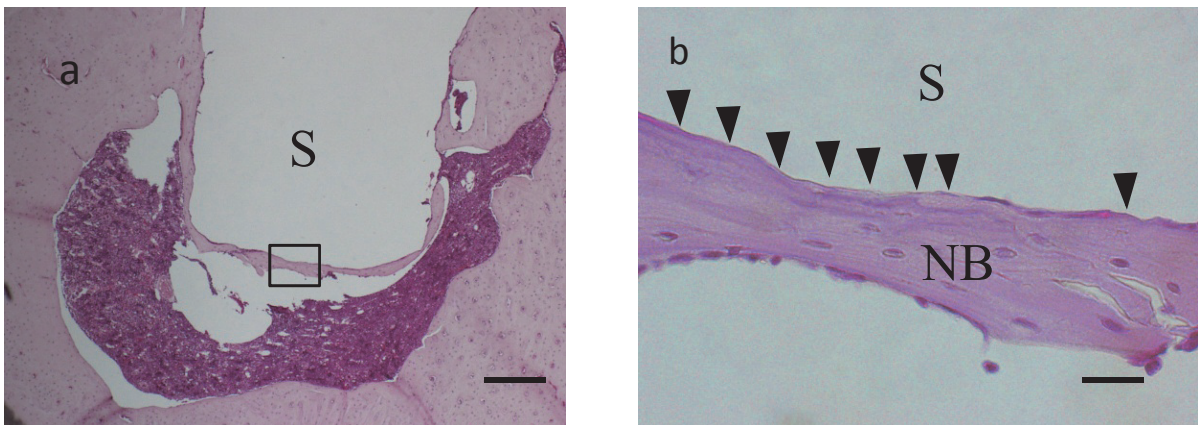


図8. 8週骨髓液中硬化群のHE染色像

a : 弱拡大像 (bar200 μ m) b : aの拡大像 (bar20 μ m)
 (S : 埋植試料 NB : 新生骨 ▼ : 試料と新生骨基質が直接接している)
 新生骨と試料は近接しており、直接接している部分が多く認められ、接していない部分では一層の細胞が僅かに観察されるのみである。

2) 組織学的計測

a) 試料底面の長さ (表1)

2週後の空气中硬化群 (n=13) が $971.1 \pm 257.6 \mu\text{m}$, 空気遮断硬化群 (n=8) が $1025.9 \pm 224.9 \mu\text{m}$, 骨髄液中硬化群 (n=11) が $984.2 \pm 138.1 \mu\text{m}$ で, 8週後はそれぞれ $890.7 \pm 220.3 \mu\text{m}$ (n=9), $975.3 \pm 108.8 \mu\text{m}$ (n=10), $991.2 \pm 130.5 \mu\text{m}$ (n=15) で, いずれも3群間に有意差は認められなかった. 2, 8週後の同じ群を比較すると, 3群とも有意差は認められなかった.

表1 試料底面の長さ

	空气中	空気遮断	髄液中
2週	971.1 ± 257.6 (n=13)	1025.9 ± 224.9 (n=8)	984.2 ± 138.1 (n=11)
8週	890.7 ± 220.3 (n=9)	975.3 ± 108.8 (n=10)	991.2 ± 130.5 (n=15)

平均±標準偏差 (μm)

2週, 8週とも3群間に有意差なし.

各群の2週, 8週間に有意差なし.

b) 骨基質形成率 (表2)

2週後は, 空气中硬化群は試料底面の長さに対して $78.6 \pm 21.9\%$, 空気遮断硬化群は $77.5 \pm 14.9\%$, 骨髄液中硬化群は $75.7 \pm 17.6\%$ の新生骨が観察された. 3群間に有意差は認められなかった. 8週後は, それぞれ $83.8 \pm 12.9\%$, $83.3 \pm 10.7\%$, $83.8 \pm 12.9\%$ で3群間に有意差は認められなかった. 2, 8週後の同じ群を比較すると, 3群とも有意差は認められなかった.

表2 新生骨形成率

	空气中	空気遮断	髄液中
2週	78.6 ± 21.9	77.5 ± 14.9	75.7 ± 17.6
8週	80.9 ± 10.1	83.3 ± 10.7	83.8 ± 12.9

平均±標準偏差 (%)

2週, 8週とも3群間に有意差なし.

各群の2週, 8週間に有意差なし.

c) 試料と骨基質間の距離 (表3)

2週後, 空气中硬化群は $17.3 \pm 24.3 \mu\text{m}$, 空気遮断硬化群は $25.6 \pm 15.4 \mu\text{m}$, 骨髄液中硬化群は $10.8 \pm 6.6 \mu\text{m}$ で3群間

表3 試料と新生骨基質間の距離

	空气中	空気遮断	髄液中
2週	17.3 ± 24.3	25.6 ± 15.4	10.8 ± 6.6
8週	14.8 ± 9.1	11.2 ± 11.1	$4.8 \pm 3.5^*$

平均±標準偏差 (μm)

2週では3群間に有意差なし.

*: 8週で空气中硬化群との比較で有意差あり ($P < 0.05$).

各群の2週, 8週間に有意差なし.

に有意差は認められなかった. 8週後は, それぞれ $14.8 \pm 9.1 \mu\text{m}$, $11.2 \pm 11.1 \mu\text{m}$, $4.8 \pm 3.5 \mu\text{m}$ で, 空气中硬化群に比べ, 骨髄液中硬化群では有意に小さかった. 2, 8週後の同じ群を比較すると, 空气中硬化群と骨髄液中硬化群は2週後に比較して8週後が有意に小さかった ($p < 0.05$).

d) 試料と骨基質との接触率 (表4)

2週後, 空气中硬化群は $1.3 \pm 3.6\%$, 空気遮断硬化群は 0% , 骨髄液中硬化群は $5.8 \pm 13.0\%$ で, 3群間に有意差は認められなかった. 8週後, 空气中硬化群は $1.9 \pm 2.9\%$, 空気遮断硬化群は $4.9 \pm 6.0\%$, 骨髄液中硬化群は $15.4 \pm 8.0\%$ で骨髄液中硬化群は他の2群に比べて有意に大きかった ($p < 0.05$). 2, 8週後の同じ群を比較すると3群とも2週後に比較して8週後では増加したが, 有意差は認められなかった.

表4 試料と新生骨基質との接触率

	空气中	空気遮断	髄液中
2週	1.3 ± 3.6	0 ± 0	5.8 ± 13.0
8週	1.9 ± 2.9	4.9 ± 6.0	$15.4 \pm 8.0^{*§}$

平均±標準偏差 (%)

2週では3群間に有意差なし.

*: 8週で空气中硬化群との比較で有意差あり ($P < 0.05$).

§: 8週で空気遮断硬化群との比較で有意差あり ($P < 0.05$).

各群の2週, 8週間に有意差なし.

2. 硬化条件を変えたレジンの表面性状の評価

1) SEM観察

空气中硬化群では, 試料表面に数~数十 μm の凹凸が認められたが (図9 a), 強拡大では概ね平滑で無構造であった (図9 b). 空気遮断硬化群は, 試料表面に数 μm の陥凹はわずかに見られたが (図10 a), 強拡大では概ね平滑で無構造であった (図10 b). 骨髄液中硬化群の試料表面は, 空气中硬化群と類似の凹凸がみられたが (図11 a), 強拡大では $0.2 \sim 0.3 \mu\text{m}$ の微小な凹凸が認められ粗造な表面形態であった (図11 b). 試料縦断面ではレジンの表層に厚さ $2 \sim 3 \mu\text{m}$ の凹凸のある粗造な層が観察された. レジンと粗造な層との界面は, 境界が不明瞭な部位が一部に認められた (図12).

2) FT-IR分析

空気遮断硬化群, 空气中硬化群は対照群と同様のスペクトルを示した. 骨髄液中硬化群も対照群と同様の波数でピークが認められたが, さらに 3280cm^{-1} , 1645cm^{-1} , 1540cm^{-1} 付近にピークが認められた. これらはそれぞれ, アミド特性吸収帯であるアミド A, I, II と一致した (図13).

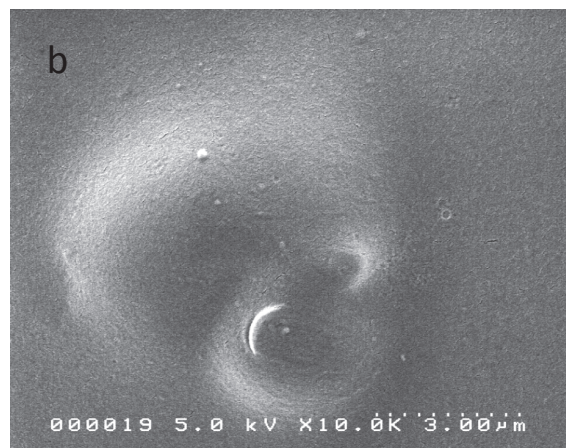
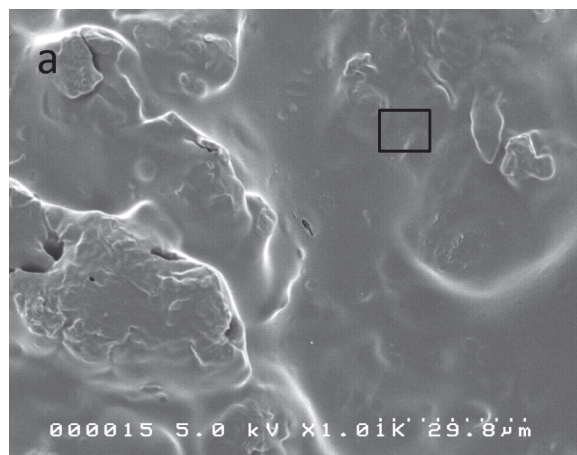


図9. 空气中硬化群の試料表面のSEM像

a : 弱拡大像 b : aの拡大像 表面は概ね平滑で無構造である。

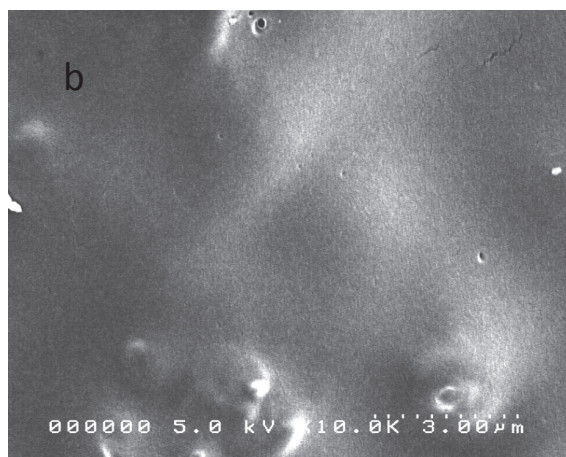
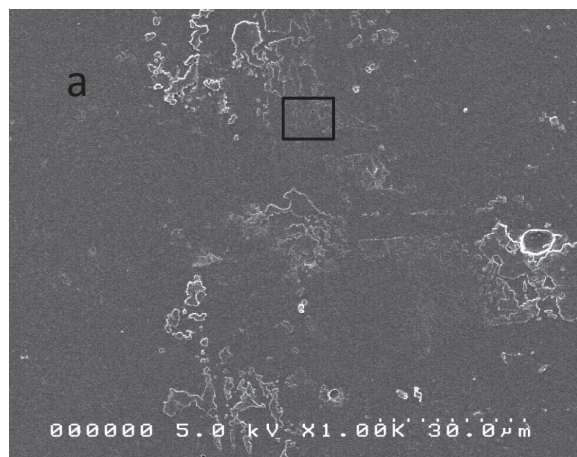


図10. 空気遮断硬化群の試料表面のSEM像

a : 弱拡大像 b : aの拡大像 aでは表面に凹凸が認められるが、bでは空気遮断硬化群と同様に滑沢である。

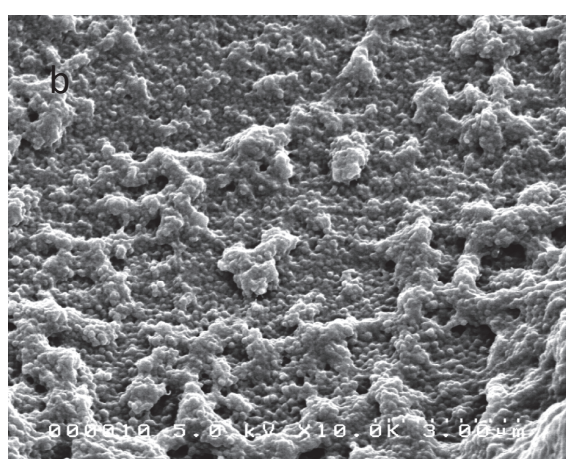
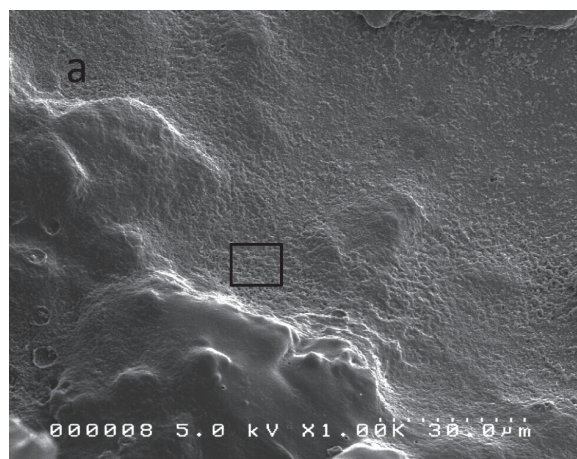


図11. 骨髄液中硬化群の試料表面のSEM像

a : 弱拡大像 b : aの拡大像
aでは空气中硬化群と類似の凹凸がみられるが、bでは0.2~0.3μmの微小な凹凸が認められ、粗造な表面形態である。

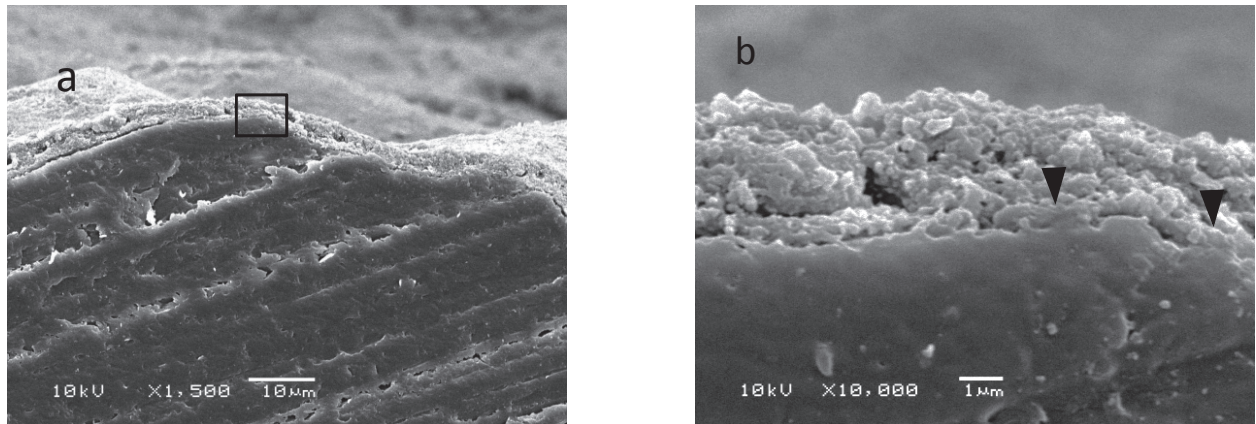


図12. 骨髓液中硬化群試料縦断面のSEM像

a : 弱拡大像 b : aの拡大像

試料縦断面ではレジンの表層に厚さ2～3μmの凹凸のある粗造な層が認められる

bではレジンと粗造な層との界面は、境界が不明瞭な部位が一部に認められる (▼).

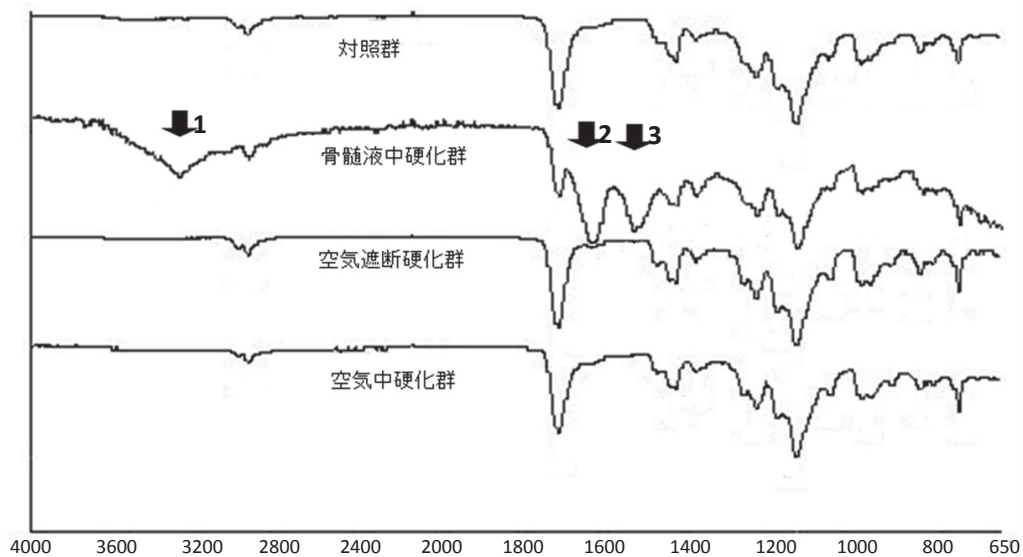


図13. FT-IR分析

空気遮断硬化群、空气中硬化群は対照群と同様のスペクトルを示している。骨髓液中硬化群には、さらに 3280cm^{-1} (↓1), 645cm^{-1} (↓2), 1540cm^{-1} 付近 (↓3) にもピークが認められる。

考 察

本研究は、硬化条件を変えた4-META/MMA-TBBレジンを実験用大腿骨骨髓腔に埋植して、骨形成への影響を比較検討した。

評価部位は試料底面のみで行った。これは、埋植の際に、骨髓液中硬化群で試料側面に塗布した未重合のレジンが、大腿骨穿孔部の骨に接触してしまい剥離する可能性があり、試料側面部に塗布したレジンの硬化条件を一定にすることが困難であること、また骨と試料との距離にばらつきが大きいこと、試料側面部では組織の治癒や新生骨の形成に影響を及ぼし、レジンの硬化条件の影響を十分に評価できなくなる可能性が考えられたためである。

その結果、3群とも2週後には試料が新生骨に取り囲まれており、骨基質形成率は高い値を示した。2、8週とも各群間に有意差はなく、また、各群の2週後と8週後を比較しても有意差はなかった。さらに、経時的な新生骨の緻密化や、層板骨の増加、骨細胞の扁平化、骨表面の細胞の扁平化などは3群とも同様であったことから、骨の成熟¹⁷⁾に大きな差はなく、硬化条件は試料周囲への骨形成量にほとんど影響しないものと思われた。

一方、3群とも新生骨は母床骨から連続して材料表面を増生するのではなく、軟組織を介して新生骨が早期に試料を取り囲み、時間の経過とともに軟組織量が減少して骨基質が試料に近接していった。これは骨髓腔に炭酸カルシウムを混和したスーパーボンドを埋植して骨形成状態を調べ

た逸見らの研究¹⁵⁾と同様であった。また、骨基質が試料に近接する速度は、スーパーボンドを骨髓腔中で硬化させた場合が最も早く、8週後には空气中硬化群との間に有意差がみられた。さらに、骨基質と試料との直接接触は、8週後には骨髓液中硬化群が他の群に比べて有意に高い値を示した。したがって、骨髓液中で硬化させることは、骨基質と試料との距離を近接させ、骨基質と試料が直接接する面積を増加させるのに有効であると思われる。

3群間で、試料と骨基質との距離や試料と骨基質との接触率に差が生じた理由として、試料表面の重合率の違いや物理化学的性状に差が生じていた可能性が考えられる。

4-META/MMA-TBBレジン硬化条件によって生体親和性に差が生じることは、川村らがラット背部皮下結合組織で炎症反応を調べて報告³⁾している。この研究では、スーパーボンドを空气中で硬化した場合は空気を遮断して硬化した場合に比べ、術後1週では炎症が強かったと報告しているが、本実験では3群ともほとんど炎症は見られなかった。一般にレジンモノマーは硬化体に比較すると毒性が高いことが知られており¹⁶⁾、未重合モノマーの溶出が炎症の主な原因と考えられている。また、皮下結合組織での実験では、1週後にみられた炎症はその後消滅し、4週後では硬化条件によらずほぼ消失したと報告されている。したがって、本実験の空气中硬化群で2週後に炎症がみられなかった理由として、皮下結合組織より骨髓腔中の方がモノマーの溶出が早い可能性、また結合組織と骨髓では反応性に違いがあった可能性が考えられる。いずれにしても、すでに2週後に炎症がほとんど見られなかったことから、3群間で初期のモノマー溶出に違いがあっても、その後の新生骨形成などにはほとんど影響しないものと思われる。そこで、硬化条件が新生骨形成に影響を及ぼす要因として、試料表面の物理化学的性状を比較した。SEM観察では、空気遮断硬化群、空气中硬化群では表面が均質で比較的滑沢であったのに対し、骨髓液中硬化群は試料表面が粗造で、0.2~0.3 μm 程度の凹凸がみられた。試料断面の観察では、レジン上に厚さ2~3 μm のレジンとは異なる構造が認められ、骨髓液中硬化群はレジン表面が数 μm の骨髓液成分でコーティングされている可能性が考えられた。

FT-IR分析では、空気遮断硬化群と空气中硬化群は骨髓液に浸漬していない対照群と同様のスペクトルを示したのに対し、骨髓液中硬化群では4-META/MMA-TBBレジンのスペクトルに加え、特性アミド吸収帯である3280 cm^{-1} 、1645 cm^{-1} 、1540 cm^{-1} のアミドA、アミドI、アミドIIのピークが認められた^{18~22)}。この結果から、SEMで認められたレジン表面の層はタンパク質を含む骨髓液中の成分と推測された。一般にPMMAなどのポリマー表面にはタンパク質が吸着しやすいことが知られているが^{23,24,25)}、そのメカニズムは非常に複雑であり、ポリマー表面の極性、荷電、界面の自由エネルギー、親水性など様々な因子が影響

するとされており、現在も様々な研究が行われている。本研究においては試料を骨髓液に浸漬後、20分間の超音波洗浄を行っているが、空気遮断硬化群、空气中硬化群ではアミド吸収帯を認めなかったことから、試料表面に一時的に骨髓液中のタンパク質などが吸着していた可能性はあるものの、超音波洗浄により除去されたと考えられる。一方、骨髓液中硬化群では試料表面の骨髓成分は超音波洗浄で除去できなかったことから、骨髓液中硬化群の試料表面の骨髓成分は、一般にポリマー表面にタンパク質が吸着するのとは異なる様式で付着していると考えられた。

これまでに、歯髄や歯根膜などの結合組織表面で4-META/MMA-TBBレジン硬化させると、結合組織とレジンがハイブリッド層を形成する可能性が報告されている^{3,11,26)}。また、MMAのグラフト重合はコラーゲンなどのポリペプチドに対して起こることが知られている²⁷⁾。本研究の骨髓液中硬化群試料縦断面におけるSEM観察では、レジンとその表層の構造物との境界には間隙がみられる部位が多かったが、境界が不明瞭な部位も一部にみられ、この層とレジン是一体化している部分があるのではないかと思われる。すなわち、レジンのポリマーとモノマーを混和して直ちに骨髓液に接触させたことにより、レジンと骨髓液中の成分がハイブリッド層を形成した可能性が考えられる。レジンと骨髓液中の成分がハイブリッドすると、レジン表面へのタンパク質の吸着力よりも強く結合するために、超音波洗浄を長時間行っても除去されなかったものと思われる。

レジン表面に付着した骨髓液の成分が、骨形成の促進やレジンとの接触にどのような役割を果たしたのかは、今後の研究を俟たなければならないが、細胞の付着や増殖、分化に対して有効に作用していた可能性が考えられる。線維芽細胞や骨芽細胞は、滑沢な面よりも粗造な面の方が付着しやすいこと²⁸⁾が報告されており、骨髓液中で硬化させたレジン表面は、空気遮断硬化群や空气中硬化群の表面と比較して粗造であったことから、表面形態が細胞の付着や増殖に有利であったと考えられる。また、骨髓液中には数種類の接着性タンパク質が含まれていることが報告されており^{29,30)}、レジンに直接的、あるいは間接的に接着性タンパク質が付着し、細胞の付着を促進する可能性がある。レジン表面への接着性タンパク質の付着については、4-META/MMA-TBBレジン歯肉切除後の創面上で硬化させた研究³¹⁾で、創面と接して硬化したレジン面に接着性タンパク質が発現することが報告されていることから、本研究でも骨髓液中の接着性タンパク質がレジン表面に存在している可能性がある。また、骨髓液中には骨形成に有効な多くの成長因子が含まれていること³²⁾が報告されており、試料表面にタンパク質を含む骨髓液成分が付着したことで、付着した細胞の骨芽細胞への分化に有利に働いた可能性が考えられる。

本研究により、4-META/MMA-TBBレジン骨髄液中で硬化させると、新生骨に対する親和性が高まる可能性が示されたことから、レジン表面に硬組織誘導性のある材料を付着させることにより、積極的にレジン表面に硬組織を誘導できる可能性がある。このことは、4-META/MMA-TBBレジン穿孔部の封鎖や破折歯根の接着に用いる際に、レジン上にセメント質が形成されることでポケットの形成を防ぐことや、咬合力を骨に伝える機能的形態の回復が可能になり、現在保存不可能とされている歯の治療法に発展することが期待される。

結 論

本研究では、4-META/MMA-TBBレジン硬化条件を変え、大腿骨骨髄腔に埋植して骨増生への影響や新生骨との親和性を評価した。その結果、以下の結論を得た。

1. 4-META/MMA-TBBレジン骨髄液中で硬化させることにより、レジンと骨の接触率が高まった。
2. 4-META/MMA-TBBレジン骨髄液中で硬化させることにより、レジン表面にタンパク質を含む骨髄成分が強く付着した。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行にご援助、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周・歯内療法教室の教室員各位ならびに株式会社サンメディカルに心より御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 中林宣夫：接着界面の象牙質側に生成した樹脂含浸象牙質について。歯材器，1：78-81，1982。
- 2) Tanaka S, Sugaya T, Kawanami M, Nodasaka Y, Yamamoto T, Noguchi H, Tanaka Y, Ikeda T, Sano H, Sidhu SK : Hybrid layers seals the cementum/4-META/MMA-TBB resin interface. J Biomed Mater Res B Apple Biomater, 80 : 140-145, 2007.
- 3) 川村直人，菅谷 勉，宮治裕史，川浪雅光：4META/MMA-TBBレジンの硬化条件が組織反応に及ぼす影響。日歯保存誌，46：853-859，2003。
- 4) Yoshimine Y, Ono M, Akamine A : In vitro comparison of the biocompatibility of mineral trioxide aggregate, 4META/MMA-TBB resin and intermediate restorative material as root-end-filling materials. J Endod, 33 : 1066-1069, 2007.
- 5) 菅谷 勉，野口裕史，長谷川有紀子，田中裕子，川浪雅光：歯根端切除時に4META/MMA-TBBレジンによるroot-end-sealingの有効性。日歯保存誌，45：62-67，2004。
- 6) 長谷川有紀子，菅谷 勉，川浪雅光：根尖性歯周炎の治療に対する4META/MMA-TBBレジンによるroot-end-sealingの有効性。日歯保存誌，47：622-632，2004。
- 7) 大谷香織，菅谷 勉，川浪雅光：根尖切除術における切除面の封鎖法の違いが実験的根尖性歯周炎の長期治療に及ぼす影響。日歯保存誌，51：648-658，2008。
- 8) 野口裕之，菅谷 勉，加藤 熙：縦破折した歯根の接着による治療法 第2報 接着性レジンセメントで接着・再植した場合の組織学的検討。日歯保存誌，40：1453-1460，1997。
- 9) Sugaya T, Kawanami M, Noguchi H, Kato H, Masaka N : Periodontal healing after bonding treatment of vertical root fracture. Dent Traumatol ,17 : 174-179, 2001.
- 10) 富田真仁，菅谷 勉，川浪雅光：垂直歯根破折に口腔内接着と口腔外接着・再植を行った場合の歯周組織の治療。日歯保存誌，45：787-796，2002。
- 11) 山本俊樹，菅谷 勉，加藤 熙：髄床底穿孔の処置に4META/MMA-TBBレジンを用いた場合の歯周組織反応に関する病理学的検討。日歯保存誌，43：1239-1248，2000。
- 12) 山本俊樹，菅谷 勉，川浪雅光：髄床底穿孔の処置に4META/MMA-TBBレジンを用いた場合の臨床成績。日歯保存誌，47：733-742，2005。
- 13) 元木洋史，菅谷 勉，川浪雅光：垂直歯根破折の治療後に歯周組織に接するレジンの幅が上皮の根尖側移動に及ぼす影響。日歯保存誌，48：733-742，2005。
- 14) 中塚 愛，川村直人，菅谷 勉，川浪雅光：4META/MMA-TBBレジンと骨との長期安定性。歯材器，27：455-465，2008。
- 15) 逸見 優，菅谷 勉，中塚 愛，川浪雅光：炭酸カルシウムが4META/MMA-TBBレジン上への骨形成に与える影響。北海道歯誌，32：114-123，2012。
- 16) 今井庸司，渡辺真理子，李 恵娥，児島克則，門磨義則：歯科用レジンモノマーの細胞毒性。医器材研報，22，87-90，1988。
- 17) 網塚憲生，Ubaidus S, 小島 拓，Freitas PHL, 李敏啓，下村淳子：骨細胞・骨細管系の顕微解剖学。腎と代謝，21：183-190，2008。
- 18) Miyazawa T : Characteristic amide bands and conformations of polypeptides. edited by Mark A. Stahmann, Polyamino acids, polypeptides, and proteins : proceedings of an international symposium held at the University of Wisconsin, 1961, 201-217, University of Wisconsin Press, 1962.
- 19) Miyazawa T : Infrared studies of the conformations of polypeptides and proteins. edited by GN Ramachandran, Aspects of protein structure :

- proceedings of a symposium held in Madras 14-18 January 1963 and organized by the University of Madras, 1963, 257-364, Academic Press, 1963.
- 20) Miyazawa T, Fukushima K, Sugano S, Masuda Y : Far infrared spectra, chain vibrations of polypeptide. edited by G. N. Ramachandran, Conformation of biopolymers : papers read at an international symposium held at the University of Madras, 18-21 January 1967, 557-568, Academic Press, London, 1971.
 - 21) 増田幸夫：ポリアミノ酸の赤外吸収とNMR. 高分子, 21 : 160-167, 1972.
 - 22) Miyazawa T, Shimanouchi T, Mizushima S : Normal Vibrations of *N*-Methylacetamide. J Chem Phys, 29 : 611-616, 1958.
 - 23) 白浜博幸：蛋白質の高分子表面への吸着現象とそのバイオメディカル分野への応用. 蛋白質核酸酵素, 37 : 117-129, 1992.
 - 24) 大塚英典, 片岡一則：バイオマテリアルと生体界面. 表面技術, 54 : 973-979, 2003.
 - 25) Li S, Hu J, Liu B : A study on the adsorption behavior of protein onto functional microspheres. J Chem Technol Biotechnol, 80 : 531-536, 2005.
 - 26) 井上 孝, 下野正基, 市村賢二, 真坂信夫, 宮越照一：4META/MMA-TBBレジンと歯髄反応について：日歯内療誌, 14 : 34-41, 1993.
 - 27) 増原英一, 小嶋邦晴, 樽見二郎, 樋口右子：歯科用即硬性レジンの研究（第8報）. 歯材研報, 2 : 788-792, 1966.
 - 28) Inoue T, Cox JE, Pilliar RM, Melcher AH : Effect of surface geometry of smooth and porous-coated titanium alloy on the orientation of fibroblasts in vitro. J Biomed Mater Res, 21 : 107-126, 1987.
 - 29) Dorshkind K : Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. Annu Rev Immunol, 8 : 111-137, 1990.
 - 30) Zuckerman KS, Wicha MS : Extracellular matrix production by adherent cells of long-term murine bone marrow cell cultures. Blood, 61 : 540-547, 1983.
 - 31) Tsuchiya Y, Muramatsu T, Masaoka T, Hashimoto S, Shimono M : Effect of the dental adhesive, 4-META/MMA-TBB resin, on adhesion and keratinization of regenerating oral epithelium. J Periodont Res, 44 : 496-502, 2009.
 - 32) Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, O'Brien CA, Economides AN, Stahl N, Jilka RL, Manolagas SC : Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow culture from adult mice. J Bone Miner Res, 15 : 663-673, 2000.

ORIGINAL

Influence of Curing Condition on Bone Formation
on the 4-META/MMA-TBB Resin

Maki Sunosaki*, Tsutomu Sugaya and Masamitsu Kawanami

ABSTRACT : 4-META/MMA-TBB resin (Super-Bond C&B, Sun Medical, Japan) has been shown to not only possess remarkable adhesion to dentin and bone, but also to have biocompatibility with connective or bone tissue. New bone formation was reported to have been observed directly on cured resin. The curing condition influences the biocompatibility of the resin. In this study, we evaluated bone formation on the surface of 4-META/MMA-TBB resins that were cured under various conditions. To create the implantation rods, Super-Bond was cured anaerobically in a polypropylene tube that was 1 mm in diameter and broken into segments that were 5 mm in length. The right and left femora of Wistar rats (10 weeks old) were trephined to create a medullary cavity that was 1 mm in diameter, and the rods were implanted following curing under one of the following three conditions: Group 1, curing in bone marrow immediately after Super-Bond mixture was applied to the surface of the rods; Group 2, curing in air for 24 hours after the mixture was applied in the same way as in Group 1; and Group 3, curing under an air barrier?whereby the rods were implanted without any processing. Histological specimens were prepared at 2 and 8 weeks post-operation and the sections were stained with H-E (hematoxylin-eosin staining). Measurements including both the rates of bone formation and the direct contact of new bone with the resin were taken. Super-Bond disks (1×5×5 mm) were cured anaerobically by using a celluloid strip to form a barrier to the air. The disks were immersed in the bone marrow for 10 minutes under one of the three curing conditions mentioned above, followed by 20 minutes of ultrasonic irrigation. Then, they were observed under SEM (scanning electron microscopy) and analyzed by FT-IR (fourier-transform infrared spectroscopy). Two weeks following implantation, newly-formed bone was observed in the surrounding area of the whole implanted rods, and soft tissue had formed between the rod and bone. Eight weeks later, the rate of bone-resin contact in the group in which curing was done in the bone marrow was 15.4%, which was significantly higher than that of the other two groups. Under SEM, a rough layer (2-3 μ m thickness) was observed to be strongly adhered to the surface of the disks cured in bone marrow. Additionally, amide 1 and amide 2 bands were detected in this layer by FT-IR analysis. It is therefore possible that the rate of bone-resin contact, namely adhesion of bone marrow to the resin surface, can be improved when 4-META/MMA-TBB resin is cured in bone marrow.

Key Words : 4-META/MMA-TBB resin, Curing condition, Biocompatibility, Bone-resin contact

Department of Periodontology and Endodontology, Division of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine (Chief Prof. Masamitsu Kawanami), Kita-13, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan

*Corresponding Author: maki-86@den.hokudai.ac.jp