

I 型コラーゲンに対するタンニン酸の影響
(Effect of tannic acid on type I collagen)

日本大学大学院 松戸歯学研究科 歯学専攻

會田 悦子

(指導：會田 雅啓 教授)

和文抄録

本研究は、I型コラーゲンであるウシアキレス腱由来のコラーゲンに対するタンニン酸の影響について調べることを目的とした。

蒸留水に溶解し、0.1、1、10、20%に調整したタンニン酸溶液中に、ウシアキレス腱由来のコラーゲンを一定時間浸漬したのち、洗浄および乾燥し、示差走査熱量測定装置を用いてコラーゲンの熱変性温度を測定した。また、40%リン酸または10%クエン酸を作用させた場合の変化の様子について肉眼で確認するとともに、熱変性温度を測定した。

タンニン酸溶液の濃度と浸漬時間によって異なるが、タンニン酸溶液に浸漬したウシアキレス腱由来のコラーゲンは熱変性温度が高くなり、酸処理によってゼラチンに変化しなかった。ゼラチンに変化しなかったウシアキレス腱由来のコラーゲンを示差走査熱量分析したところ、変性していないことがわかった。以上の結果から、タンニン酸は、I型コラーゲンであるウシアキレス腱由来のコラーゲンを強化することが分かった。

英文抄録

The aim of the present study was to examine the effects of tannic acid on type I collagen derived from bovine Achilles tendon.

Tannic acid was dissolved in distilled water and adjusted to final concentrations of 0.1, 1, 10, and 20%. The collagen samples were immersed in these tannic acid solutions for varying durations, rinsed with distilled water, and then dried. The thermal denaturation temperature was determined using differential scanning calorimetry (DSC). Next, the collagen samples were etched with 40% phosphoric acid or 10% citric acid. Macroscopic changes in the samples were visually confirmed, and the thermal denaturation temperature was determined again by using DSC.

The results showed that the thermal denaturation temperature of the collagen samples increased after treatment with tannic acid, although the temperature varied according to the tannic acid concentration and the immersion time. Collagen was not converted into gelatin after acid treatment; moreover, DSC showed that collagen was not denatured.

These results suggest that tannic acid can strengthen type I insoluble collagen and improve the adhesion of adhesive resin cement to dentin.

緒言

う蝕や外傷などによる実質欠損に対し、機能の回復と審美性の確保の目的で、人工物による歯冠補綴治療が頻繁に行われている。歯冠補綴装置は長期間、口腔内に維持されることが重要であり、合着用セメントを用いて歯に合着する。歯冠補綴治療を行う場合は、一般的に、エナメル質のほとんどを削除し、象牙質が露出した状態となる。したがって、象牙質と合着用セメントとの接着は重要である。

合着用セメントとして、リン酸亜鉛セメント、カルボキシレートセメント、酸化亜鉛ユージノールセメント、ガラスイオノマーセメント、レジンモディファイドガラスイオノマーセメント、接着性レジンセメントがある¹⁾。近年、前処理を行わない接着性レジンセメントとして、セルフアドヒーシブレジンセメントが市販されているが、その接着信頼性はまだ十分とはいえない。そのため、接着性モノマーによる歯質との化学的な接着を期待して、主に、前処理を伴う接着性レジンセメントが歯冠補綴装置の合着に使用されている²⁾。

接着性レジンセメントを用いて歯冠補綴装置を象牙質に合着する場合、酸を用いて象牙質面を処理する。酸は象牙質を切削する際に生成されたスミア層を除去するとともに、スミア層直下の健全象牙質を脱灰する。その後、酸処理面の洗浄と乾燥を行うが、その際、露出した象牙質コラーゲンは収縮し、レジンセメントの浸透を困難にすることから、プライマー処理を行い、収縮した象牙質コラーゲンの膨潤性を回復させる。次に、ボンディング材を塗布し、露出コラーゲンおよび脱灰象牙質内に浸透させ、接着性レジンセメントを用いて歯冠補綴装置を

合着する．これによって，象牙質面に樹脂含浸層が形成され，接着効果を発揮する^{3),4)}．

しかし，多くの研究者は，象牙質と接着性レジンセメントとの接着性は経時的に低下すると報告している．その原因の1つとして，歯冠補綴装置を接着性レジンセメントで合着する際に，象牙質面に対して行われる酸処理が影響していると考えられている．すなわち，酸処理によって影響を受けた樹脂含浸層内または樹脂含浸層直下のコラーゲンが歯冠補綴装置合着後の長期にわたる水の浸入により，加水分解してしまうことが原因であるとされている^{5),6)}．

一方，歯質強化を目的としてタンニン・フッ化物合剤（以下，HY 材）が開発され，多くの研究が行われている^{7)~10)}．HY 材は構成成分中のタンニン酸がタンパクを収斂凝固させ，抗菌性や抗酵素性をもたらし，亜鉛はタンニン酸亜鉛として象牙細管を封鎖し，ストロチウムとフッ素が無機質の耐酸性を与え，象牙質の有機成分及び無機成分の両面から強化するとされている．また，タンニン酸は古くから皮なめしや整腸剤などに使用され，タンパク収斂作用を有していることが知られている¹¹⁾．

そこで，タンニン酸を利用して，象牙質コラーゲンを強化することができれば，象牙質と接着性レジンセメントとの接着耐久性の低下の原因とされている象牙質コラーゲンの加水分解を抑制し，その結果として，接着耐久性を向上することができるのではないかと考えた．

本研究は，ウシアキレス腱由来のコラーゲンを用いて，それらをタンニン酸で

処理した場合の影響，および，タンニン酸処理したウシアキレス腱由来のコラーゲンを酸処理した場合の影響について，示差走査熱量分析装置を用いて調べることを目的とし，その結果から，接着性レジンセメントを用いて歯冠補綴装置を合着する場合のヒト象牙質の酸処理による象牙質コラーゲンへの影響，および，象牙質と接着性レジンセメントとの接着耐久性について考察した．

材料および方法

1．材料

本研究では，コラーゲンとして，ウシアキレス腱コラーゲン由来の COLLAGEN（和光，LOT NO: M4672，以下，テンドン）を用いた．タンニン酸はタンニン酸（和光，Lot No:PDQ0376，以下，タンニン酸）を用いた．

2．タンニン酸溶液の調整

蒸留水にタンニン酸を溶解し，0.1，1，10，20wt%の溶液を作製した．

3．熱変性温度の測定

細かく裁断したテンドン 0.05g を 0.1，1，10，20%のタンニン酸溶液 5ml 中に，それぞれ 30 秒，1，10，30 分，1，3，6，12，24 時間 37℃恒温槽中で浸漬した．その後，これらのタンニン酸溶液に浸漬したテンドン（以下，それぞれ，0.1%タンニン酸処理テンドン，1%タンニン酸処理テンドン，10%タンニン酸処理テンドン）を用いた．

ドン, 20%タンニン酸処理テンドン) を取り出し, 濾液の pH が中性になるまで蒸留水を用いて洗浄および濾過を繰り返し行った後, 自然乾燥させた. これらのタンニン酸処理テンドンを示差走査熱量測定装置 (DSC8230, Rigaku : 以下, DSC) を用いて, 熱変性温度を測定し, テンドンに対するタンニン酸の影響を調べた. また, 対照として, タンニン酸溶液に浸漬しないテンドン (以下, タンニン酸処理なしテンドン) を用いた. なお, 表 1 に測定条件を示す. タンニン酸処理テンドンはタンニン酸の濃度と浸漬時間ごとに試料数を 3 個とし, それぞれ 1 回測定した.

4. タンニン酸処理テンドンに対する酸の影響

タンニン酸処理なしテンドン, 30 秒, 30 分, 24 時間浸漬した 1%または 10%タンニン酸処理テンドンに対し, 40%リン酸溶液を 15 秒間, または, 10%クエン酸溶液を 10 秒間作用させ, その後, 直ちに蒸留水にて, 濾液の pH が中性になるまで洗浄および濾過を繰り返し行った後, テンドンの変化を肉眼にて観察した. また, 酸処理後のこれらのタンニン酸処理テンドンを自然乾燥させ, 「材料および方法」における「3. 熱変性温度の測定」と同様の方法および条件にて, DSC による熱変性温度を測定した.

結果

1. タンニン酸処理テンドンの熱変性温度の測定

30 秒, 1, 10, 30 分, 1, 3, 6, 12, 24 時間浸漬した 0.1%タンニン酸処理テンドン, 1%タンニン酸処理テンドン, 10%タンニン酸処理テンドン, 20%タンニン酸処理テンドンの DSC による熱変性温度の測定結果を表 2 に, また, その代表例を図 1 に示す.

タンニン酸処理なしテンドンの場合, 熱変性温度のピークが 65.6~65.8°C であった.

0.1%タンニン酸処理テンドンの場合, 浸漬時間が 30 秒間では熱変性温度のピークは 65.3~66.3°C で, タンニン酸処理なしテンドンとほぼ同じであったが, ピークは低く, 低温側から高温側へとブロード状に広がっており, 1, 3, 6, 12, 24 時間浸漬させたテンドンでは 64.4~68.9°C のピークに加えて 78.6~85.3°C にもピークが出現した (図 1-a).

1%タンニン酸処理テンドンの場合, 浸漬時間が 30 秒間では熱変性温度のピークは 65.4~69.5°C で, コントロールとほぼ同じであったがピークは低く, ブロード状に広がっていた. 1 分間以上の浸漬時間では 78.4~85.0°C に 2 つ目のピークが出現し, 1 時間以上の作用時間では熱変性温度が高温側のみの比較的シャープなピークとなり, 85.0~86.0°C を示した (図 1-b).

10%タンニン酸処理テンドンの場合, 0.1%または 1%タンニン酸処理テンドンの場合と異なり, 30 秒, 1 分間の浸漬の場合では, 66.2~69.1°C の熱変性温度のピークを示し, 10, 30 分, 1 時間の浸漬時間では 69.7~75.7°C となり, 高温側への移動が速かったものの, ピークは低くブロード状であった. その後, ピ

ークはシャープになり，2つになることがなく，3時間以上の浸漬時間では，熱変性温度のピークが83.4~84.6℃でほぼ一定のピークを示した．(図 1-c)．

20%タンニン酸処理テンドンの場合，30秒間の浸漬時間でも，タンニン酸処理なしテンドンと比べて69.8~72.2℃とやや高い熱変性温度のピークを示し，浸漬時間の延長とともにピークが高温側へと移動したものの，熱変性温度のピークは75.8~79.9℃であり，やや広いブロード状を示した．(図 1-d)．

2. タンニン酸処理テンドンに対する酸の影響

1) 肉眼的観察

タンニン酸処理なしテンドン，30秒，30分，24時間浸漬させた1%または10%タンニン酸処理テンドンに対し，40%リン酸溶液を15秒間，または，10%クエン酸溶液を10秒間作用させた場合のテンドンの変化を図2に示す．また，これらの酸処理によってゼラチンとなったものを×，原型を留めているものを○，一部ゼラチンとなったものを△とし，表3に示した．

40%リン酸溶液を15秒間作用させた場合，タンニン酸処理なし，30秒間浸漬した1%および，10%タンニン酸処理テンドンは，ゼラチンとなった．また，30分間浸漬した1%および，10%タンニン酸処理テンドンでは，一部，ゼラチンとなった．24時間浸漬した1%および，10%タンニン酸処理テンドンでは，ゼラチンになることなく，原型を維持していた．

10%クエン酸溶液を10秒間作用させた場合，タンニン酸処理なしテンドン，30

秒間または 30 分間浸漬した 1%および、10%タンニン酸処理テンドンでは、一部、ゼラチンとなった。また、24 時間浸漬した 1%および、10%タンニン酸処理テンドンでは、ゼラチンになることなく、原型を維持していた。

2) 熱変性温度の測定

タンニン酸処理なしテンドン、30 秒、30 分、24 時間浸漬させた 1%または 10%タンニン酸処理テンドンに対し、40%リン酸溶液を 15 秒間、または、10%クエン酸溶液を 10 秒間作用させた後の熱変性温度の測定結果を図 3 に示す。

40%リン酸溶液を 15 秒間作用させた場合に、ゼラチンとなったタンニン酸処理なしテンドン、30 秒間浸漬した 1%および、10%タンニン酸処理テンドンでは、熱変性温度の測定はできなかった。一部ゼラチンとなった 30 分間浸漬した 1%タンニン酸処理テンドンでは熱変性温度のピークが 77.9℃であったが、ピークは低かった。ゼラチンとならなかった 24 時間浸漬した 1%タンニン酸処理テンドンでは熱変性温度のピークが 76.7℃であり、ピークは低かった。一部ゼラチンとなった 30 分間浸漬した 10%タンニン酸処理テンドンでは 61.9℃であったが、広いブロード状を示し、ピークはシャープでなかった。ゼラチンにならなかった 24 時間浸漬した 10%タンニン酸処理テンドンではピークは 78.7℃であった(図 3-a)。

10%クエン酸を 10 秒間作用させた場合、一部ゼラチンとなったタンニン酸処理なしテンドンでは 59.6℃、30 秒間浸漬した 1%タンニン酸処理テンドンでは 62.9℃の熱変性温度のピークを示したが、ピークはブロード状でありシャープではなかった。同様に、一部ゼラチンとなった 30 分間浸漬した 1%タンニン酸処理

テンドンでは 80.0℃で、ピークもややシャープであった。ゼラチンとならなかった 24 時間浸漬した 1%タンニン酸処理テンドンでは 81.4℃であった。また、10%タンニン酸処理テンドンの場合は、一部ゼラチンとなった 30 秒間浸漬した場合で 63.1℃、30 分間浸漬した場合で 63.5℃で、ピークも低く、ブロード状を示した。ゼラチンとならなかった 24 時間浸漬した場合では、熱変性温度のピークが 72.6℃であったが、1%タンニン酸処理テンドンと比べて、ピークが低く、ややブロード状を示した。

考察

本研究は、ウシアキレス腱由来のコラーゲンを用いて、それらをタンニン酸で処理した場合の影響、および、タンニン酸処理したウシアキレス腱由来のコラーゲンを酸処理した場合の影響について、示差走査熱量測定装置を用いて調べることを目的とし、その結果から、歯冠補綴装置を接着性レジンセメントを用いて装着する場合のヒト象牙質の酸処理による象牙質コラーゲンへの影響、および、象牙質と接着性レジンセメントとの接着耐久性について考察した。

これまでに、象牙質コラーゲンを対象とした実験は比較的多く行われており、そのほとんどは、ウシ歯象牙質から無機成分を取り除いた抽出物を象牙質コラーゲンとして使用している。一般的に象牙質コラーゲンは、エナメル質を除去した後、象牙質をダイヤモンドバーにて切削するか象牙質片を切り出し、あるいは、生後 1 年の仔牛の前歯部顎骨から歯胚および未萌出歯を摘出し¹²⁾、凍結させたのち粉碎した粉末から抽出する。この粉末から酢酸やリン酸、あるいは EDTA な

どを用いて無機成分を除去した後、洗浄濾過し、残った抽出物を象牙質コラーゲンとして使用していることが多い。しかし、象牙質の粉碎法、象牙質からコラーゲンを抽出するために使用する処理液の種類、象牙質粉末と処理液との割合、処理時間などが詳細に定められていないことから、再現性が困難であり、処理液による影響が懸念される^{13)~15)}。一方、ウシアキレス腱コラーゲンであるテンドンは象牙質コラーゲンと同種の I 型コラーゲンであり、均一な条件で調整されており、象牙質コラーゲンを対象とした実験の試料として広く用いられていることから¹⁶⁾、本実験はテンドンを用いた^{7),17)}。

物質の温度を変化させながら温度差、熱エネルギー、質量、長さ、弾性率などを測定する技法を一般的に熱分析という。この中で、熱エネルギーの変化を測定する DSC は、物質の転移温度や熱量、熱容量を測定することができる。すなわち、コラーゲンの場合では、コラーゲンが熱変性する際の吸熱変化を捉え、熱変性温度を測定することができる装置である。コラーゲンは熱変性することでゼラチンとなることから、DSC による測定はコラーゲンがゼラチンとなる温度を測定することになる。

タンニン酸処理なしテンドンでは、熱変性のピーク温度が 65.6~65.8℃であり、ピークがシャープであることから、試料のほとんどが 65.6~65.8℃で変性する性質のものであることを示している。これに対し、0.1%タンニン酸処理テンドンでは、タンニン酸処理なしテンドンと比較して、30 秒、1、10、30 分間浸漬した場合の熱変性のピーク温度にほとんど変化が無かったが、ピークの高さが低

く、高温側へブロード状に広がっており、2つ目のピークらしき変化が認められた。これは、タンニン酸処理なしテンドンの場合と異なり、ピーク温度付近で変性する性質を持つテンドンに加えて、それ以上の温度で変性する性質を備えた部分がわずかながら出現しつつあることを示しており、タンニン酸溶液に浸漬したことによる変化、すなわち、テンドンが一部、強化されつつあることを示した変化である。さらに、浸漬時間を延長すると、62.5~67.9℃にあったピークに加えて、シャープさはないものの、78.6~85.3℃の2つ目のピークが出現したことから、テンドンが62.5~67.9℃の低温で熱変性する部分と78.6~85.3℃で熱変性する部分の大きな2つの構成に変化しつつあることがわかる。しかし、高温側でのピークの高さが、低温側のピークより低いことから、強化されたテンドンの割合は少なく、十分な強化はできていないものと思われる。

1%タンニン酸処理テンドンでは、0.1%タンニン酸処理テンドンを1時間浸漬した場合に現れたのと同様な変化が浸漬時間がわずか1分で出現し、シャープではないものの、高温側に熱変性温度のピークが出現した。また、そのピークは10分後には低温側のピークより高くなり、1時間浸漬ではシャープとなり、3時間以上になると、シャープなまま、高温側のみのピークと変化した。1%タンニン酸処理テンドンでは、0.1%の場合と異なり、3時間の浸漬時間で、65.4~72.2℃で熱変性を示していたタンニン酸処理なしテンドンの性質が、85.0~85.7℃に熱変性を示す性質に、すべて変化したことを示している。1%タンニン酸処理テンドンでは、0.1%タンニン酸処理テンドンと比較して、強化までの時間が短く、効

果的に行われていることを示している。

10%タンニン酸処理テンドンでは、終始、2つのピークが共存することがなく、特に、1時間までの浸漬では、ピーク温度が66.2~75.7℃から83.4~84.6℃にまで移動し、高温側にも2つ目のピークらしき変化がみられることから、強化の速度は0.1%または1%タンニン酸処理テンドンの場合より速いことを示している。しかし、強化の程度は平均的であり、特に高度に強化されたテンドンの割合は1%タンニン酸処理テンドンより少ないものであった。3時間以上の浸漬になると、1%タンニン酸処理テンドンの1時間以上の浸漬の場合と同様な変化を示し、ほぼ、同じ強化の程度であった。

20%タンニン酸処理テンドンでは、10%タンニン酸処理テンドンの場合とほぼ同様な変化を示したが、10%タンニン酸処理テンドンと比べて、ややシャープなピークを示した。しかし、ピークはシャープになることなく、69.8~79.9℃に留まっていた。1%または10%タンニン酸処理テンドンの場合と比較して、強化の速度は速く現れるものの、強化の程度は低いものであることがわかった。

これらの結果は、テンドンに対してタンニン酸を作用させた場合、タンニン酸がテンドンに熱物性変化を与え、ゼラチンに変化する熱変性温度を高くした、すなわち、変性しにくい状態になりテンドンが強化されたことを示している。また、強化の程度には、適切な濃度と浸漬時間が存在し、今回の実験から、テンドンを効果的に強化するためには、1%タンニン酸溶液に1時間以上浸漬すること、および、10%タンニン酸溶液に6時間以上浸漬することが必要と思われる。

タンニン酸によるコラーゲンの強化は、タンニン酸の水酸基が、コラーゲンタンパク質の $-NH_2$ 、 $-NH-$ 、 $-CONH-$ などのアミノ基に水素結合を形成すると考えられている¹⁸⁾。一般的に、タンニン酸の濃度が高ければ、この反応が促進されるように思われたが、今回の DSC の結果からは、タンニン酸溶液の濃度が高いと、浸漬の早期に強化の反応が起こっているものの、その後の強化の程度は、浸漬時間が延長しているにも関わらず、低いものであった。

タンニン酸を利用した操作に、古来より行われている「皮なめし」がある。これは、タンニン酸溶液で処理し、「皮」を「革」に変える操作である¹⁸⁾。なめされていないものを「皮」といい、なめしが行われたものを「革」という。「なめし」の定義は、耐熱性を付与すること、耐酸性や耐薬品性を付与すること、皮をやわらかくし、革らしさを付与することとされている。この操作は、始めに、濃度の低いタンニン酸溶液に一定時間、浸漬した後、徐々に濃度の高いタンニン酸溶液に浸漬して行われる。最初から濃度の高いタンニン酸溶液に浸漬すると、表面のみにタンニン酸が定着する「死ジュウ」という現象を起こし、タンニン酸の浸透を妨げてしまい、十分な「なめし」が行えなくなる。一方、タンニン酸溶液の濃度が薄い場合は、この現象が起こらず、内部にまで浸透し、「なめし」の効果が発揮される¹⁸⁾。

本実験における 20%タンニン酸溶液では、浸漬早期に、わずかに強化の傾向が見られたが、その後、熱変性温度のピークの上昇が 1%または 10%タンニン酸処理テンドンのように高くならず、テンドンの強化が十分に行われていなかったこと

から、このような現象が起こったものと考えられる。

歯科臨床において、接着性レジンセメントを使用する場合、象牙質面を酸処理するが、この酸処理によって、健全象牙質を脱灰するとともに、象牙質コラーゲンも影響を受け、この象牙質コラーゲンが口腔内で長期にわたる水分の浸入によって加水分解することが、象牙質と接着性レジンセメントとの接着耐久性を低下させる原因の1つとされている^{5),6)}。そこで、タンニン酸処理テンドンに対して、市販の酸処理剤に使用されている40%リン酸溶液または10%クエン酸溶液を用いて、タンニン酸処理をしたテンドンに対する酸処理の影響について調べた。なお、この酸処理を行う実験については、熱変性温度の測定結果から、4種類の濃度のタンニン酸の中で、タンニン酸の効果が高いと思われた1%および10%タンニン酸処理テンドンを用いた。

図2および表3に示すように、タンニン酸処理なしテンドン、30秒間浸漬した1%または10%タンニン酸処理テンドンでは、40%リン酸溶液を15秒間作用させることによりゼラチンとなったが、30分間浸漬した1%または10%タンニン酸処理テンドンの場合では一部ゼラチンとなり、浸漬時間が24時間ではゼラチンは確認できず原型を維持しており、浸漬時間が長くなるとともに40%リン酸溶液に対する耐酸性を備えていることがわかる。

一方、10%クエン酸溶液を10秒間作用させた場合では、タンニン酸処理なしテンドン、30秒または30分間浸漬した1%および10%タンニン酸処理テンドンで一部ゼラチンになったが、24時間の浸漬時間になると1%および10%タンニン酸処

理テンドンでゼラチンは確認できず原型を維持しており、10%クエン酸に対する耐酸性を備えたことがわかった。

また、DSCの測定結果と併せて考察すると、タンニン酸溶液に浸漬することによるテンドンの熱変性温度の上昇は、テンドンの耐酸性の向上を示した結果となっており、タンニン酸溶液によるテンドンの強化が、酸に対する抵抗性をも獲得していることを示している。

ゼラチンはコラーゲンが変性したことを示す変化である。変性はコラーゲンの分子構造である三重らせん構造が開裂し、ポリペプチド鎖の状態になっていることを示している。しかし、ゼラチンは変性温度を下回ると、再び、ポリペプチド鎖が寄り集まって、部分的に三重らせんを構築するとされている¹⁹⁾。そこで、酸処理後のタンニン酸処理テンドンの状況を把握するため、酸処理によって生成したゼラチンの熱変性温度をDSCによって測定した(図3)。

40%リン酸溶液を作用させることによってゼラチンとなったタンニン酸処理なしテンドン、30秒間浸漬した1%および、10%タンニン酸処理テンドンでは、熱変性を示すピーク温度が示されなかった。これはコラーゲンの三重らせん構造が開裂した状態となっていることを示し、酸処理によってゼラチンとなったこれらのテンドンが再び三重らせん構造を構築することなく、開裂したままの状態であることを示している。これは1%および10%タンニン酸に30秒間浸漬処理では、テンドンが強化されていないことを裏付けるものであった。

一方、40%リン酸溶液を作用させることによってゼラチンにならなかった24時

間浸漬した 1%または、10%タンニン酸処理テンドン、および、10%クエン酸溶液を作用させることによってゼラチンとならなかった 24 時間浸漬した 1%または、10%タンニン酸処理テンドンでは、72.6~81.4℃で熱変性温度のピークが示され、酸処理を行っていないタンニン酸処理なしテンドンで示された 65.6~81.4℃と比較して高い温度であったことから、酸処理によっても強化された状態が維持されていた。しかし、前述の如く、ピークはシャープではなく、ブロード状であったこと、また、熱変性を示すピーク温度が、酸処理前と比較して、低温側に移動したことから、酸処理によって侵襲を受け、三重らせん構造の開裂は無いものの、三重らせん構造を維持している水素結合が減少しているものと思われる。

また、一部ゼラチンとなったテンドンの場合では、熱変性を起こすピーク温度が 61.9~80.0℃であり、酸処理を行っていないタンニン酸処理なしのテンドンで示された 65.6~65.8℃と同程度であり、タンニン酸による強化が示されているものの、酸処理に抵抗できるほどの強化ではないものであった。

以上のように、タンニン酸は適切に作用させることによって I 型コラーゲンであるテンドンを強化し、耐酸性を向上させることが分かった。

I 型コラーゲンであるテンドンは熱や酸によって変性しゼラチンとなる。今回の実験は象牙質コラーゲンを使用したものではない。しかし、象牙質コラーゲンがテンドンと同じ I 型コラーゲンであることから、接着性レジンセメントを使用する際の酸処理によって、ゼラチンとなる可能性が考えられる。ゼラチンは親水性と溶解性が高くなることから^{20), 21)}、このような状態で歯冠補綴装置を装着し

た場合、接着耐久性の低下によって早期に脱離する可能性もある。しかし、タンニン酸を象牙質に適切に作用させることによって象牙質コラーゲンを強化しておけば、酸処理による影響を抑制し、長期にわたる歯冠補綴装置の維持に寄与できる可能性が考えられる。テンドンを用いた今回の実験では、1%タンニン酸溶液に1時間以上、または10%タンニン酸溶液に6時間以上浸漬することでテンドンが大きく強化された。しかし、象牙質コラーゲンは無機成分中に存在しており、タンニン酸の浸透が容易に行われぬ可能性を考慮すると、歯科臨床においてはプロビジョナルレストレーションや歯冠補綴装置の仮着期間を利用し、仮着用セメントに添加するなど、できる限り作用時間を長くする方法での応用が考えられる。さらに、タンニン酸によるI型コラーゲンの強化は、熱変性温度を高くし、酸に対する抵抗性を獲得しており、ゼラチンへの変化を抑制したことから、3重らせん構造を維持している水素結合を増加させている可能性が示された。

結論

本研究は、牛アキレス腱由来のコラーゲンをを用いて、それらをタンニン酸で処理した場合の影響、および、タンニン酸処理した牛アキレス腱由来のコラーゲンを酸処理した場合の影響について、示差走査熱量分析装置を用いて調べることを目的とし、その結果から、歯冠補綴装置を接着性レジンセメントを用いて装着する場合のヒト象牙質の酸処理による影響、および、象牙質と接着性レジンセメントとの接着耐久性について考察した。

その結果、タンニン酸は、I型コラーゲンであるテンドンの熱変性温度を高くし、強化することがわかったが、その効果には、適切な濃度と時間があり、効果的に強化するために、テンドンを用いた今回の実験では、1%タンニン酸溶液に1時間以上浸漬、または10%タンニン酸溶液に6時間以上浸漬する必要があるという結論を得た。また、タンニン酸で強化されたテンドンは耐酸性を示した。更に、象牙質コラーゲンがテンドンと同じI型コラーゲンであることから、象牙質にタンニン酸を作用させることによって、象牙質コラーゲンが強化され、歯冠補綴装置を接着性レジンセメントで合着する場合に行われる象牙質面の酸処理の影響を軽減し、象牙質と接着性レジンセメントとの接着耐久性の向上に寄与する可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 榎本貢三，中畷裕，西山典宏，宮崎隆，米山隆之：スタンダード歯科理工学

第 5 版－生体材料と歯科材料－. 学建書院: 東京, 2014, pp. 231-250.

- 2) 會田雅啓: 私の選択(1)－歯質との接着性からの検討－. DE 137:5-10, 2001.
- 3) 中林宣男: 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.
- 4) 中林宣男: 歯質とレジンの接着機構. 接着歯学 1:12-20, 1983.
- 5) 清村正弥: 4-META/MMA-TBB 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 6:860-872, 1987.
- 6) 橋本正則, 戸島洋和, 井田有亮, 建部二三, 遠藤一彦: 特集「歯質に対する接着耐久性を考える」レジン/象牙質接着界面の劣化. 日歯理工誌 32:265-268, 2013.
- 7) 谷崎幸司: タンニン・フッ化物合剤による二次う蝕の抑制に関する基礎的研究. 日歯保誌 21:279-296, 1978.
- 8) 會田雅啓: タンニン・フッ化物合剤配合リン酸セメントに関する基礎的研究. 日大口腔科学 7:357-369, 1981.
- 9) 山賀まり子, 小出武: タンニン・フッ化物合剤を配合したガラスイオノマーセメントを作用させた象牙質の F, Zn および Sr の取り込みについて. 歯科医学 55:403-418, 1992.
- 10) 會田悦子, 鈴木英明, 若見昌信, 庫山未希, 池見宅司, 會田雅啓: タンニン酸, フッ化ストロンチウム, フッ化亜鉛, タンニン・フッ化物合剤を配合した試作カルボキシレート系仮着用セメントの抗菌性について. 日歯理工誌

32:300-305, 2013.

- 11) 山賀禮一：生物学的性質をもつ予防歯科材料．材料技術 10:1-9, 1985.
- 12) 水沼徹：レジンの象牙質に対する接着と象牙質コラーゲンの構造変化－塩化第二鉄がコラーゲンに与える影響－．歯材器 5:54-64, 1986.
- 13) 永井裕，藤本大三郎：コラーゲン実験法．講談社：東京，1985, pp. 27-28.
- 14) 岡本芳明，石川潔，橋本朋子，廖文銘，新谷英章：酸処理による牛象牙質コラーゲンの変化に及ぼすタンニン酸の効果 1．脱灰象牙質コラーゲンの場合．広大歯誌 20:309-312, 1988.
- 15) 千葉大輔：象牙質内に見出される細胞伸展関連物質に関する研究．広大歯誌 33:71-83, 2001.
- 16) 三木尚：コラーゲンの酸処理に関する化学的研究．日歯保誌 38:275-286, 1995.
- 17) 岡本芳明：コンポジット・レジンが象牙質有機成分に及ぼす影響．QE 4:1097-1101, 1985.
- 18) 化学大辞典編集委員会：化学大辞典5．共立出版：東京，1969, pp. 763-765.
- 19) 神戸博太郎，小澤丈夫：新版 熱分析．講談社サイエンティフィック：東京，1998, pp. 266-270.
- 20) 久保亮五，長倉三郎，井口洋夫，江沢洋：岩波 理化学辞典 第4版．岩波書店：東京，1987, pp. 696-697.
- 21) 松村明：大辞林 第3版．三省堂：東京，2006, p. 1412.

表 1 示差走査熱量測定の場合

雰囲気：大気中

昇温速度：5°C/分

サンプル容器：アルミナ（蓋付き）

リファレンス： α -アルミナ

試料量：テンドン 2mg, 蒸留水 10ml

解析ソフト：Thermo Plus シリーズ

熱分析基本ソフト

表3 1%または10%タンニン酸溶液に30秒, 30分, 24時間浸漬したテンドンを
 40%リン酸溶液または10%クエン酸溶液に浸漬した場合のテンドンの変化
 (○:変化なし, △:一部ゼラチン, ×:ゼラチン)

	タンニン酸 処理なし	1%タンニン酸溶液			10%タンニン酸溶液		
		30秒	30分	24時間	30秒	30分	24時間
40%リン酸溶液	×	×	△	○	×	△	○
10%クエン酸溶液	△	△	△	○	△	△	○

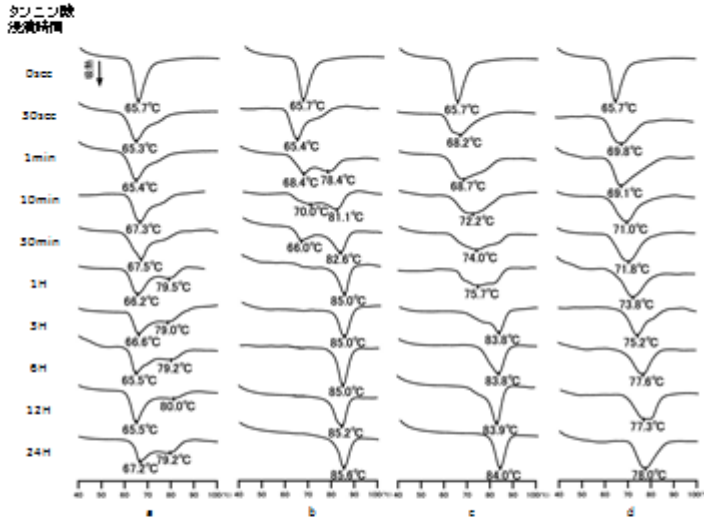


図1 0.1%、1%、10%、20%タンニン酸溶液に30秒間、1、10、30分間、1、3、6、12、24時間浸漬したテンドンの示差走査熱量測定装置による熱変性温度の測定例(ピーク温度:°C)

- a. 0.1%タンニン酸溶液
- b. 1%タンニン酸溶液
- c. 10%タンニン酸溶液
- d. 20%タンニン酸溶液

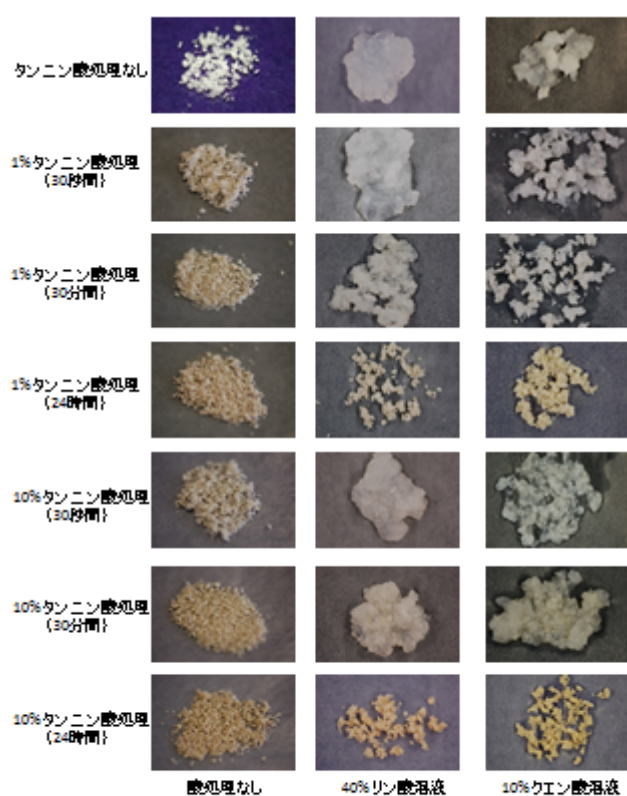


図2 1%または10% タンニン酸溶液に30秒間、30分間、24時間浸漬したテンドンに40%リン酸溶液または10%クエン酸溶液を作用させた場合の変化

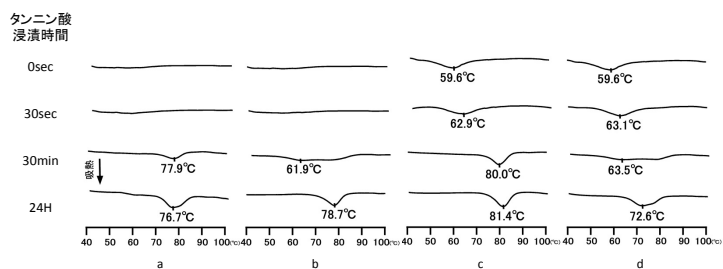


図3 1%または10%タンニン酸溶液に30秒、30分、24時間浸漬したテンドンを、40%リン酸溶液または10%クエン酸溶液に浸漬した場合の示差走査熱量測定装置による熱変性温度の測定(ピーク温度:°C)

- a. 1%タンニン酸処理テンドンに40%リン酸を作用させた場合
- b. 10%タンニン酸処理テンドンに40%リン酸を作用させた場合
- c. 1%タンニン酸処理テンドンに10%クエン酸を作用させた場合
- d. 10%タンニン酸処理テンドンに10%クエン酸を作用させた場合