

エッチングモードおよびアドヒーシブ塗布法が
ユニバーサルアドヒーシブの
エナメル質初期接着強さに及ぼす影響

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

廣兼 榮造

(指導：宮崎 真至 教授，高見澤 俊樹 准教授)

概 要

ユニバーサルアドヒーシブは、シングルステップセルフエッチングシステムから発展したもので、歯質に対してエッチ&リンス、セルフエッチングあるいはセレクトィブエッチングの、異なるエッチングモードで使用することを可能としている。また、様々な被着体に対して前処理を必要とすることなく接着性を有するところから、その応用範囲が広いという特徴を有している。

光重合型コンポジットレジン修復においては、修復直後からレジンペーストの重合収縮あるいは形態修正および研磨などによって接着界面に様々な応力が負荷される。一方、シングルステップセルフエッチングシステムは、2ステップセルフエッチングシステムに比較して歯質接着性に劣ることが指摘されている。そこで、シングルステップシステムの初期接着性を向上させることを目的として、様々な臨床技法が検討されているものの、ユニバーサルアドヒーシブについては、初期接着性の経時的変化を含めて不明な点が多い。

そこで著者は、ユニバーサルアドヒーシブのエッチングモードおよびアドヒーシブの塗布法が、エナメル質に対する初期接着性に及ぼす影響について検討した。さらに、アドヒーシブ処理面、接着界面および接着試験終了後の破断面の走査電子顕微鏡（SEM）観察を行うことによって、これらを考察資料とした。

供試したユニバーサルアドヒーシブは、Clearfil Universal Bond Quick（CU, Kuraray Noritake Dental）、G-Premio Bond（GP, GC）、Scotchbond Universal（SU, 3M Oral Care）およびTokuyama Universal Bond（TU, Tokuyama Dental）である。

また、対照として 2 ステップセルフエッチングシステムの Clearfil SE Bond (CB, Kuraray Noritake Dental) を用いた。

接着試片の製作および剪断接着強さ試験は、ISO 29022 に準じて行った。被着面に対して、アドヒーシブ塗布前にリン酸エッチングを 15 秒間行うエッチ&リンスモード (以後、ER モード) あるいはこれを行わないセルフエッチングモード (以後、SE モード) の 2 条件を設定した。次いで、それぞれのエッチング条件の被着面にアドヒーシブを各製造者指示条件に従って塗布した条件 (以後、シングルアプリケーション) とともに、アドヒーシブ塗布後、光照射を 10 秒間行った後に、アドヒーシブを再度塗布し、光照射した条件 (以後、ダブルアプリケーション) についても検討した。

次いで、Ultradent 接着試験用治具を被着歯面に固定し、レジンペーストを填塞、照射を行って接着試片とした。製作した接着試片は、5 分、1、6、12 および 24 時間、37°C 精製水中に保管した。所定の保管時間が終了した接着試片について、万能試験機を用いてクロスヘッドスピード 1.0 mm/min の条件で剪断接着強さを測定した。接着試験終了後の試片については、実体顕微鏡を用いてレジン側破断面を観察し、破壊形式を分類した。

ユニバーサルアドヒーシブのエナメル質に対する初期接着強さは、いずれのエッチングモードおよび塗布法にかかわらず、保管期間の延長に伴って向上する傾向を示した。一方、ダブルアプリケーションの効果は、ユニバーサルアドヒーシブと 2 ステップ接着システムの CB では異なる傾向を示した。同一の保管

期間で比較した接着強さは、ほとんどのユニバーサルアドヒーズはいずれのエッチングモードにおいてもダブルアプリケーション群がシングルアプリケーション群に比較して有意に高い値を示した。供試したユニバーサルアドヒーズにおいては、いずれのエッチングモードにおいてもアドヒーズのダブルアプリケーションは接着強さの向上に寄与することが明らかとなった。しかし、ER モードではアドヒーズの種類によってダブルアプリケーションの効果は異なる傾向を示した。SE モードでの破壊形式は、供試したいずれのユニバーサルアドヒーズにおいても、塗布法および保管期間の違いにかかわらず、すべて界面破壊であった。ER モードにおいて、ユニバーサルアドヒーズの 5 分および 1 時間保管群では、いずれの塗布法においてもすべて界面破壊を示した。しかし、GP を除く 6、12 および 24 時間保管群では、塗布法にかかわらず界面破壊とエナメル質の凝集破壊との混合破壊が散見された。また、SEM 観察からユニバーサルアドヒーズのアドヒーズ層の厚みはいずれのエッチングモードにおいても同等であり、シングルアプリケーション群では約 10 μm 、ダブルアプリケーション群では約 20 μm であった。

以上のように本実験の結果から、エナメル質の接着初期においては、いずれのアドヒーズにおいても 24 時間後として比較して接着強さが低いことが判明した。したがって、ユニバーサルアドヒーズのエナメル質初期接着性の向上には、リン酸エッチングの併用およびアドヒーズのダブルアプリケーションが有効であることが示唆された。

なお、本論文は原著論文 Hirokane E, Takamizawa T, Kasahara Y, Ishii R, Tsujimoto A, Barkmeier WW, Latta MA, Miyazaki M (2021) Effect of double-layer application on the early enamel bond strength of universal adhesives. Clin Oral Investig 25, 907-921. を基幹論文とし、データを新たに加えることによって総括したものである。

緒 言

ユニバーサルアドヒーシブは、シングルステップセルフエッチングシステムから発展したもので、歯質に対してエッチ&リンス、セルフエッチングあるいはセレクトィブエッチングの、異なるエッチングモードを使用することを可能としている¹⁻³⁾。また、様々な被着体に対して前処理を必要とすることなく接着性を有するところから、その応用範囲が広いという特徴を有している^{4,5)}。

光重合型コンポジットレジン（以後、光重合型レジン）修復においては、修復直後からレジンペーストの重合収縮あるいは形態修正および研磨などによって接着界面に様々な応力が負荷される⁶⁻⁸⁾。一方、シングルステップセルフエッチングシステムは、2ステップセルフエッチングシステムに比較して歯質接着性に劣ることが指摘されている^{9,10)}。そこで、シングルステップシステムの初期接着性を向上させることを目的として、様々な臨床技法が検討されてきた¹¹⁻¹⁴⁾。しかし、ユニバーサルアドヒーシブについては、初期接着性の経時的変化を含めて不明な点が多い。

そこで著者は、エッチングモードおよびアドヒーシブの塗布法が、ユニバーサルアドヒーシブのエナメル質に対する初期接着性に及ぼす影響について検討した。さらに、アドヒーシブ処理面、接着界面および接着試験終了後の破断面の走査電子顕微鏡（SEM）観察を行うことによって、これらを考察資料とした。

材料および方法

1. 供試材料および可視光線照射器

供試したユニバーサルアドヒーシブは， Clearfil Universal Bond Quick (CU, Kuraray Noritake Dental) ， G-Premio Bond (GP, GC) ， Scotchbond Universal (SU, 3M Oral Care) および Tokuyama Universal Bond (TU, Tokuyama Dental) である。また，対照として 2 ステップセルフエッチングシステムの Clearfil SE Bond (CB, Kuraray Noritake Dental) を用いた (Table 1) 。エッチング剤として Ultra-Etch (Ultradent Products) を，コンポジットレジンとして Clearfil AP-X (Kuraray Noritake Dental) を用いた。可視光線照射器 (Optilux 501, Kerr) は，その光強度が 600 mW/cm^2 以上であることを確認して使用した。

2. 接着試験

1) 被着歯面の調整

接着試験に使用した歯は，ウシ (2~3 歳齢) 下顎前歯で，抜歯後直ちに抜髄し，歯根を切断して歯冠部のみを常温重合型レジン (Tray Resin II, Shofu) に包埋した。次いで，直径 4~5 mm のエナメル質平坦面が得られるようにモデルトリマーを用いて唇側中央部を研削した後，平坦面を耐水性研磨紙の #320 を用いて研削し，エナメル質被着面とした。

2) 接着強さ測定用試片 (接着試片) の製作および保管条件

接着試片の製作および剪断接着強さ試験は，ISO 29022: 2013 Dentistry - Adhesion - Notched-edge shear bond strength test¹⁵⁾ に準じて行った。被着面に対

して、アドヒーシブ塗布前にリン酸エッチングを 15 秒間行うエッチ&リンスモード（以後、ER モード）あるいはこれを行わないセルフエッチングモード（以後、SE モード）の 2 条件を設定した。次いで、それぞれのエッチング条件の被着面にアドヒーシブを各製造者指示条件に従って塗布した条件（以後、シングルアプリケーション）とともに、アドヒーシブ塗布後、光照射を 10 秒間行った後に、アドヒーシブを再度塗布し、光照射した条件（以後、ダブルアプリケーション）についても検討した（Table 2）。

次いで、Ultradent 接着試験用治具（Ultradent Products）を被着歯面に固定し、レジンペーストを填塞、照射を行って接着試片とした。製作した接着試片は、5 分、1、6、12 および 24 時間、37°C 精製水中に保管した。なお、試片の数は各条件について 15 個とした。

3) 接着強さの測定

所定の保管時間が終了した接着試片について、万能試験機（Type 5500R, Instron）を用いてクロスヘッドスピード 1.0 mm/min の条件で剪断接着強さを測定した。接着試験終了後の試片については、実体顕微鏡を用いてレジン側破断面を観察し、破壊形式を分類した。

3. SEM 観察

アドヒーシブ塗布後のエナメル質処理面、接着界面および接着試験終了後の破断面について SEM 観察を行った。すなわち、エナメル質処理面については、アドヒーシブ処理した被着面をアセトンおよび蒸留水で 15 秒間ずつ交互洗浄

することを3回繰り返して、SEM観察用試片とした。エナメル質接着界面のSEM観察用試片は、接着試片と同様に製作し、エポキシ樹脂に包埋した。樹脂が硬化した後、自動精密切断機 (IsoMet 1000 Low Speed Saw, Buehler) を用いて縦断し、この面をダイヤモンドペーストの粒径 $0.25\ \mu\text{m}$ まで順次研磨した。

エナメル質処理面および接着界面観察用試片は、*tert*-ブタノール上昇系列に順次浸漬した後、凍結乾燥 (Model ID-3, Elionix) を行った。接着界面観察用試片には、加速電圧 $1.0\ \text{kV}$ 、イオン流密度 $1.2\ \text{mA}/\text{cm}^2$ の条件でアルゴンイオンエッチング (EIS-200 ER, Elionix) を40秒間行った。また、接着試験終了後の破断面のSEM観察に際しては、レジン側破断試片を3分間超音波洗浄し、これを乾燥させた。

すべての試片に対しては、イオンコーター (Quick Coater Type SC-201, Sanyu Electric) を用いて金蒸着し、フィールドエミッションSEM (ERA-8800 FE, Elionix) を用いて加速電圧 $10\ \text{kV}$ の条件で観察した。

4. 統計解析

得られた接着強さについて、等分散性を確認した後、三元配置分散分析およびTukey HSD test を用いて有意水準5%の条件で多重比較検定を行った。

成 績

1. 接着強さ

異なるエッチングモードおよび塗布法が，ユニバーサルアドヒーシブの初期エナメル質接着強さに及ぼす影響の成績を Table 3 および 4 に示した。三元配置分散分析の結果から，いずれのエッチングモードにおいても塗布法，保管期間およびアドヒーシブの種類は，接着強さへの有意な影響因子であった ($p < 0.001$)。また，各因子での相互作用はいずれのエッチングモードにおいても有意であった ($p < 0.05$)。

各条件におけるエナメル質接着強さは，SE モード (Table 3) でのシングルアプリケーション群においては，CU で 16.5~26.9 MPa，GP で 21.4~28.9 MPa，SU で 14.8~28.6 MPa，TU で 15.4~29.6 MPa および CB で 30.5~41.6 MPa であった。ダブルアプリケーション群では，CU で 22.6~34.1 MPa，GP で 25.4~34.4 MPa，SU で 24.8~36.4 MPa，TU で 21.8~36.1 MPa および CB で 32.3~40.9 MPa であった。すべてのユニバーサルアドヒーシブで，ダブルアプリケーション条件はシングルアプリケーション条件に比較して高い値を示す傾向が認められた。

一方，対照とした 2 ステップ接着システムの CB では，いずれの保管期間においてもシングルアプリケーション条件とダブルアプリケーション条件との間に有意差は認められなかった。また，すべてのアドヒーシブにおいて，いずれの塗布法においても接着強さは保管期間の延長に伴って上昇する傾向を示した。

シングルアプリケーション条件における 5 分群での接着強さを 100%とした際の他の保管期間における接着強さは、99.4~245.9%であった (Fig. 1)。

ER モード (Table 4) でのシングルアプリケーション条件においては、CU で 28.0~46.8 MPa, GP で 26.4~35.0 MPa, SU で 27.2~39.1 MPa, TU で 26.6~42.8 MPa および CB で 37.6~44.8 MPa であった。ダブルアプリケーション群では、CU で 34.9~47.5 MPa, GP で 29.7~34.5 MPa, SU で 30.0~46.4 MPa, TU で 30.6~50.3 MPa および CB で 37.2~46.6 MPa を示した。すべてのアドヒーズブで、いずれの塗布条件においても接着強さは保管期間の延長に伴って上昇した。アドヒーズブの塗布法で比較すると、いずれの塗布条件においても同一保管期間で有意差が認められない製品 (GP, CB), 保管期間の延長に伴ってダブルアプリケーション条件で有意に高い値を示した製品 (SU, TU) あるいは初期ではダブルアプリケーション条件で有意に高い値を示したものの、保管期間の延長に伴って差が認められなくなった製品 (CU) とに大別された。シングルアプリケーション条件の保管期間 5 分での接着強さを 100%とした際、他の保管期間における接着強さは、98.9~189.1%であった (Fig. 2)。

2. 破壊形式の分析

SE モードでの破壊形式は、供試したいずれのユニバーサルアドヒーズブにおいても、塗布法および保管期間の違いにかかわらず、すべて界面破壊であった。一方、CB においてはシングルアプリケーション条件では界面破壊が大勢を占めたものの、ダブルアプリケーション条件では保管期間の延長に伴って、界面破

壊とアドヒーズの凝集破壊との混合破壊およびエナメル質での凝集破壊が増加した。ER モードにおいて、ユニバーサルアドヒーズの 5 分および 1 時間保管群では、いずれの塗布法においてもすべて界面破壊を示した。しかし、GP を除く 6, 12 および 24 時間保管群では、塗布法にかかわらず界面破壊とエナメル質の凝集破壊との混合破壊が散見された。

3. SEM 観察

エナメル質処理面の SEM 像を Fig. 3 に示した。耐水性研磨紙研削面は、削条痕とともにスミア層が残留していた (Fig. 3a)。一方、リン酸エッチング処理面は、スミア層が完全に除去され、明瞭なエッチングパターンが観察された (Fig. 3b)。SE モードでのエナメル質処理面は、ユニバーサルアドヒーズの CU では明瞭なエッチングパターンは観察されず、部分的にスミア層が残留した像を示した (Fig. 3c)。一方、対照とした CB では、スミア層の除去とともに、不明瞭ではあるもののエッチングパターンが観察された (Fig. 3e)。ER モードではいずれのアドヒーズにおいても明瞭なエッチングパターンが観察された (Figs. 3d, f)。

エナメル質接着界面の SEM 像を Figs. 4, 5 に示した。CU の SE モードにおいては、レジンモノマーがスミア層を取り込んで形成されたハイブリッドスミア層 (HSL) が観察された (Figs. 4a, b)。一方、ER モードでは、スミア層が完全に除去されるとともに明瞭なレジンタグが観察された (Figs. 4c, d)。アドヒーズ層の厚みは、いずれのエッチングモードにおいても同等であり、シ

シングルアプリケーション群では約 10 μm ，ダブルアプリケーション群では約 20 μm であった。対照とした CB の SE モードでは，いずれの塗布法においても明瞭なスミア一層の残留は観察されなかったものの (Figs. 5a, b) ， ER モードにおいてはユニバーサルアドヒーズと類似した像を示し，明瞭なレジンタグが観察された (Figs. 5c, d) 。

接着試験後のレジン側破断面の SEM 像を Figs. 6, 7 に示した。CU の保管 5 分におけるシングルアプリケーション群では，低倍率ではいずれのエッチングモードにおいても気泡が散見された (Figs. 6a, e) 。一方，保管 5 分のダブルアプリケーション群では，低倍率でいずれのエッチングモードにおいてもアドヒーズ層内に亀裂進展が観察された (Figs. 6b, f) 。また，保管 24 時間ではいずれの塗布法およびエッチングモードにおいてもアドヒーズ層内に亀裂進展およびエナメル質の凝集破壊が観察された (Figs. 6c, d, g, h) 。対照とした CB の保管 5 分におけるシングルアプリケーション群では，低倍率でいずれのエッチングモードにおいても比較的平坦な破断様相を呈したものの，ER モードの高倍率ではアドヒーズ層内での亀裂進展およびエナメル質の凝集破壊が観察された (Figs. 7e, f) 。また，保管 5 分におけるダブルアプリケーション群では，低倍率においてもアドヒーズ層内での亀裂進展およびエナメル質での凝集破壊が観察された (Fig. 7f) 。一方，保管 24 時間では，いずれの塗布法およびエッチングモードにおいてもアドヒーズ層内での亀裂進展およびエナメル質の凝集破壊を含んだ複雑な破断様相を呈した (Figs. 7c, d, g, h) 。

考 察

ユニバーサルアドヒーシブの臨床使用術式を確立する研究の一環として、エッチングモードおよびアドヒーシブの塗布法が初期エナメル質接着性に及ぼす影響について検討した。その結果、ユニバーサルアドヒーシブのエナメル質に対する初期接着強さは、エッチングモードおよび塗布法にかかわらず、保管期間の延長に伴って向上する傾向を示した。

経時的な接着強さの上昇傾向は、アドヒーシブの種類によって異なる傾向を示した。すなわち、シングルアプリケーション条件における5分群をベースラインとすると、ユニバーサルアドヒーシブの接着強さの経時変化は、2ステップ接着システムのCBに比較して高くなる傾向を示した。ユニバーサルアドヒーシブは、1液あるいは2液性の製品があり、アドヒーシブを塗布することで、歯質の脱灰、レジンモノマーの浸透および重合硬化を可能としている¹⁶⁾。また、汎用性を付与するために、アドヒーシブ中にシランカップリング剤を添加した製品もあり、それらの組成は複雑である。そのために、ユニバーサルアドヒーシブにおいては経時的な接着強さの変化が大きくなったものと考えられた。

一方、ダブルアプリケーションの効果は、ユニバーサルアドヒーシブと2ステップ接着システムのCBでは異なる傾向を示した。すなわち、同一の保管期間で比較した接着強さは、ほとんどのユニバーサルアドヒーシブでは、いずれのエッチングモードにおいてもダブルアプリケーション群がシングルアプリケ

ーション群に比較して有意に高い値を示した。この結果は、ユニバーサルアドヒーシブのダブルアプリケーションについて接着疲労試験から検討した報告と一致するものであった¹⁴⁾。この理由として、アドヒーシブ層の厚みが増すことによって接着界面付近で生じる応力が効果的に分散したために、結果として接着強さが向上した可能性が考えられた¹⁷⁻¹⁹⁾。

供試したユニバーサルアドヒーシブにおいては、いずれのエッチングモードにおいてもアドヒーシブのダブルアプリケーションは接着強さの向上に寄与することが明らかとなった。しかし、ERモードではアドヒーシブの種類によってダブルアプリケーションの効果は異なる傾向を示した。すなわち、GPでは同一保管期間で塗布法の違いによる接着強さに有意差は認められなかったものの、SUおよびTUでは保管期間の延長に伴ってダブルアプリケーション条件で有意に高い値を示した。また、CUにおいては保管期間の初期ではダブルアプリケーション条件で有意に高い値を示したものの、保管期間の延長に伴って塗布法間で有意差は認められなかった。このような違いが生じた理由として、用いたユニバーサルアドヒーシブのpH、組成、エアブローあるいはアクティブ処理の有無などが影響を及ぼした可能性が考えられた²⁰⁻²⁷⁾。とくに、組成およびエアブローは、アドヒーシブの経時的な重合性に影響を及ぼす^{21,23)}とともに、pHおよびアクティブ処理の有無はリン酸エッチングによって形成されたエッチングパターンとの機械的嵌合力との相互関係に影響を及ぼすものと考えられた²⁵⁻²⁷⁾。

以上のように本実験の結果から、エナメル質の接着初期においては、いずれのアドヒーズにおいても 24 時間後として比較して接着強さが低いことが判明した。したがって、ユニバーサルアドヒーズのエナメル質初期接着性の向上には、リン酸エッチングの併用およびアドヒーズのダブルアプリケーションが有効であることが示唆された。

結 論

エッチングモードおよびアドヒーシブ塗布法がユニバーサルアドヒーシブのエナメル質初期接着強さに及ぼす影響について検討した結果、以下の結論を得た。

1. ユニバーサルアドヒーシブのエナメル質初期接着性の向上には、リン酸エッチングの併用およびアドヒーシブのダブルアプリケーションが有効であった。
2. いずれのエッチングモードにおいても、同一の保管条件では、ユニバーサルアドヒーシブのダブルアプリケーション群はシングルアプリケーション群に比較して高いエナメル質接着強さを示した。
3. 供試したすべてのアドヒーシブにおいて、エッチングモードあるいはアドヒーシブ塗布法の違いにかかわらず保管時間の延長に伴ってエナメル質接着強さは上昇した。
4. ユニバーサルアドヒーシブのアドヒーシブ層の厚みはいずれのエッチングモードにおいても同等であり、シングルアプリケーション群では約 10 μm 、ダブルアプリケーション群では約 20 μm であった。

文 献

- 1) Takamizawa T, Barkmeier WW, Tsujimoto A, Berry TP, Watanabe H, Erickson RL, Latta MA, Miyazaki M (2016) Influence of different etching modes on bond strength and fatigue strength to dentin using universal adhesive systems. *Dent Mater* 32, e9-e21.
- 2) Suzuki T, Takamizawa T, Barkmeier WW, Tsujimoto A, Endo H, Erickson RL, Latta MA, Miyazaki M (2016) Influence of etching mode on enamel bond durability of universal adhesive systems. *Oper Dent* 41, 520-530.
- 3) Nagarkar S, Theis-Mahon N, Perdigão J (2019) Universal dental adhesives: Current status, laboratory testing, and clinical performance. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 107, 2121-2131.
- 4) Siqueria F, Cardenas AM, Cutierrez MF, Malaquias P, Hass V, Reis A, Loguericio AD, Perdigão J (2016) Laboratory performance of universal adhesive systems for luting CAD/CAM restorative materials. *J Adhes Dent* 18, 331-340.
- 5) Tsujimoto A, Barkmeier WW, Takamizawa T, Wilwerding TM, Latta MA, Miyazaki M (2017) Interfacial characteristics and bond durability of universal adhesive to various substrates. *Oper Dent* 42, e59-e70.
- 6) Ferracane JL (2008) Buonocore lecture. Placing dental composites—a stressful experience. *Oper Dent* 33, 247-257.

- 7) Petrovic LM, Atanackovic TM (2008) A model for shrinkage strain in photo polymerization of dental composites. *Dent Mater* 24, 556-560.
- 8) Irie M, Maruo Y, Nishigawa G (2017) Performance of class I composite restorations when polished immediately or after one-day water storage. *PLoS One* 12, e0183381.
- 9) Takamizawa T, Barkmeier WW, Tsujimoto A, Scheidel DD, Erickson RL, Latta MA, Miyazaki M (2015) Effect of phosphoric acid pre-etching on fatigue limits of self-etching adhesives. *Oper Dent* 40, 379-395.
- 10) Suzuki S, Takamizawa T, Imai A, Tsujimoto A, Sai K, Takimoto M, Barkmeier WW, Latta MA, Miyazaki M (2018) Bond durability of universal adhesive to bovine enamel using self-etch mode. *Clin Oral Investig* 22, 1113-1122.
- 11) Shiratsuchi K, Tsujimoto A, Takamizawa T, Furuichi T, Tsubota K, Kurokawa H, Miyazaki M (2013) Influence of warm air-drying on enamel bond strength and surface free-energy of self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci* 121, 370-376.
- 12) Perdigão J, Muñoz MA, Sezinando A, Luque-Martinez IV, Staichak R, Reis A, Loguercio AD (2014) Immediate adhesive properties to dentin and enamel of a universal adhesive associated with a hydrophobic resin coat. *Oper Dent* 39, 489-499.
- 13) Sezinando A, Luque-Martinez IV, Muñoz MA, Reis A, Loguercio AD, Perdigão J (2015) Influence of a hydrophobic resin coating on the immediate and 6-month dentin bonding of three universal adhesives. *Dent Mater* 31, e236-e246.

- 14) Fujiwara S, Takamizawa T, Barkmeier WW, Tsujimoto A, Imai A, Watanabe H, Erickson RL, Latta MA, Nakatsuka T, Miyazaki M (2018) Effect of double-layer application on bond quality of adhesive systems. *J Mech Behav Biomed Mater* 77, 501-509.
- 15) ISO 29022: 2013 Dentistry-Adhesion-Notched-edge shear bond strength test. 1st edn. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, ISO (2013) 1-12.
- 16) Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL (2011) State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater* 27, 17-28.
- 17) Wakasa K, Yamaki M, Matsui A (1995) Calculation models for average stress and plastic deformation zone size of bonding area in dentine bonding systems. *Dent Mater J* 14, 152-165.
- 18) Ausiello P, Apicella A, Davidson CL (2002) Effect of adhesive layer properties on stress distribution in composite restorations-a 3D finite element analysis. *Dent Mater* 18, 295-303.
- 19) de A Neves A, Coutinho E, Poitevin A, Van der Sloten J, Van Meerbeek B, Van Oosterwyck H (2009) Influence of joint component mechanical properties and adhesive layer thickness on stress distribution in micro-tensile bond strength specimens. *Dent Mater* 25, 4-12.

- 20) Salz U, Zimmermann J, Salzer T (2005) Self-curing, self-adhesive cements systems. *J Adhes Dent* 7, 7-17.
- 21) Chiba Y, Yamaguchi K, Miyazaki M, Tsubota K, Takamizawa T, Moore BK (2006) Effect of air-drying time of single-application self-etch adhesives on dentin bond strength. *Oper Dent* 31, 233-239.
- 22) Vrochari AD, Eliades G, Hellwig E, Wrbas KT (2009) Curing efficiency of four self-etching, self-adhesive resin cements. *Dent Mater* 25, 1104-1108.
- 23) Ogura Y, Shimizu Y, Shiratsuchi K, Tsujimoto A, Takamizawa T, Ando S, Miyazaki M (2012) Effect of warm air-drying on dentin bond strength of single-step self-etch adhesives. *Dent Mater* 31, 507-513.
- 24) Zorzini J, Petschelt A, Ebert J, Lohbauer U (2012) pH neutralization and influence on mechanical strength in self-adhesive resin luting agents. *Dent Mater* 28, 672-679.
- 25) Imai A, Takamizawa T, Sai K, Tsujimoto A, Nojiri K, Endo H, Barkmeier WW, Latta MA, Miyazaki M (2017) Influence of application method on surface free energy and bond strength of universal adhesive systems to enamel. *Eur J Oral Sci* 125, 385-395.
- 26) Moritake N, Takamizawa T, Ishii R, Tsujimoto A, Barkmeier WW, Latta MA, Miyazaki M (2019) Effect of active application on bond durability of universal adhesives. *Oper Dent* 44, 188-199.

27) Saito T, Takamizawa T, Ishii R, Tsujimoto A, Hirokane E, Barkmeier WW, Latta MA, Miyazaki M (2020) Influence of application time on dentin bond performance in different etching modes of universal adhesives. *Oper Dent* 45, 183-195.

表および図

Table 1 *Materials used in this study*

Code	Adhesive (Lot. no)	Main components	pH	Manufacturer
CU	Clearfil Universal Bond Quick (9T0050)	bis-GMA, MDP, HEMA, hydrophilic amide monomer, filler, ethanol, water, NaF, photo initiators, silane coupling agent, others	2.3	Kuraray Noritake Dental, Tokyo, Japan
GP	G-Premio Bond (4G0011)	MDP, 4-MET, MEPS, BHT, acetone, dimethacrylate resins, initiators, filler, water	1.5	GC, Tokyo, Japan
SU	Scotchbond Universal (41256)	MDP, HEMA, dimethacrylate resins, Vitrebond copolymer, filler, ethanol, water, initiators, silane	2.7	3M Oral Care, St. Paul, MN, USA
TU	Tokuyama Universal Bond (004067)	Liquid A: phosphate monomer, bis-GMA, TEGDMA, HEMA, MTU-6, others Liquid B: acetone, isopropanol, water, acryl borate catalyst, γ -MPTES, peroxide, others	2.2	Tokuyama Dental, Tokyo, Japan
CB	Clearfil SE Bond (Primer: 5852494) (Adhesive: 5847004)	Primer: MDP, HEMA, water, initiators Adhesive: MDP, HEMA, bis-GMA, initiators, microfiller	2.0 (Primer)	Kuraray Noritake Dental
Pre-etching agent				
	Ultra-Etch (G017)	35% phosphoric acid		Ultradent Products, South Jordan, UT, USA
Resin composite				
	Clearfil AP-X (380094)	bis-GMA, TEGDMA, silane barium glass filler, silane, silica filler, silanated colloidal silica, CQ, pigments, others		Kuraray Noritake Dental

bis-GMA: 2,2-bis[4-(2-hydroxy-3-methacryloyloxypropoxy) phenyl] propane, MDP: 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate, HEMA: 2-hydroxyethyl methacrylate, 4-MET: 4-methacryloyloxyethyl trimellitate, MEPS: methacryloyloxyalkyl thiophosphate methylmethacrylate, BHT: butylated hydroxytoluene, TEGDMA: triethyleneglycol dimethacrylate, MTU-6: 6-methacryloyloxyhexyl-2-thiouracil-5-carboxylate, γ -MPTES: γ -methacryloyloxypropyltriethoxysilane

Table 2 *Application protocol for pre-etching and universal adhesives*

Etching mode	Pre-etching protocol
SE (self-etch)	Phosphoric acid pre-etching was not performed.
ER (etch-and-rinse)	Enamel surface was phosphoric acid etched for 15 s. Etched surface was rinsed with water for 15 s (three-way dental syringe) and air-dried until white turbidity was visible.
Adhesive	Adhesive application protocol
CU	Single layer Adhesive was applied to air-dried enamel surface for 10 s and then medium air pressure was applied over the liquid adhesive for 5 s or until the adhesive no longer moved and the solvent had completely evaporated. Light irradiated for 10 s.
	Double layer The above application procedure was performed twice, applying the second coat of adhesive immediately after completing light irradiation.
GP	Single layer Adhesive was applied to air-dried enamel surface for 10 s and then a strong stream of air applied over the liquid adhesive for 5 s or until the adhesive no longer moved and the solvent had completely evaporated. Light irradiated for 10 s.
	Double layer The above application procedure was performed twice, applying the second coat of adhesive immediately after completing light irradiation.
SU	Single layer Adhesive was applied to air-dried enamel surface with rubbing motion for 20 s and then medium air pressure was applied over the liquid adhesive for 5 s. Light irradiated for 10 s.
	Double layer The above application procedure was performed twice, applying the second coat of adhesive immediately after completing light irradiation.
TU	Single layer Adhesive was applied to the air-dried enamel surface for 10 s and then medium air pressure was applied over the liquid adhesive for 5 s. No light irradiation.
	Double layer The above application procedure was performed twice. After air blowing the first layer, the second layer of adhesive was applied for 10 s. No light irradiation.
CB	Single layer Primer was applied to air-dried enamel surfaces for 20 s followed by medium air pressure was applied to surfaces for 5 s. Adhesive was then applied to primed surfaces and was air thinned gently. Adhesive was light irradiated for 10 s.
	Double layer The primer was applied once, followed by two applications of adhesive, as above. Applying the second coat of adhesive immediately after completing light irradiation.

Table 3 Influence of adhesive layer on early enamel bond strength (self-etch mode)

	5 min		1 h		6 h		12 h		24 h	
	Single layer	Double layer	Single layer	Double layer	Single layer	Double layer	Single layer	Double layer	Single layer	Double layer
CU	16.6 (1.1) ^{cC} [100%]	22.6 (2.4) ^{bCB} [136.1%]	16.5 (1.2) ^{cC} [99.4%]	24.0 (3.8) ^{cB} [144.6%]	16.9 (1.9) ^{cC} [101.8%]	31.2 (3.5) ^{bA} [188.0%]	22.9 (3.0) ^{cB} [138.0%]	32.8 (5.8) ^{bA} [197.6%]	26.9 (2.2) ^{BB} [162.0%]	34.1 (4.0) ^{bA} [205.4%]
	21.4 (2.5) ^{BD} [100%]	25.4 (1.1) ^{BBB} [118.7%]	21.7 (2.4) ^{BD} [101.4%]	26.0 (3.2) ^{bCBC} [121.5%]	23.8 (2.4) ^{bCD} [111.2%]	25.4 (2.3) ^{bBC} [118.7%]	25.4 (3.7) ^{bCBC} [118.7%]	33.2 (2.2) ^{bA} [155.1%]	28.9 (1.9) ^{BB} [135.0%]	34.4 (4.5) ^{bA} [160.7%]
SU	14.8 (1.4) ^{DE} [100%]	25.0 (2.7) ^{BBB} [168.9%]	18.1 (2.3) ^{cD} [122.3%]	24.8 (3.4) ^{cC} [167.6%]	19.9 (3.0) ^{cD} [134.5%]	28.7 (3.8) ^{bCB} [193.9%]	21.3 (2.0) ^{cD} [143.9%]	32.9 (3.1) ^{bA} [222.3%]	28.6 (1.7) ^{BB} [193.2%]	36.4 (4.5) ^{abA} [245.9%]
	15.4 (1.7) ^{ED} [100%]	21.8 (2.4) ^{cC} [141.6%]	17.1 (2.5) ^{cCD} [111.0%]	29.6 (2.5) ^{BB} [192.2%]	20.7 (4.7) ^{bCC} [134.4%]	30.3 (1.8) ^{BB} [196.8%]	28.1 (3.2) ^{BB} [182.5%]	35.7 (2.9) ^{abA} [231.8%]	29.6 (4.1) ^{BB} [192.2%]	36.1 (1.1) ^{abA} [234.4%]
CB	30.5 (1.4) ^{cC} [100%]	32.3 (1.5) ^{cC} [105.9%]	36.2 (2.3) ^{abB} [118.7%]	36.3 (2.3) ^{abB} [119.0%]	37.5 (1.8) ^{abAB} [122.9%]	39.7 (1.8) ^{abAB} [130.2%]	37.4 (2.9) ^{abAB} [122.6%]	37.5 (3.7) ^{abAB} [122.9%]	41.6 (3.4) ^{abA} [136.4%]	40.9 (3.9) ^{abA} [134.1%]

n = 15, mean (SD) in MPa. Same lowercase letter in vertical columns indicates no difference at 5% significance level.

Same capital letter in horizontal rows indicates no difference at 5% significance level.

Values in parenthesis indicate standard deviation. Percentage values in brackets indicate strength relative to single layer strength at 5 min.

Table 4 Influence of adhesive layer on early enamel bond strength (etch-and-rinse mode)

	5 min		1 h		6 h		12 h		24 h	
	Single layer	Double layer	Single layer	Double layer	Single layer	Double layer	Single layer	Double layer	Single layer	Double layer
CU	28.2 (1.5) ^{bd} [100%]	34.9 (2.2) ^{bc} [123.8%]	28.0 (2.1) ^{bd} [99.3%]	37.0 (3.7) ^{bBC} [131.2%]	34.9 (3.1) ^{bc} [123.8%]	41.0 (3.4) ^{bb} [145.4%]	37.6 (3.2) ^{bBC} [133.3%]	40.1 (3.1) ^{ab} [142.2%]	46.8 (4.5) ^{aA} [166.0%]	47.5 (2.3) ^{abA} [168.4%]
	26.4 (2.0) ^{bc} [100%]	29.7 (2.2) ^{cBC} [112.5%]	29.4 (4.3) ^{bBC} [111.3%]	31.2 (1.7) ^{cAB} [118.2%]	31.0 (3.7) ^{bAB} [117.4%]	32.6 (2.2) ^{cAB} [123.5%]	35.0 (2.5) ^{bcA} [132.6%]	32.3 (2.2) ^{dAB} [122.3%]	34.8 (3.1) ^{cA} [131.8%]	34.5 (2.1) ^{cA} [130.7%]
SU	27.2 (2.7) ^{BE} [100%]	30.0 (3.8) ^{cDE} [110.3%]	29.4 (2.5) ^{bDE} [108.1%]	36.9 (2.8) ^{bc} [135.7%]	31.5 (3.6) ^{bDE} [115.8%]	41.8 (2.1) ^{bb} [153.7%]	32.2 (1.4) ^d [117.5%]	42.9 (2.6) ^{bcAB} [157.7%]	39.1 (4.0) ^{bcBC} [143.8%]	46.4 (3.6) ^{abA} [170.6%]
	26.6 (2.1) ^{BF} [100%]	30.6 (3.0) ^{cEF} [115.0%]	28.1 (1.9) ^{BE} [105.6%]	38.7 (2.7) ^{bc} [145.5%]	34.3 (3.1) ^{bDE} [128.9%]	40.4 (1.8) ^{bbc} [151.9%]	38.6 (2.8) ^{bCD} [145.1%]	43.8 (2.9) ^{abbB} [164.7%]	42.8 (2.5) ^{abBC} [160.9%]	50.3 (5.5) ^{aA} [189.1%]
CB	37.6 (1.1) ^{bc} [100%]	37.2 (2.4) ^{bc} [98.9%]	42.4 (2.0) ^{ab} [112.8%]	44.9 (2.2) ^{abB} [119.4%]	44.8 (2.2) ^{abB} [119.1%]	46.6 (1.6) ^{aA} [123.9%]	44.4 (4.4) ^{aAB} [118.1%]	46.2 (1.7) ^{aA} [122.9%]	44.7 (2.9) ^{aAB} [118.9%]	45.6 (2.8) ^{bAB} [121.3%]

n = 15, mean (SD) in MPa. Same lowercase letter in vertical columns indicates no difference at 5% significance level.

Same capital letter in horizontal rows indicates no difference at 5% significance level.

Percentage values in brackets indicate strength relative to single layer strength at 5 min.

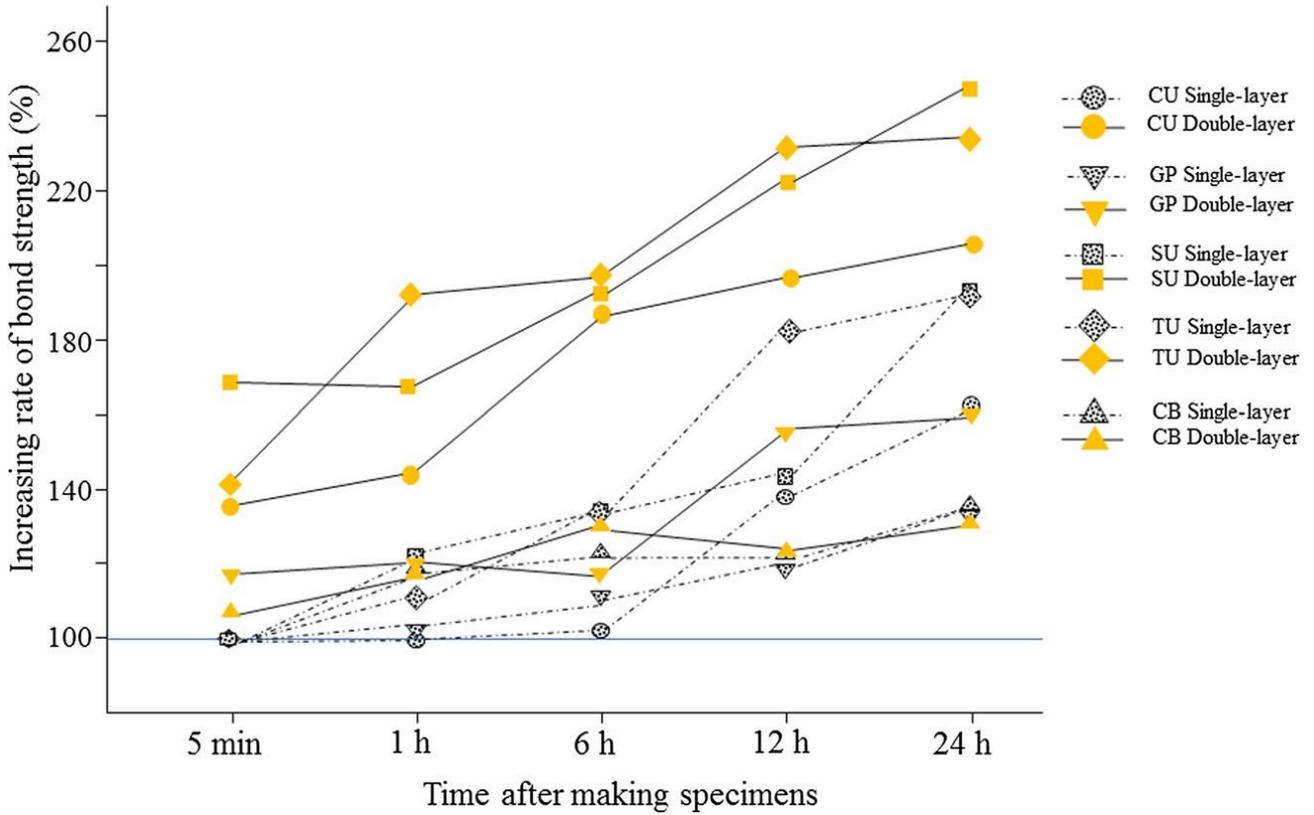


Fig. 1. Changes in shear bond strength (%) in self-etch mode. Abbreviations: CU, Clearfil Universal Bond Quick; GP, G-Premio Bond; SU, Scotchbond Universal; TU, Tokuyama Universal Bond; CB, Clearfil SE bond

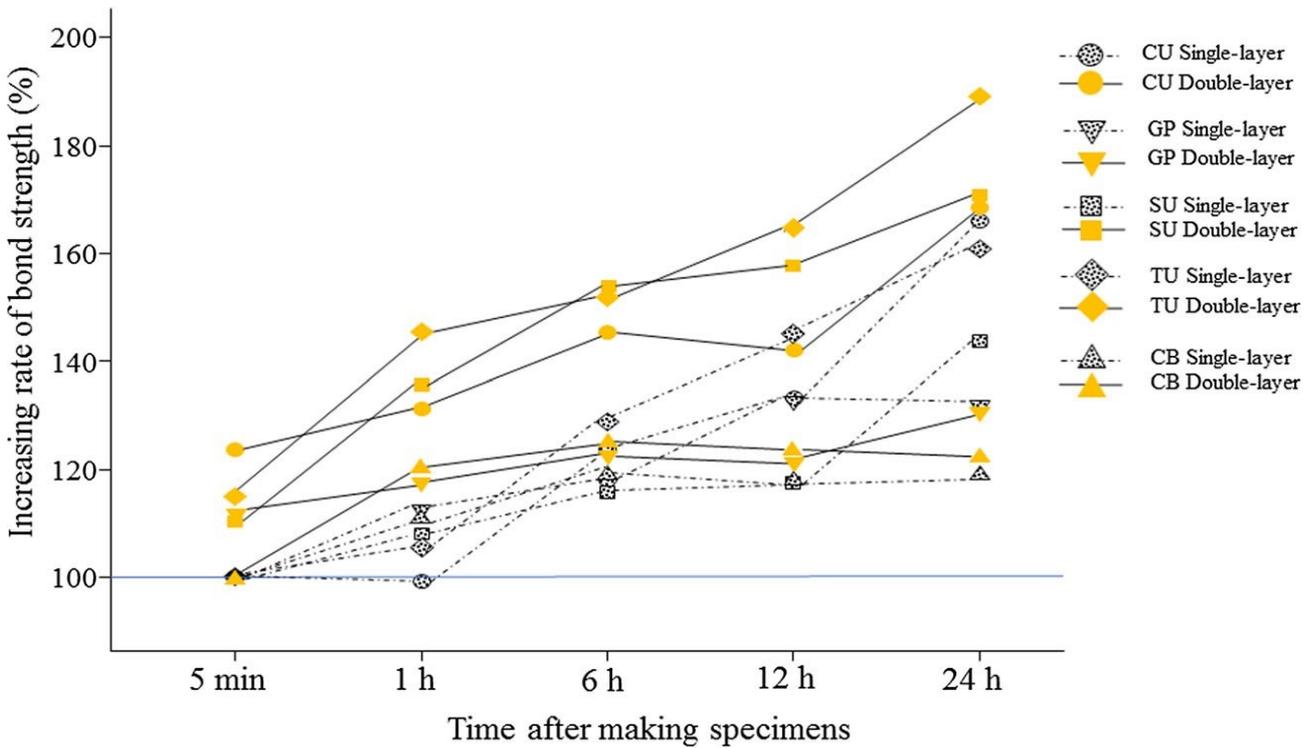


Fig. 2. Changes in shear bond strength (%) in etch-and-rinse mode. Abbreviations: CU, Clearfil Universal Bond Quick; GP, G-Premio Bond; SU, Scotchbond Universal; TU, Tokuyama Universal Bond; CB, Clearfil SE Bond

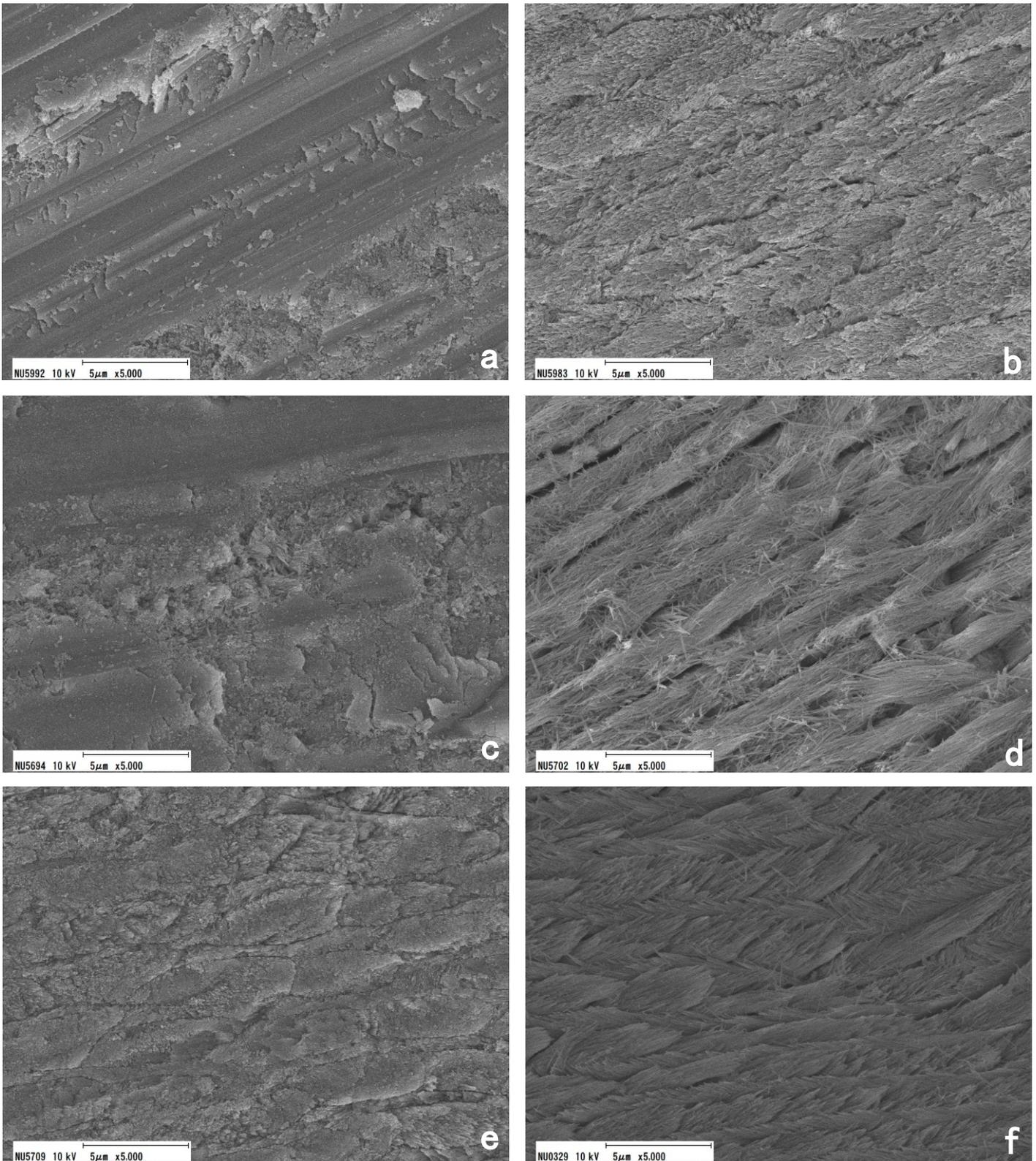


Fig. 3. (a) Representative SEM micrograms of enamel surface ground with #320 SiC paper.
 (b) Representative SEM micrograms of enamel surface etched with phosphoric acid for 15 s.
 (c) Representative SEM micrograms of enamel surfaces treated with CU in SE mode.
 (d) Representative SEM micrograms of enamel surfaces treated with CU in ER mode.
 (e) Representative SEM micrograms of enamel surfaces treated with CB in SE mode.
 (f) Representative SEM micrograms of enamel surfaces treated with CB in ER mode.

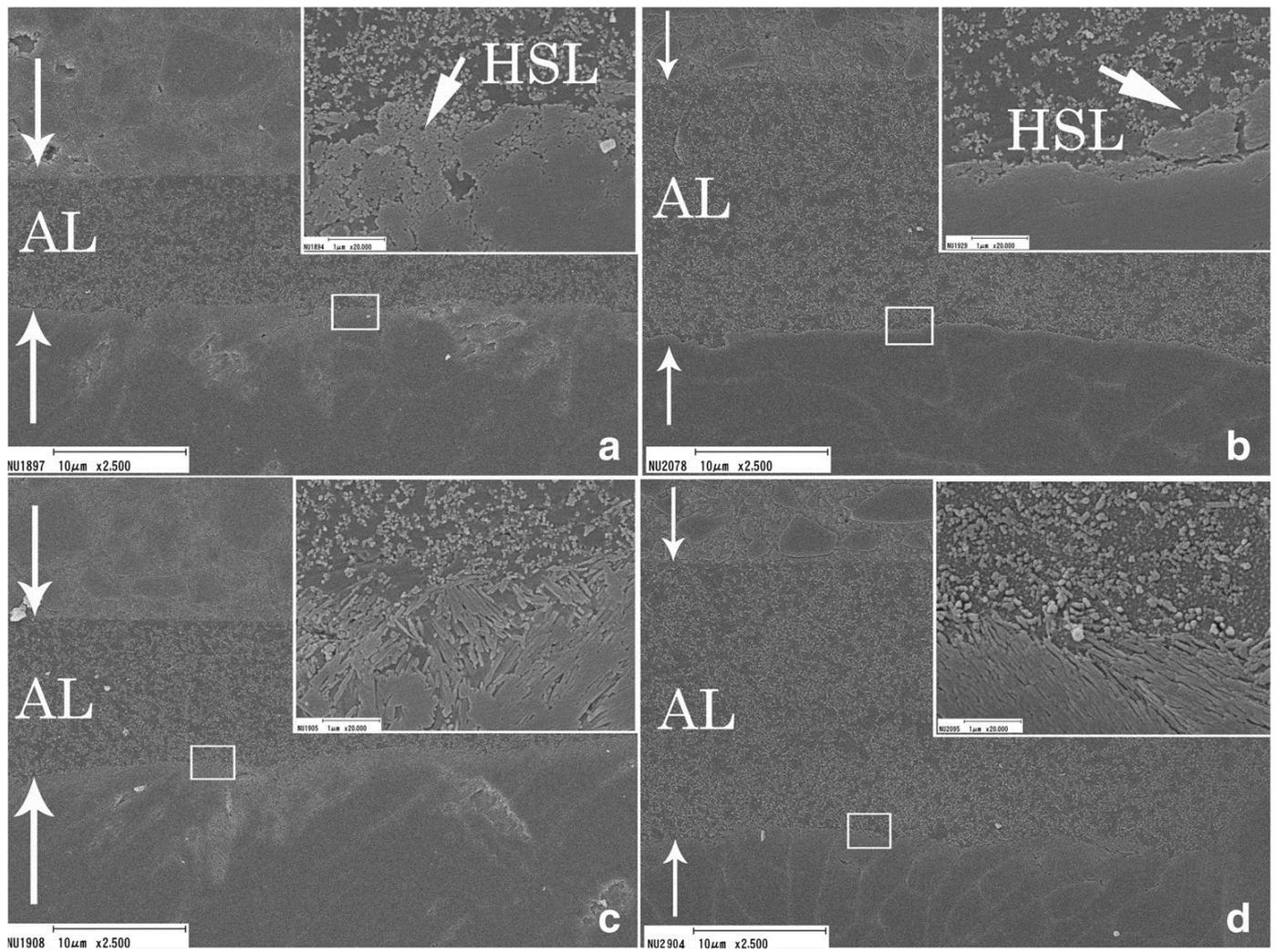


Fig. 4. Representative SEM micrograms of the resin-enamel interface of CU.
 (a) Single-layer application in SE mode at magnifications of $\times 2,500$ and $\times 20,000$.
 (b) Double-layer application in SE mode at magnifications of $\times 2,500$ and $\times 20,000$.
 (c) Single-layer application in ER mode at magnifications of $\times 2,500$ and $\times 20,000$.
 (d) Double-layer application in ER mode at magnifications of $\times 2,500$ and $\times 20,000$.
 Abbreviations: AL, adhesive layer; HSL, hybrid smear layer

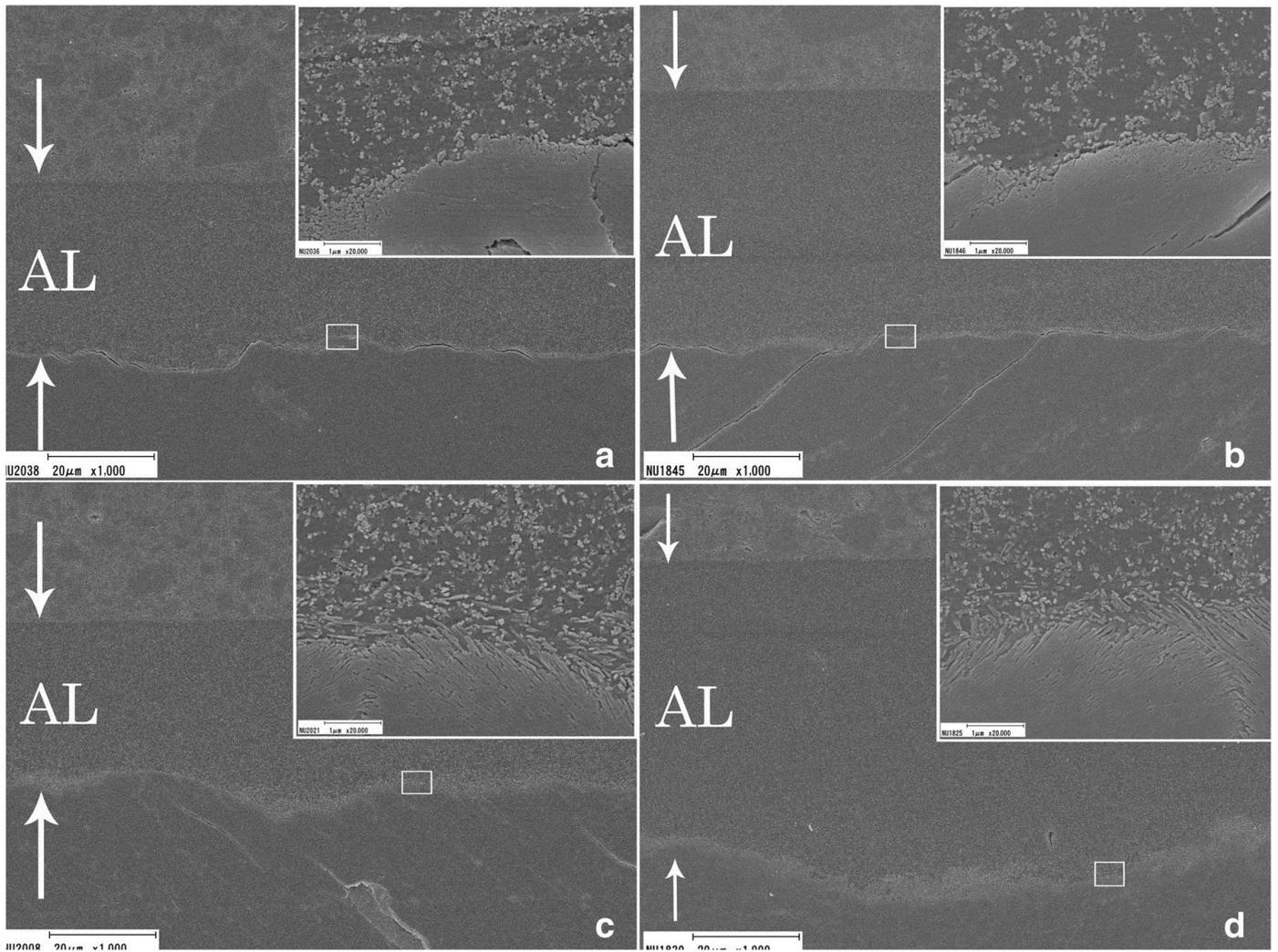


Fig. 5. Representative SEM micrograms of the resin-enamel interface of CB.
 (a) Single-layer application in SE mode at magnifications of $\times 2,500$ and $\times 20,000$.
 (b) Double-layer application in SE mode at magnifications of $\times 2,500$ and $\times 20,000$.
 (c) Single-layer application in ER mode at magnifications of $\times 2,500$ and $\times 20,000$.
 (d) Double-layer application in ER mode at magnifications of $\times 2,500$ and $\times 20,000$.
 Abbreviation: AL, adhesive layer

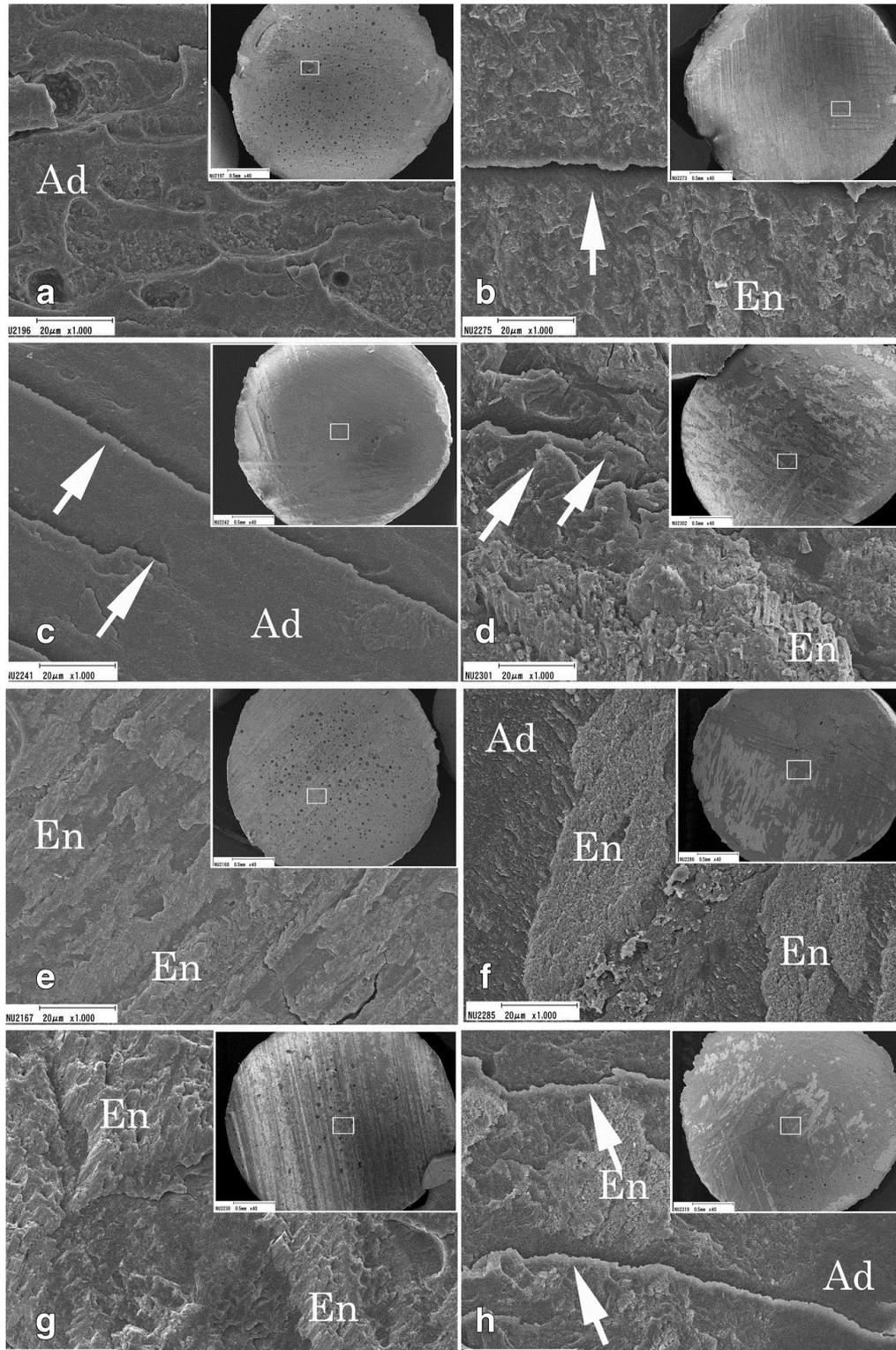


Fig. 6. Representative de-bonded failure sites of CU.

- (a) Single-layer application in SE mode at 5 min at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (b) Double-layer application in SE mode at 5 min at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (c) Single-layer application in SE mode at 24 h at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (d) Double-layer application in SE mode at 24 h at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (e) Single-layer application in ER mode at 5 min at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (f) Double-layer application in ER mode at 5 min at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (g) Single-layer application in ER mode at 24 h at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (h) Double-layer application in ER mode at 24 h at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.

Abbreviations: Ad, adhesive; En, enamel

Arrows indicate cracks and cleavages.

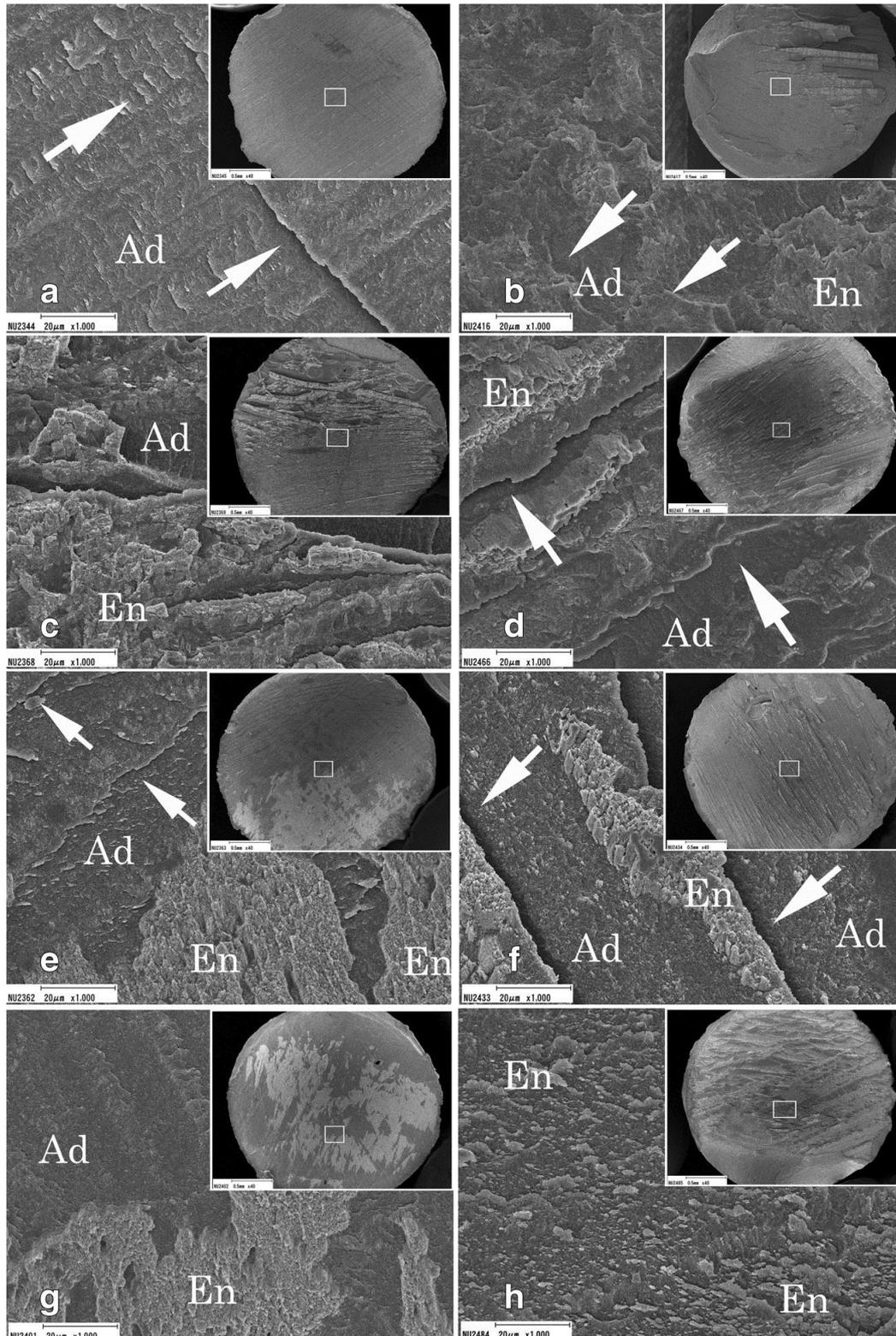


Fig. 7. Representative de-bonded failure sites of CB.

- (a) Single-layer application in SE mode at 5 min at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (b) Double-layer application in SE mode at 5 min at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (c) Single-layer application in SE mode at 24 h at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (d) Double-layer application in SE mode at 24 h at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (e) Single-layer application in ER mode at 5 min at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (f) Double-layer application in ER mode at 5 min at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (g) Single-layer application in ER mode at 24 h at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.
- (h) Double-layer application in ER mode at 24 h at magnifications of $\times 40$ and $\times 1,000$.

Abbreviations: Ad, adhesive; En, enamel.

Arrows indicate cracks and cleavages