

象牙質コーゲンと接着性モノマーの相互作用の解析

福田, 匡輔
九州大学歯学研究科歯学臨床系専攻

<https://doi.org/10.11501/3175002>

出版情報：九州大学, 2000, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

象牙質コラーゲンと
接着性モノマーの相互作用の解析

福 田 匡 輔

①

象牙質コラーゲンと
接着性モノマーの相互作用の解析

福田 匡輔

2000

九州大学大学院歯学研究科歯学臨床系専攻
(九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学)
指導：寺田善博

対象論文

論文の一部は、

K. Fukuda, T. Nezu and Y. Terada; Interaction of water-soluble type I collagen with 2-hydroxyethylmethacrylate observed by differential scanning calorimetry and gel permeation chromatography, International Journal of Biological Macromolecules (投稿中)

K. Fukuda, T. Nezu and Y. Terada; The Effects of Alcoholic Compounds on the Stability of Type I Collagen Studied by Differential Scanning Carorimetry, Dental Materials Journal Vol. 19, No.3 (掲載予定)

に報告した。

目次

第1章 緒言

1-1 歯科接着の歴史	2
1-2 象牙質接着の特殊性	4
1-3 ハイブリッド層	5
1-4 コラーゲン	5
1-5 本研究の目的と本論文の構成	8

第2章 コラーゲンに対する接着性モノマー吸着

2-1 序論	13
2-2 材料と方法	15
2-2-1 材料	15
2-2-2 吸着量測定	18
2-2-3 走査型電子顕微鏡によるコラーゲン表面構造の観察	24
2-2-4 示差走査熱量測定によるコラーゲン変性状態の確認	24
2-3 結果および考察	25
2-3-1 コラーゲンの熱変性	25
2-3-2 気相からの吸着	25
2-3-3 コラーゲンの表面構造と吸着	36
2-3-4 吸着の可逆性	38

第3章 不溶性コラーゲンと接着性モノマーの相互作用

3-1 序論	40
3-2 材料と方法	42
3-2-1 材料	42

3-2-2 示差走査熱量測定	48
3-3 結果ならびに考察	49
3-3-1 象牙質の脱灰と EDTA の除去	49
3-3-2 BDC と BTC の熱変性の HEMA 濃度依存性	51
3-3-3 酸変性とコラーゲン-HEMA 相互作用	57
3-3-4 HEMA モデル物質とコラーゲンの相互作用	65
第4章 水溶性コラーゲンと接着性モノマーの相互作用	
4-1 序論	79
4-2 材料と方法	80
4-2-1 材料	80
4-2-2 水溶性コラーゲンのコハク酸修飾	80
4-2-3 示差走査熱量分析	82
4-2-4 ゲル濾過クロマトグラフィー	83
4-3 結果ならびに考察	83
4-3-1 示差走査熱量測定	83
4-3-2 ゲル濾過クロマトグラフィー	87
4-3-3 HEMA の作用によるコラーゲン構造への影響	89
第5章 総括	95
謝辞	99
参考文献	100

Faint, illegible text at the top of the page, likely bleed-through from the reverse side.

第 1 章 緒言

Faint, illegible text in the middle section of the page, likely bleed-through from the reverse side.

Faint, illegible text at the bottom of the page, likely bleed-through from the reverse side.

1-1 歯科接着の歴史

歯科臨床において長年にわたり様々なセメントが使用されてきた。1850年代中頃に充填材として用いられた最初の歯科用セメントとして、オキシ塩化亜鉛セメントが挙げられる。しかしこれは歯髄組織刺激が強く、唾液に対する溶解度が高いために、口腔内条件に耐えられるものでなかった。その欠点をいくつか改善したものが、酸化亜鉛を主成分とし酸化マグネシウムなどを含んだ粉末と、リン酸を主成分とした液体を用いたリン酸亜鉛セメントとして1870年代に登場した。次いで、酸化亜鉛と白色ロジンなどを主成分とした粉末と、ユージノールやオリーブ油を成分とした溶液を用いたユージノールセメントが1890年に登場し、近年まで歯科臨床において重要な地位を占めていた。現在の用途としては、裏装、暫間充填材、暫間あるいは永久合着材、口腔外科や歯周外科などに用いられる軟組織パック、歯内療法における歯根管シーラー材などが挙げられる。さらに、合着と接着の両方を兼ね備えるようなガラスイオノマーセメントが、A. D. Wilson と B. E. Kent により1971年に開発され(Wilson & Kent 1971)、改良を加え現在に至るまで用いられている。これは、シリカ、アルミナ、フッ化カルシウムなどの粉末成分と、ポリアクリル酸などの高分子酸の高濃度溶液から構成され、粉末成分から溶出する多価イオンが高分子酸を架橋することで硬化する機構で、象牙質への接着も示唆されている。

一方で、歯科医療技術、材料の発展の中で、歯科接着は嵌合力を利用したセメント合着が中心の時代から、歯牙自体に物理的、化学的に結合するレジン系の材料を応用した接着の時代に移行してきた。それとともに、これを応用した新しい臨床技術が次々と生み出されるようになった。また、接着強度の向上、陶材焼付クラウンやインレーによる補綴時の歯質切削量の減少と審美的要因などの条件が求められるように

なり、さらなる製品開発が望まれるようになってきた。その様な需要により、1938年ドイツのクルツァー社で過酸化ベンゾイルとジメチル-*p*-トルイジンを組み合わせたレドックシステムであるメタクリル酸メチル (MMA) の常温重合剤が開発された。これを応用して歯冠色の即時重合レジン”Palavit”が製品化され世界的に注目を浴びた (1940年) が、レジンの重合収縮による脱落や辺縁漏洩を起こし、生活歯では急性歯髄炎を発症するなどの問題を抱えていた。終戦後、ドイツやアメリカでも即時重合レジンの開発研究が行われるようになり、アメリカの M. G. Buonocore は、エナメル質の表面をリン酸でエッチングすることによりレジンとの結合性が良くなることを報告した (Buonocore 1955)。また Fischer や増原らにより 1960年代に MMA モノマーの常温重合開始剤としてトリ-*n*-ブチルボラン (TBB) を使用することで、吸水した湿潤象牙質に特異的に接着することが見いだされ、接着性コンポジットレジンが世に広まった。その後、藤沢らの研究成果によりライナーとしてメタクリル酸 2-ヒドロキシエチル (HEMA) が用いられるようになり、さらに接着強度の向上があり 1970年代から一般的に用いられるようになった。

この様な歴史にも見られるようにレジン系接着剤が急速に普及してきた背景には、従来の合着からより信頼性の高い接着へのニーズの変化に対応した、多様なモノマーの設計と合成の成功がある。つまり、物理吸着・化学結合など接着対象面への種々の結合様式、合目的的な官能基の選択肢の多さと合成の容易さ、重合・硬化反応の多様性と反応速度のコントロールのしやすさなど、レジン系材料には合着剤のベースとなる無機材料に比べて利点が非常に多い。

1-2 象牙質接着の特殊性

象牙質は、その容積のほぼ半分、または重量のほぼ2割が有機成分のコラーゲン線維からなり、この規則正しく組み込まれた線維にアパタイト結晶が密に付着している (Provenza 1972, Jenkins 1978)。また、歯髄腔から表面へ向かって放射状に発達した象牙細管をもつ。硬いヒドロキシアパタイト層と軟らかいコラーゲン層が混在している構造や、歯髄腔へのチャンネルとなる象牙細管からの水分の滲出が、エナメル質への接着に比べて象牙質への接着を困難にしていると考えられる。また、象牙質に対して接着を施す際、通常酸エッチング処理を行う。酸によって脱灰された象牙質は、無機成分が取り除かれて、それが水に置き換わるために、脱灰表面は主としてコラーゲンと水で構成されている。この脱灰象牙質中には疎水性の強いモノマーが拡散浸透しにくいため、脱灰で露出したコラーゲン線維間をレジンマトリックスが埋めるハイブリッド層の完成を不十分にし、レジン系接着剤の接着強度を低下させる原因であった。

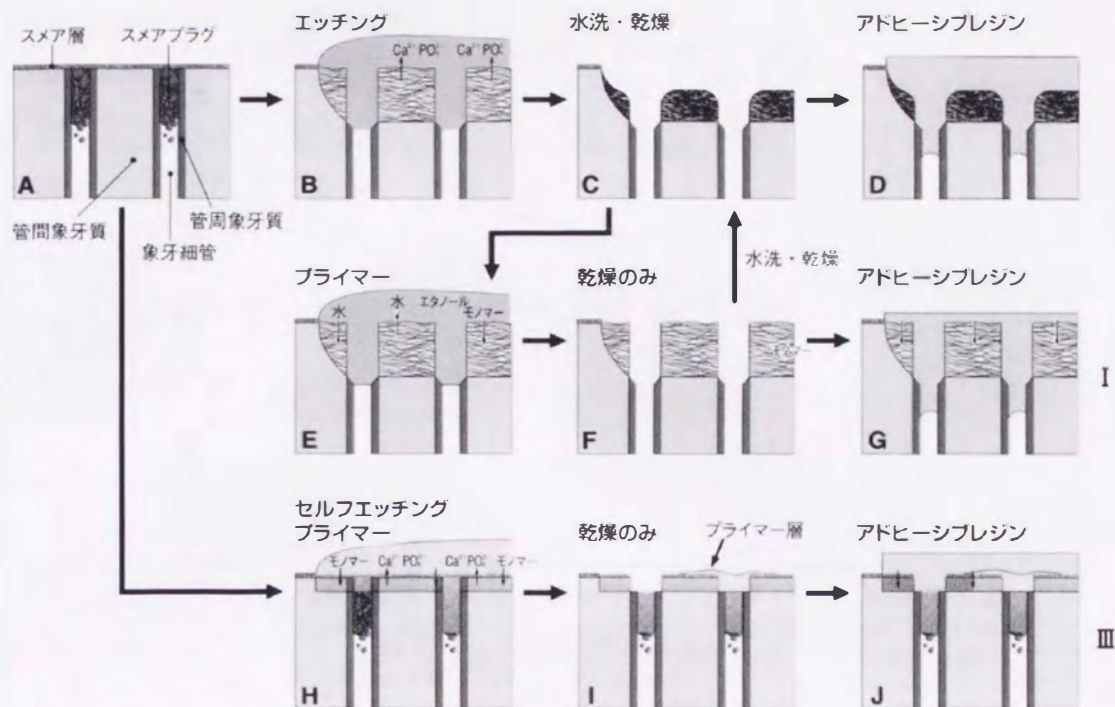
近年、MMA をベースとするレジン系接着剤は最も一般的に使われているものであり、レジン系材料の発達により臨床上の接着性能も大きく向上した。そのひとつに、エッチングやプライミングの効果により、接着強度がさらに向上したことが挙げられる。特に、歯牙表面を処理する際に用いられるプライマー等に含まれる HEMA などの MMA 誘導体については、エアブローによる乾燥で潰れたコラーゲンの網目構造を復活させることで (Pashley & Carvalho 1997)、レジンの母体である疎水性モノマーの浸透を促す効果を持っていると考えられている。しかし、HEMA が実際象牙質コラーゲンにどの様に作用しているかは、具体的には解明されていない。HEMA 等の前処理剤の詳細な効果を明らかにすることは、さらなる材料の開発のヒントになるものと考えられる。

1-3 ハイブリッド層

ハイブリッド層は樹脂含浸層とも呼ばれる。切削直後の象牙質露出表面には、管間象牙質、管周象牙質、象牙細管といった構造の上に、スメア層、スメアプラグが存在しており、これらは象牙質の接着強度を著しく低下させる原因となり得る。その原因を除去し、さらには管間象牙質中でアパタイト結晶に埋もれた象牙質コラーゲンを露出させるために、接着操作ではリン酸などの酸を用いてエッチングを施す。これらの酸を水洗し、乾燥することにより、管間象牙質部分のコラーゲンと、象牙細管が露出する。これに対して、MMAなどのレジンモノマーを作用させ、露出したコラーゲン線維間にレジンが浸透し重合した構造がハイブリッド層であり、接着強度の要となる部分である（中林 1982, Nakabayashi 1992）。近年のレジン系接着においては、HEMAなどの接着性成分を含んだプライマーを用いることで、水分を含んだコラーゲン中に疎水基と親水基を併せ持った接着性モノマー（機能性モノマー）が浸透し（Tanaka *et al.* 1981, Fujisawa *et al.* 1990, Wang & Nakabayashi 1991）、その後から導入される MMA などの疎水的なレジンモノマーの浸透を容易にし、熟成されたハイブリッド層を形成することが可能になった（図 1-1）。現在では、このハイブリッド層の十分な形成が、レジン系接着剤の接着強度の重要な因子と考えられている。

1-4 コラーゲン

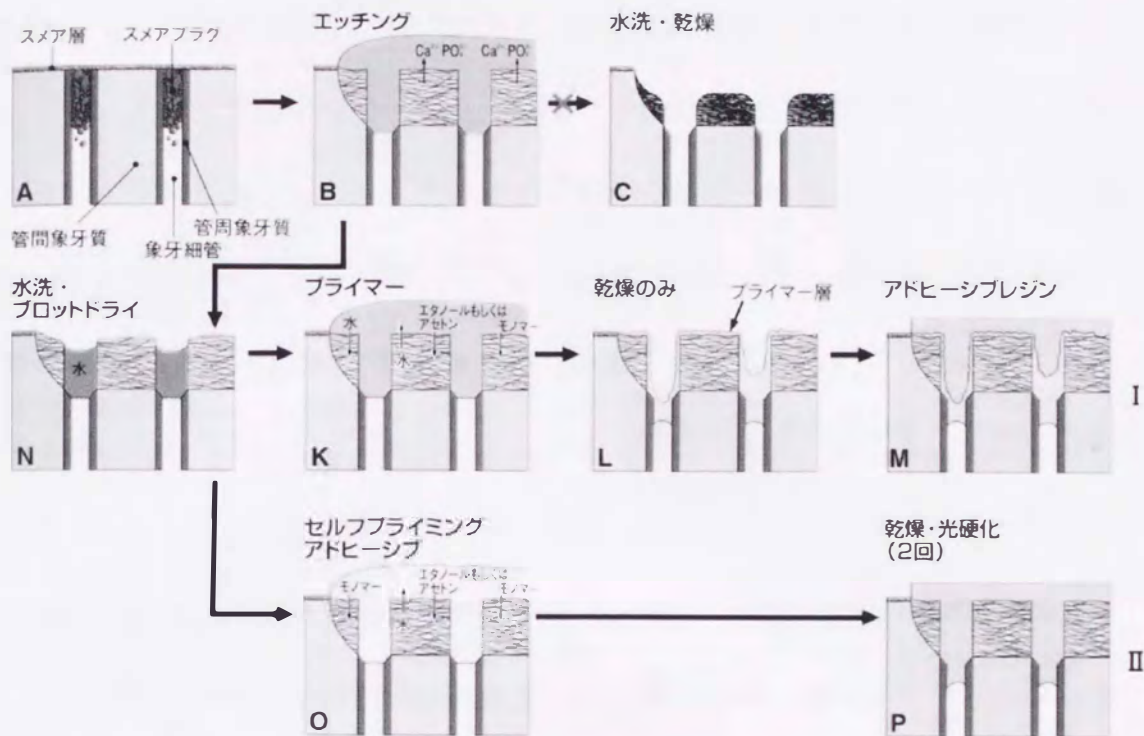
タンパク質は、生体を構成する重要な成分であり、コラーゲンもそのひとつである。生体中でコラーゲンは、繊維状もしくは膜状の構造体を形成し、水に溶けた状態ではほとんど存在しない。さらに、コラーゲンは、細胞と細胞の隙間を埋めており、全身のあらゆる臓器に存在している。その中でも、皮膚、骨、軟骨、腱、血管壁、歯など



歯界展望別冊／わかる・できる 接着 (医歯薬出版) より引用

図1-1 A リン酸エッチング (フォトボンド, ライナーボンド, ならびにライナーボンドII) の象牙質接着ステップ

当初のリン酸エッチングであるフォトボンドシステムはA→B→C→Dの順に, プライマーを採用したライナーボンドシステムはA→B→C→E→F→Gの順に, セルフエッチングプライマー採用製品はA→H→I→Jの順に進む。(A:象牙質切削面, B:エッチング, C:水洗乾燥, D:フォトボンド塗布, E:SAプライマー塗布, F:乾燥, G:フォトボンド塗布, H:LBプライマー塗布, I:乾燥, J:LBボンド塗布)



歯界展望別冊／わかる・できる 接着 (医歯薬出版) より引用

図1-1 B ウェットボンディング法による象牙質接着ステップ

エッチング後、水洗はするが、脱灰層の収縮を少なくなるために、エア乾燥は控え、表面の余剰な水を綿球で吸い取るくらいの湿潤状態に保つ (N)。ここにプライマー (多くのものはアセトンを溶媒としたもの、3Mのシングルボンドはエタノールを溶媒としている) を複数回塗布し (K, O)、乾燥後光硬化させる (L, P)。セルフプライミングアドヒーズは、プライマーがボンディングレジンとしても機能するもので、さらにボンディングレジン塗布する必要はない。(A: 象牙質切削面, B: エッチング, C: 水洗乾燥, N: 水洗・プロットドライ, K: プライマー塗布, L: 乾燥, M: アドヒーズレジン塗布, O: セルフプライミングアドヒーズ塗布, P: 光硬化)

には、特に多く存在する。歯や骨では、有機化合物は 20 ~25 %存在しその中の 90 %はコラーゲンである。また、10 %の水と多くの無機化合物（ヒドロキシアパタイト）を含んでいる（歯の有機化合物/無機化合物重量比 = 20/69, 骨 ; 25/65）。

コラーゲン分子は、3本のポリペプチド鎖から構成されており、そのうち二つは同じ α_1 鎖で、もう一つは一次構造が異なる α_2 鎖である。各 α 鎖は約 1000 残基のアミノ酸から成り、分子量約 10 万の α 鎖が3本縊り合わさって、分子量約 30 万のコラーゲン線維を形成している。これらの各ポリペプチド鎖は、左向きのらせん構造をなし、同じ向きに並んだ3本鎖が縊り合わさると逆向きの右巻きの超らせん構造となる。コラーゲンのポリペプチド鎖を構成するアミノ酸は、全体の三分の一がグリシンで、次にプロリンが多く、その他、一般のタンパク質に含まれないヒドロキシプロリンやヒドロキシリジン（全アミノ酸の約 10 %）が多いことが特徴である。さらに、アミノ酸配列は、グリシン-X-Yの繰り返し構造になっている。X, Yの位置の残基として、プロリンやヒドロキシプロリンが頻繁に存在する。3本の α 鎖の間で、ある α 鎖のX-Y間ペプチド結合中のカルボニル基酸素原子と、別の α 鎖のY-Gly間ペプチド結合中に存在するイミノ基水素原子の間に水素結合が形成されることで、三重らせん構造の構造は安定化される。

1-5 本研究の目的と本論文の構成

歯質への接着強度を評価する従来の研究では、引張接着試験、剪断接着試験のような物性試験や、走査型電子顕微鏡による接着界面の画像観察が主に行われ、その過程でレジン系接着剤を用いた象牙質接着においてハイブリッド層が注目されるようになってきた。しかしこれらの研究方法は、接着硬化完了後の状態に対して計測を行う

ものであり、接着進行の過程については、間接的に推定するにとどまる。そこで、本研究はハイブリッド層形成初期または進行中の現象を考察することを目的として、有効な観測方法を検討した。

ハイブリッド層形成の初期過程と象牙質接着強度に言及した研究として、伊藤らおよび鈴木と中井の報告がある。伊藤らは、牛下顎切歯を用いてレジン系接着剤による象牙質への引張接着強さを調べ、加熱処理を施した歯質の象牙質部に対する接着強さが加熱処理を行わないコントロールに比べて有意に低下することを明らかにした（伊藤ら 1995）。その中で、象牙質中の有機成分の大半を占める、構造タンパク質であるコラーゲンが加熱処理によって受ける影響と接着強さとの関係が指摘されている。さらに、伊藤らはレジン系接着剤による象牙質接着に特有の接着界面構造である樹脂含浸層が、露出した象牙質コラーゲンと接着剤レジンの複合体であることに注目して、樹脂含浸層モデルとして脱灰象牙質粉末とレジンセメントから成る硬化体を調製し、その強度を圧縮破壊試験により評価した（伊藤ら 1997）。その結果、加熱処理歯から得た試料の圧縮強さは、加熱処理なしのコントロールに比べ有意に低下することが明らかになった。これらの報告は、象牙質に対する接着には象牙質コラーゲンが重要な役割を果たしており、接着剤成分との相互作用を解明する必要性を強く示唆している。一方、鈴木と中井はクエン酸、リン酸、EDTA で脱灰した象牙質表面に種々の濃度の接着性モノマー（HEMA）を作用させ、30%で良好な接着強度が得られる（鈴木、中井 1993）ことを示した。また、コラーゲンへの HEMA の吸着量についても検討しており、最大接着強度の得られる HEMA 濃度付近で吸着量も最大になっていることを示した。

これらの研究を踏まえ、本研究では象牙質の構造の特殊性に注目し、象牙質コラー

ゲンと接着性モノマーの分子レベルでの相互作用が、レジン系接着剤を用いた象牙質への接着の本質の一端であるという立場で、両分子の相互作用を解析した。この相互作用は、レジン系接着剤を用いて象牙質に対して接着を施した際に接着界面に見出される、樹脂含浸層構造の形成に関与している点で臨床的にも重要である。現段階では、接着剤-歯質相互作用についての直接的な情報を得ようとする研究は限られている（鈴木、中井 1993, Nishiyama *et al.* 1995, Eick *et al.* 1996 など）ため、本研究は分子レベルでの接着機構の解明に貢献すると考えられる。

ここでは、象牙質接着をその1要素であるコラーゲンとモノマーの相互作用に還元して系の単純化を行い、象牙質側を象牙質コラーゲンおよび種々のI型コラーゲンで代表させ、レジン系接着剤側を接着性モノマーの代表であるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチル (HEMA) またはその関連物質で代表させた。また、HEMA 関連物質については、HEMA がコラーゲンと相互作用を持つと考えられる部位の構造を系統的に変え、コラーゲンの高次構造安定性に与える影響を、熱分析を中心に解析した。

第2章では、コラーゲンへの接着性モノマーの吸着挙動から、コラーゲンの接着性モノマーによる濡れについて考察した。そこでは接着性モノマーおよびその関連物質の吸着挙動の比較を行い、コラーゲンの熱変性の有無が吸着に与える影響についても検討し、モノマーの構造と吸着の関係についても考察した。第3章では、示差走査熱量分析を用い、種々の前処理を施した不溶性I型コラーゲンに対して、接着性モノマーおよびそのモデル物質が作用するときの、コラーゲンの熱安定性の変化を検討した。この手法は、HEMA などのモノマーの吸着によりコラーゲンの環境が変化することで、コラーゲンの変性条件が変わるという性質を利用したものである。また、コラーゲンの構造安定性に影響を与える接着性モノマーの構造的な因子について考察した。第4

章では、水溶性の I 型コラーゲンについて、HEMA が構造安定性に及ぼす影響を第 3 章と同じ手法で調べるとともに、HEMA の作用によりその集合状態および構造がどの様に変化しているかを、ゲル濾過クロマトグラフィーを応用して解析した。その結果をもとに、HEMA が作用したときにコラーゲンの構造と熱安定性の関係について検討した。第 5 章では、ハイブリッド層形成の初期段階におけるコラーゲンと接着性モノマーの相互作用について総括した。

第2章 コラーゲンに対する接着性モノマー吸着

2-1 序論

1950年代に登場したレジン系接着剤 (Buonocore 1955) はその後改良を重ねられ、近年では、従来難しいとされていた象牙質との接着性も著しく向上した。その接着安定性を考察する上で、接着剤そのものの性状、劣化だけでなく、歯質側の性質の変化による接着性への影響についても考慮する必要がある。第1章でも触れたように、組成のほとんどが無機成分であるエナメル質とは異なり、象牙質は重量で2割が有機成分で、その大半がI型コラーゲンであることが大きな特徴である (Provenza 1972, Jenkins 1978)。このため、コラーゲンとレジンの相互作用が、レジン系接着剤を用いた象牙質への接着の重要な鍵となると考えられる。

伊藤らは加熱処理による象牙質に対する引張接着強度が低下することを報告し (伊藤ら 1995)、脱灰象牙質粉末とレジンセメントを用いた樹脂含浸層モデルの圧縮破壊試験からも、象牙質の加熱処理が樹脂含浸層強度の低下につながると解釈できるデータを示した (伊藤ら 1997)。伊藤らは、これらの現象が象牙質コラーゲンの熱変性に関連していることを示唆している。このような背景の下に、接着性モノマーとコラーゲンの相互作用を検討する出発点として、モノマーのコラーゲンへの吸着特性を、変性に起因するコラーゲンの構造変化との関連性から調べることにした。一般にタンパク質の規則高次構造は、熱、酸、特定の溶媒、界面活性剤や塩などの化合物の作用によって失われることがある (変性)。そこで、変性、未変性コラーゲンに対してレジン系接着モノマーの濡れ性がどの様に変化するかを調べた。

濡れ性を評価する方法として、広い平坦な面を持つ試料に対しては、一般的に接触角測定を行うことができるが (図 2-1 A)、微粉末や線維状の試料では、接触角を直接測定することはできない (図 2-1 B)。そこで、接触角測定に代わるものとして、

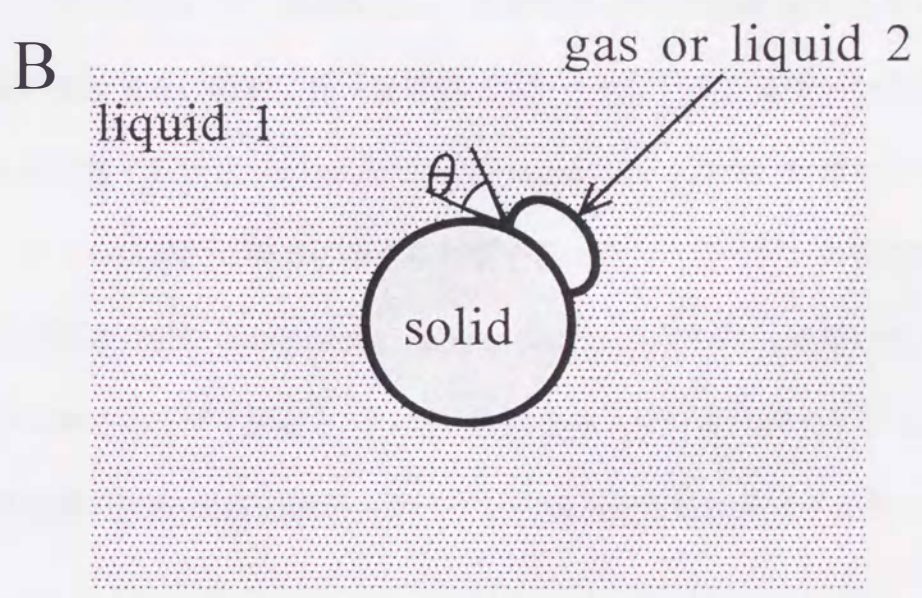
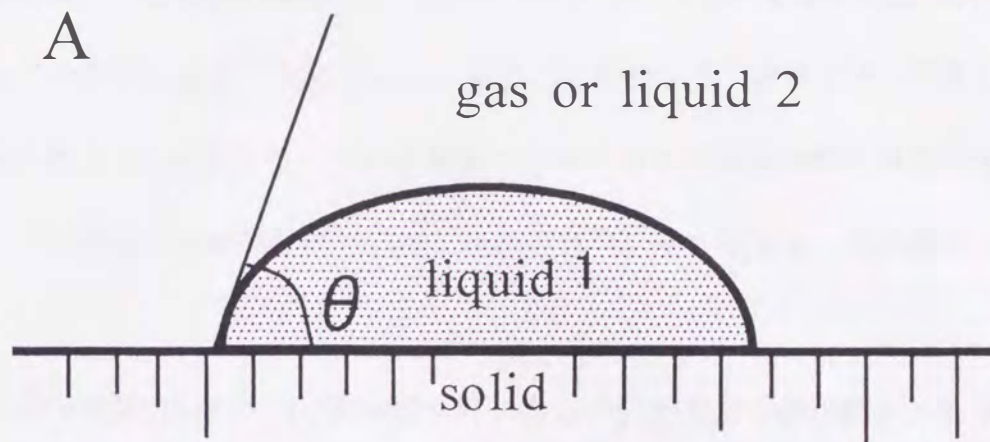


図2-1 接触角 θ の測定

A : 十分広い平面に対しての接触角測定が可能

B : 液相の大きさに比べて吸着媒が小さいときには
測定が困難 (例 ; 線維などの場合)

本研究では吸着量測定による結合特性評価を採用した。表面の濡れの過程は、単層吸着、多層吸着、吸着物質の凝縮という過程（図2-2）で進行すると考えられるので、濡れの最初の段階は分子の吸着であると見ることができる。本章では、吸着と濡れの関係論じた上で、コラーゲンへの接着性モノマーおよび関連物質の吸着特性を調べ、コラーゲンの変性が吸着特性にどの様に反映されているか検討し、その原因を考察する。

コラーゲン試料については、象牙質コラーゲンの代わりに比表面積が大きな線維状で、ロットの揃った試料の入手が容易な、象牙質コラーゲンと同様I型である牛アキレス腱コラーゲンを用いた。本研究では、接着性モノマーの HEMA とその構造に関連した物質の吸着量を、吸着に伴う吸着媒（コラーゲン）の重量増加から見積もった。さらに、走査型電子顕微鏡（scanning electron microscope : SEM）観察により、加熱処理がコラーゲンの巨視的な構造に与える影響を調べた。コラーゲンの変性挙動については示差走査熱量分析法（differential scanning calorimetry : DSC）を用いて、熱処理がコラーゲンの構造に及ぼす影響と、レジジン性接着モノマーの代表である HEMA およびその関連物質の吸着-脱着過程がコラーゲンの構造安定性に及ぼす影響を調べた。

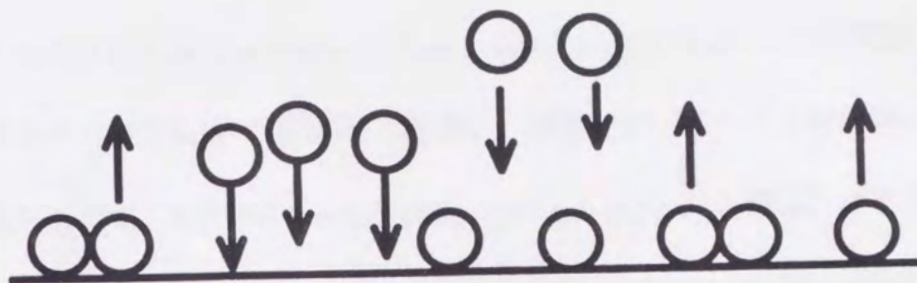
2-2 材料と方法

2-2-1 材料

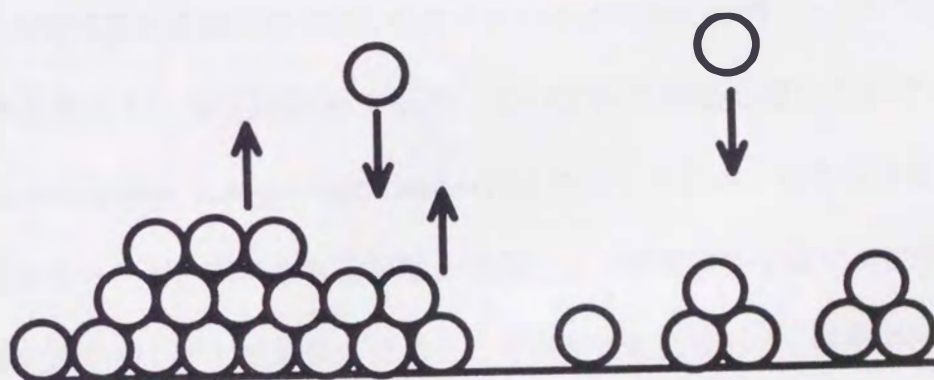
牛腱コラーゲン

コラーゲンとしては、象牙質コラーゲンと同じI型である牛アキレス腱コラーゲン（bovine tendon collagen 以下、BTC と略 : SIGMA 社製, Lot 番号 124H7060）を用いた。BTC は吸着実験での使用に先立って、真空乾燥により十分に乾燥させた。

1. 単層吸着



2. 多層吸着



3. 濡れ状態

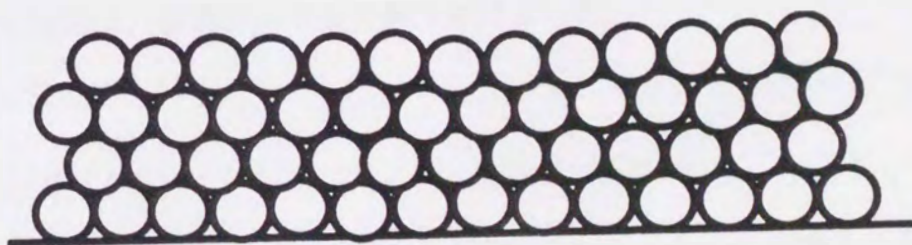


図 2-2 吸着の進行と濡れ

吸着実験に用いるコラーゲンの加熱処理に関して二つの方法を試みた。一つはBTCをガラスバイアル中で蒸留水に浸漬し、これを100℃で1時間加熱した後に真空乾燥させたものでBTC(D) (bovine tendon collagen (denatured))と呼ぶ。この対照試料は、BTCを同様にガラスバイアル中で蒸留水に浸漬し、室温(25℃)に1時間置いた後に真空乾燥させたもので、BTC(N) (bovine tendon collagen (native))と呼ぶ。この方法は、伊藤らが歯質を水浴中で加熱処理していることに対応している(伊藤ら1995, 1997)。また、水が熱伝導媒体となって嵩高い綿状のBTCの内部にまで一様に熱を伝えると考えられる。

他方は、十分に真空乾燥したBTCをガラスバイアル中に密封し、100℃で1時間加熱処理する方法で、空気浴加熱である。この方法で加熱処理したコラーゲンをBTC(D') (bovine tendon collagen (dry;denatured))と呼ぶ。これは、前者の方法では吸着実験開始前にコラーゲン試料を水と接触させることで膨潤若しくはゲル化するため、その後乾燥処理を施しても処理前とは異なった表面状態になって、吸着特性に何らかの影響が現れることが懸念されるためである。BTC(D')に対応した参照試料は、十分な真空乾燥だけを前処理とした。

変性の程度の確認は、後述の示差走査熱分析によった。

試薬

コラーゲンへの吸着物質として、接着性モノマーであるメタクリル酸-2-ヒドロキシエチル (HEMA ; ナカライテスク, Lot No. M7K7325, M8K4909, 一級試薬) と、その化学構造に関連のあるメタクリル酸メチル (MMA ; 和光純薬, Lot No. TPP2680, 特級試薬), メタノール (ナカライテスク, Lot No. V6T4911, スペクトル用特級試薬),

エタノール（ナカライテスク，Lot No. V6P4007，特級試薬）を用いた（図 2-3）。これらはそれ以上の精製は行わずに使用した。また，水は 1 次フィルターで濾過した水道水を ADVANTEC 製蒸留水製造装置アクエリアス GS-200 によりイオン交換，蒸留した蒸留水を用いた。

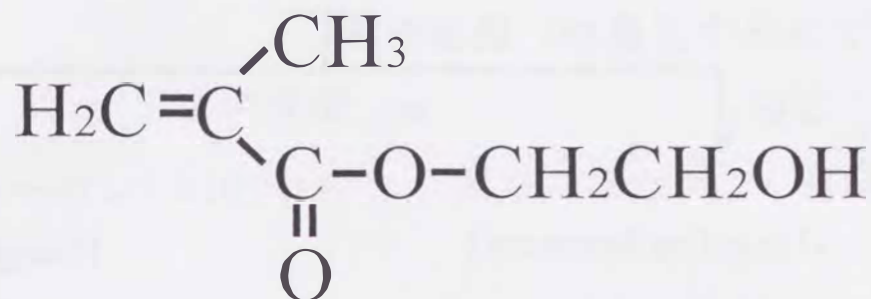
2-2-2 吸着量測定

吸着量の分析

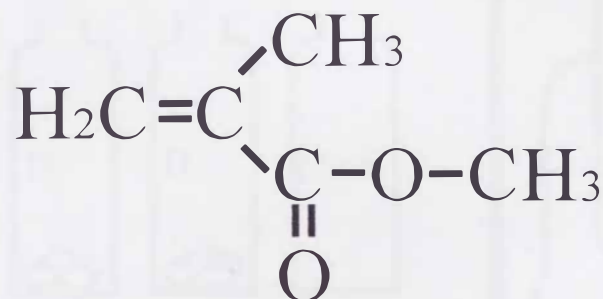
気体の吸着量測定実験には大別して直接法と間接法があり，前者には吸着による気相圧の低下を測定する容量法と吸着媒の重量増加を測定する重量法が，後者には吸着によって吸着媒に生ずる熱交換能や熱電子放射能などの物性変化を測定する方法が含まれる（矢野 1957）。この中から，コラーゲンへの各種蒸気の吸着量測定方法として重量法を選択したが，その主な理由は，1) 方法が簡単でありながら，天秤での適切な秤量により高い精度が得られること，2) 同一条件下で変性状態の試料とコントロール試料について相対的な比較測定を行うのに適していることである。

重量法によるコラーゲンへの蒸気吸着実験の手順を図 2-4 に示す。精秤した BTC(N)，BTC(D)をガラス製バイアルに採り，参照のための空バイアルとともに容器ごとの乾燥重量を測定した。これらを吸着物質の蒸気で満たされた密閉容器内に，液相の吸着物質と接触しないように懸下し，密閉容器ごと 37.0 ± 0.1 °C に保たれた恒温槽（ADVANTEC, C1-610）にて恒温化した。その後一定時間ごとにコラーゲンの入ったバイアルと参照バイアルの重量を電子天秤（Saltrius, R-200D）を用いて 10^{-5} g 単位まで測定した。重量増加が飽和に達した時点で，各物質の平衡吸着量を見積もった。

メタクリル酸2-ヒドロキシエチル (HEMA)



メタクリル酸メチル (MMA)



エタノール



メタノール



図2-3 吸着物質の構造

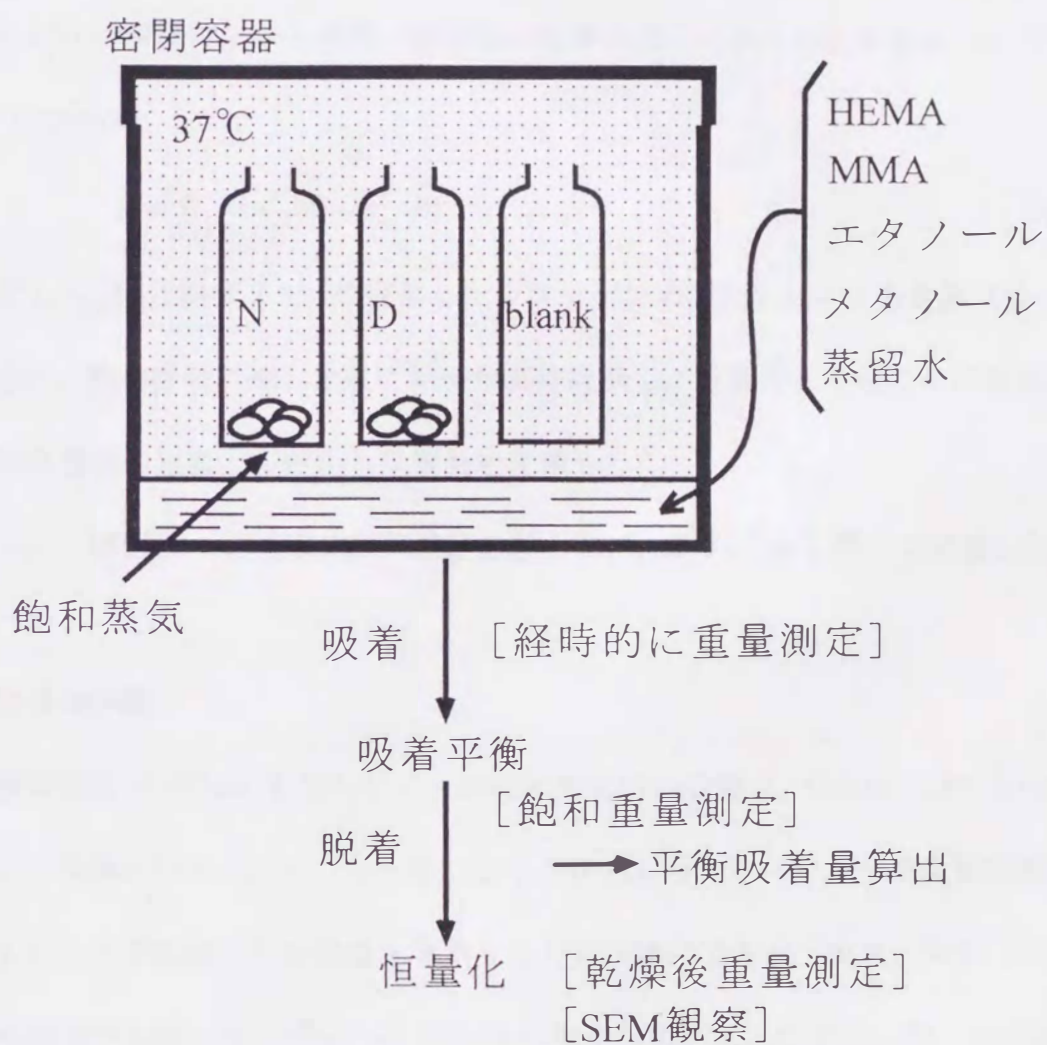
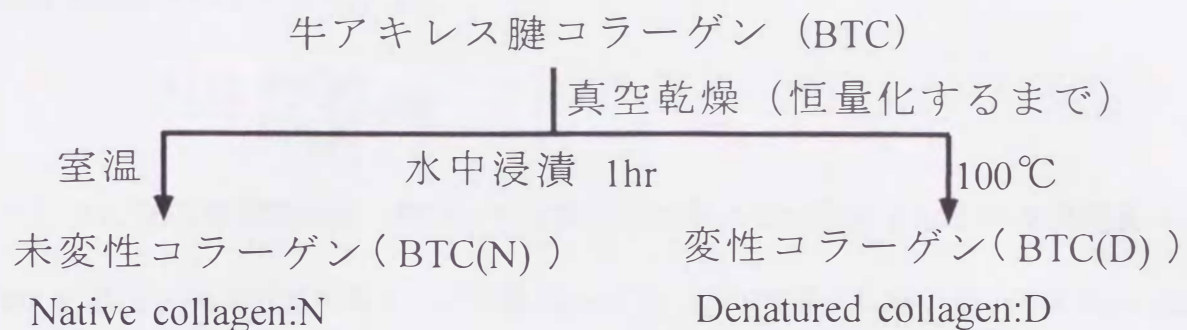


図 2-4 蒸気吸着測定の流れ

吸着量は以下のように算出した.

$$v_i^T(t) = \frac{\Delta w_i^T(t)}{M_i w_c p_i^T} \times 10^6 \quad (2.1)$$

ここで $v_i^T(t)$ は吸着開始後, 時間 t だけ経過した時点での温度 T における吸着量 ($\mu \text{ mol g}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$), M_i は吸着物質 i の分子量 (g mol^{-1}), p_i^T は温度 T における i の蒸気圧 (Pa), w_c は吸着媒であるコラーゲンの乾燥重量 (g) である. 飽和吸着量は $v(\infty)$ と表す. また $\Delta w_i^T(t)$ は吸着開始から時間 t 経過後の温度 T における i の吸着重量 (g) で, 以下のように求めた.

$$\Delta w_i^T(t) = w_{c,i}^T(t) - w_{c,i}^T(0) \quad (2.2)$$

ただし $w_{c,i}^T(t)$ は温度 T で i の吸着したコラーゲンの時刻 t における重量 (g) である.

また, 飽和吸着に達した後に試料を真空乾燥し, 恒量化した後にその重量を記録し, 飽和吸着時の重量との差から脱着量を見積もった.

さらに, 試料については3回の測定をおこない, その平均を用いて評価した.

吸着量の評価

臨床場面で HEMA を含むレジジン系接着剤を用いる場合, HEMA は約 30% の水溶液として供給される. このことを考えると, HEMA のコラーゲンへの吸着は蒸気吸着よりもむしろ水溶液からの吸着を考察する方が現実的である (鈴木, 中井 1993). しかし水溶液中ではコラーゲンへの HEMA の相互作用が水と競争的に起こるため, HEMA の実質的な相互作用を評価することが困難である. そこで, HEMA とコラーゲンの二元系で両者の相互作用を直接評価する方法として HEMA 蒸気の吸着量測定を用いた. さらに HEMA が吸着に関与する部位を検討する目的で, HEMA の化学構造に関係の

ある MMA, エタノールなどをモデル物質として用いた.

気体の吸着測定に際しては, 吸着媒の清浄化が大切であり, これは化学吸着の場合や, 物理吸着でも吸着量が非常に少ない場合に特に重要となる. 吸着実験前の一般的な処理では, 吸着媒となる物質を高温下で真空乾燥するが (矢野 1957), 本実験ではタンパク質であるコラーゲンを吸着媒とするため, 熱変性の起こる高温での処理は避けなければならない. そこで常温で恒量化するまで真空乾燥を続け, これを一貫して基準乾燥状態とした. 表面の不純物に非常に鋭敏に影響を受ける化学吸着とは異なり, 本実験では物理吸着が起こると考えられるので, 常温処理で十分であると判断した.

吸着量測定では, 図 2-4 に示すようにバイアルごと秤量しているので, バイアル自体への吸着が問題となる可能性がある. そこで, 参照として空のバイアルも同一の密閉容器と一緒に入れ, 併せて重量の経時変化を調べた. その結果, 最大 24 日間までの測定で, 空のバイアルの重量に経時変化は見られず, 重量の変動幅はいずれの吸着物質についても, 吸着によるコラーゲンの重量増加に比べて小さかった. 例えば吸着重量が最も小さい HEMA の吸着初期においても, 吸着による重量増加が 1 mg 以上であるのに対して, 24 日間通しての空容器重量の変動幅は 0.6 mg よりも小さかった. 以上の考察から, バイアル自体への吸着はコラーゲンへの吸着に比べて無視できると判断した.

また, 吸着量は通常「気体吸着量と吸着媒の基準乾燥重量の比」と定義されるが, 同一の吸着媒に対する種類の異なる物質の吸着挙動を比較するために, 本研究ではモル単位で吸着量を表した. さらに同温で蒸気圧の異なる吸着物質間の比較のために, 単位蒸気圧あたりに還元した量を吸着量と呼ぶことにした (表 2-1) (式 (2.1)).

表 2-1 吸着物質の飽和蒸気圧 (37°C)

吸着物質	飽和蒸気圧 (Pa)
HEMA	6.0×10^3 a) *
MMA	9.2×10^3 b) *
メタノール	2.9×10^4 b) *
エタノール	1.5×10^4 b) *
水	6.3×10^3 b)

a) 歯科材料学事典 (東京学建書院, 1987)

b) 理科年表 (丸善株式会社, 1983)

これらの値をもとにして, 飽和蒸気圧を求めた.

* ; データを補間したものから, 算出した.

2-2-3 走査型電子顕微鏡によるコラーゲン表面構造の観察

コラーゲンに対する加熱処理による構造の変化, 接着性モノマーおよびその関連物質の吸着が構造に与える影響について, 走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察を行った. コラーゲン試料はカーボン製の両面テープ (SINTO PRINT CO.) で試料台に固定した. 試料自体に導電性がないため, TWIN COATER (JEOL, JEC-550) を用い, 2 分間金コーティングした. コラーゲン試料の表面の二次電子像を, 走査型電子顕微鏡 (JEOL, JSM-5310) を用いて, 加速電圧 15 kV, 倍率 350-1000 倍で観察した.

2-2-4 示差走査熱量測定によるコラーゲン変性状態の確認

BTC(N), BTC(D), BTC(D')の変性状態を調べるために示差走査熱量測定 (DSC 測定) を行った. 各コラーゲン試料 1 mg をアルミニウム製の DSC 用サンプルパンに採り, 約 10 mg の蒸留水を加えて密封し, 室温 (25 °C) で 1 時間膨潤させた. この試料について 20 ml min⁻¹ の窒素気流下, 10 K min⁻¹ の昇温速度で示差走査熱量分析装置 (Perkin Elmer, Pyris1 DSC) を用いて DSC 測定を行った. 得られた熱曲線に現れる吸熱ピークについて, 付属の解析ソフトウェア, Pyris Software for Windows を用いて, そのピーク位置とピーク面積を記録した. 熱測定においては, 厳密にはピークの立ち上がり温度をもって相転移温度と定めるが, ピーク位置が進行する転移の midpoint と考えることができること, およびピーク位置の再現性が優れていることから, 本研究ではピーク位置をコラーゲンの変性温度 (T_g , °C) とした. また, ピーク面積から変性に伴う構造転移のエンタルピー変化 (ΔH J g⁻¹) を見積もった. さらに, 脱着後の試料についても DSC 測定を行い, 脱着後のコラーゲンの状態について考察した.

2-3 結果および考察

2-3-1 コラーゲンの熱変性

BTC(N)について DSC 測定を行うと、 $68.1 \pm 0.8^\circ\text{C}$ に吸熱ピークが現れるが(図 2-5), 同一の試料に対して再度測定を行うと, その吸熱ピークは消失していた. これは熱変性が不可逆な過程であることを示している. 一度目の DSC 測定で変性したコラーゲン試料を 1 週間以上経てから再測定すると, わずかながらピークが回復するという報告もあるが (Komsa-Penkova 1996), 少なくともこの実験のタイムスケールではそのような回復は認められず, 変性は不可逆と見なしてよい. 一方, 湿潤条件下で加熱処理を行った BTC(D)では一度目の測定でもこのピークが全く見られないことから, 完全に変性していたと判断される (図 2-5).

これに対して, 乾燥条件下で加熱処理した BTC(D')は BTC(N)と同様に吸熱ピークを示すが, BTC(N)と比較してピーク高さが減じ, ΔH の値も $25.9 \pm 0.5 \text{ J g}^{-1}$ から $22.1 \pm 0.7 \text{ J g}^{-1}$ に低下した (図 2-5). これは BTC(D')では変性が完全でないことを示している. BTC(D')の調製時には, 熱伝導の媒体が水ではなく空気であったため, 熱浴に浸漬されたガラス容器に接触していた部分だけ変性し内部のものは変性しておらず, BTC(N)と BTC(D)が混在した状態になっていた可能性がある.

この結果を踏まえ, 本研究ではコラーゲンの加熱処理は水を熱伝導媒質とする湿潤加熱法を一貫して用いることにした.

2-3-2 気相からの吸着

吸着の経時変化

BTC への HEMA, MMA, エタノール, メタノール, 水の蒸気吸着は, 図 2-6 に示

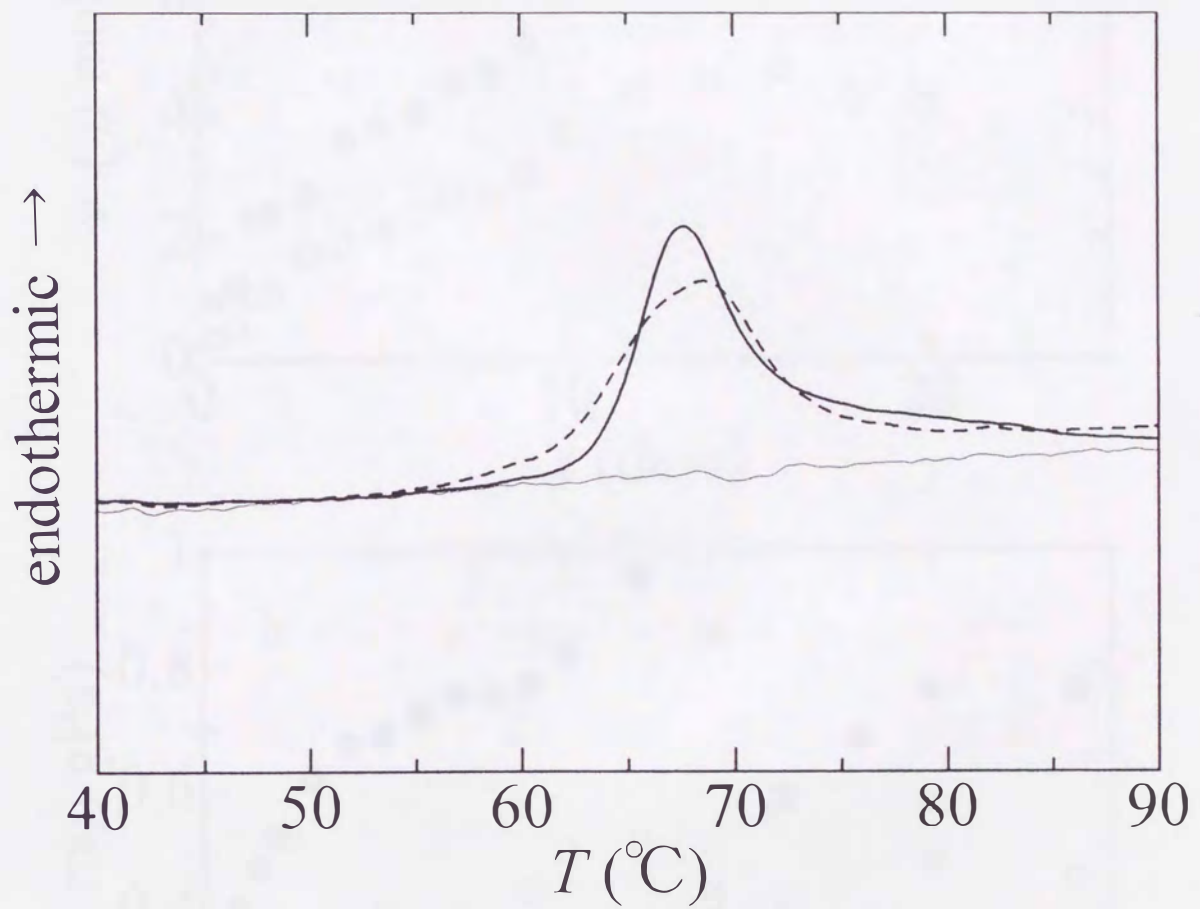


図 2 - 5 BTC(N) (太実線), BTC(D) (細実線), BTC(D') (破線) の DSC 曲線.

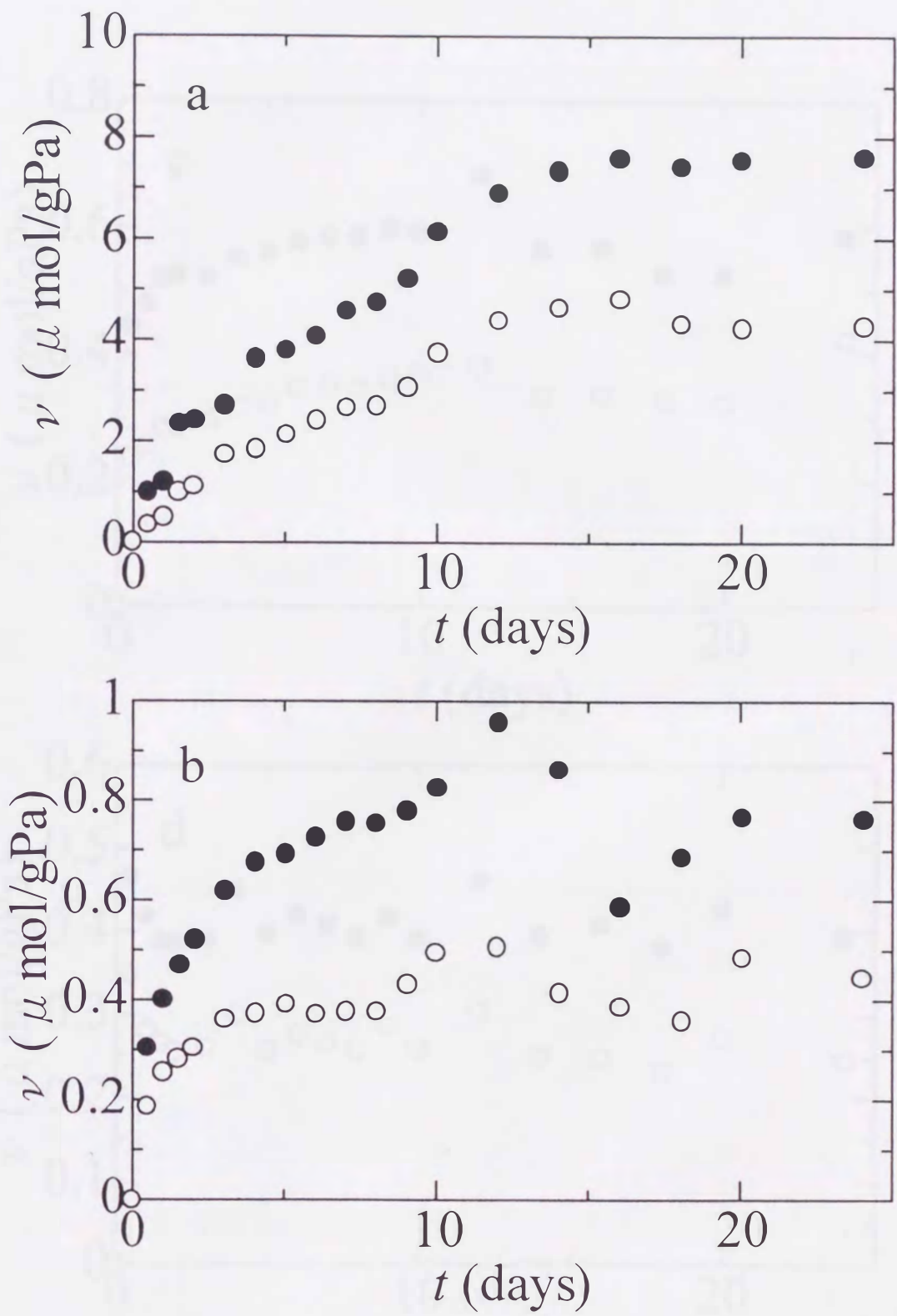


図2-6 吸着量の経時変化. a:HEMA, b:MMA, c:エタノール, d:メタノール, e:蒸留水. 黒記号はBTC(N), 白記号はBTC(D)に対する吸着を示す.

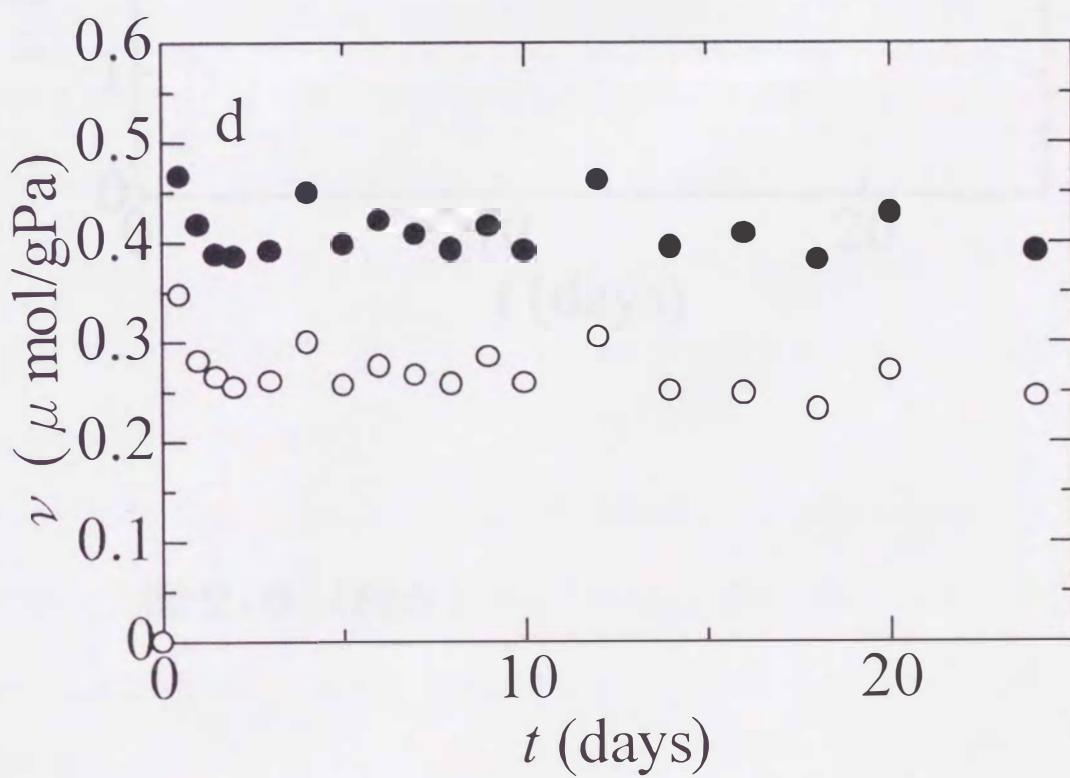
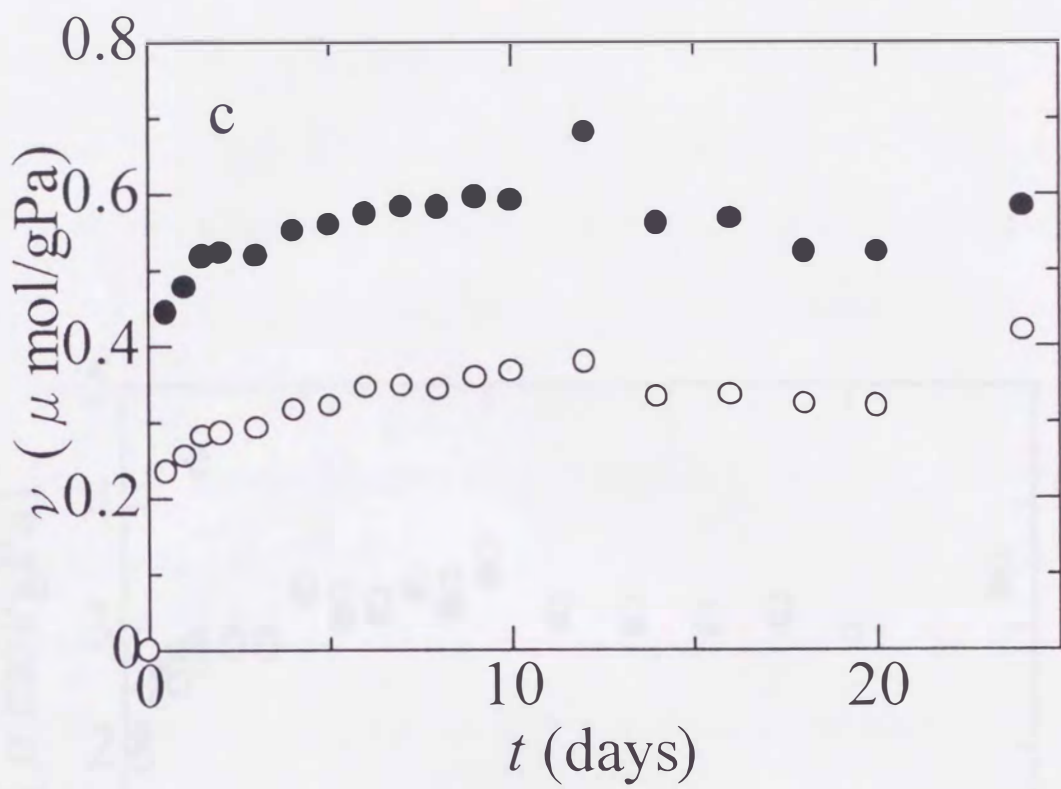


図 2-6 (続き)

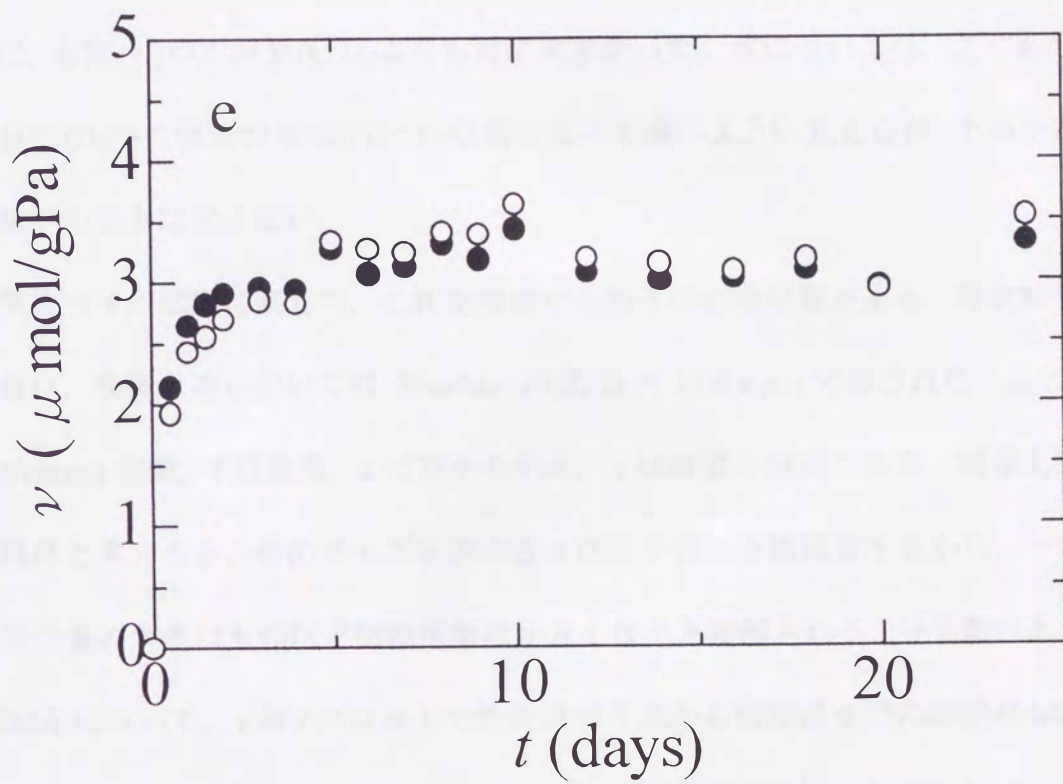


図 2-6 (続き)

した。平衡吸着に達するまでの過程で、吸着量の経時的変化の様子は、吸着物質の種類と BTC の変性状態の双方に依存した。

図 2-6 に示すように、吸着に用いた HEMA, MMA, エタノール, メタノール, 水のいずれについても飽和吸着に達するまでの時間は BTC(N) と BTC(D) の間で差は見られなかった。しかしながら吸着飽和前での v 対 t プロットの傾き、すなわち吸着速度は、BTC(N) の方が BTC(D) よりも常に大きかった。水については、ごくわずかながら BTC(D) への吸着が BTC(N) への吸着に比べて遅いように見えるが、その小さな差に意味があるとは言えない。

気体分子の拡散に関して、これを規定する因子に拡散係数がある。球状粒子の拡散係数は、希薄な系においては Einstein の式 $D = kT/6\pi a\eta$ で表される。ここで k は Boltzmann 定数、 T は温度、 a は粒子の半径、 η は媒質の粘度である。便宜上気体分子を球体と考えると、そのサイズを決める a は分子量に直接関係するから、一定温度では分子量の大きなものほど拡散係数は小さくすると理解される。分子量のより大きな HEMA について、 v 対 t プロットで折れ曲がり点から飽和点までの時間が MMA など他の分子に比べて長くなっているのは、これが拡散速度の違いを反映しているためであると考えることができる。

次に吸着曲線の形と吸着過程の特徴について吸着モデルを用いて考察する。吸着挙動の解析によく用いられる Langmuir 吸着モデルは、互いに独立な結合サイトをもつモデルに対して導かれるもので、単純表面が適用の対象となる。これに対応した吸着の速度式は、

$$\frac{dv}{dt} = k_1 p(b-v) - k_2 v \quad (2.3)$$

から

$$v(t) = v(\infty)(1 - e^{-kt}) \quad (2.4)$$

と得られる (慶伊 1956) (図 2-7). これに対して多孔性物質への理論速度式は鮫島の式(Sameshima 1932)から

初期吸着に対しては

$$v(\infty) \log \frac{v(\infty)}{v(\infty) - v(t)} - v(t) = kt \quad (2.5)$$

後期吸着に対しては

$$v(t) = k \log t + A \quad (2.6)$$

という形で与えられる (図 2-8). 本実験で得られた吸着曲線は, その形が上記のように多孔性物質に対して予測される吸着曲線に類似していることがわかる. これは吸着媒としての線維状コラーゲンが, 構造的に多孔性物質と類似性を持つことを示唆している. すなわち活性炭やゼオライトのような多孔性物質で細孔内に吸着物質が取り込まれるのと同様, コラーゲンについても線維内部への蒸気の吸収と吸着 (収着) が起こっていると考えられる.

平衡吸着

平衡に達した後の吸着量を比較すると, 二つの傾向のあることが見出された. すなわち, コラーゲンの変性状態によって吸着量に歴然とした差の現れることと, 吸着物質間に吸着量の差が見られることである.

変性状態の異なる BTC(N)と BTC(D)に対する各物質の吸着量, v_N , v_D を比較すると, HEMA, MMA, エタノール, メタノールの吸着量は常に $v_N > v_D$ となった ($p < 0.005$).

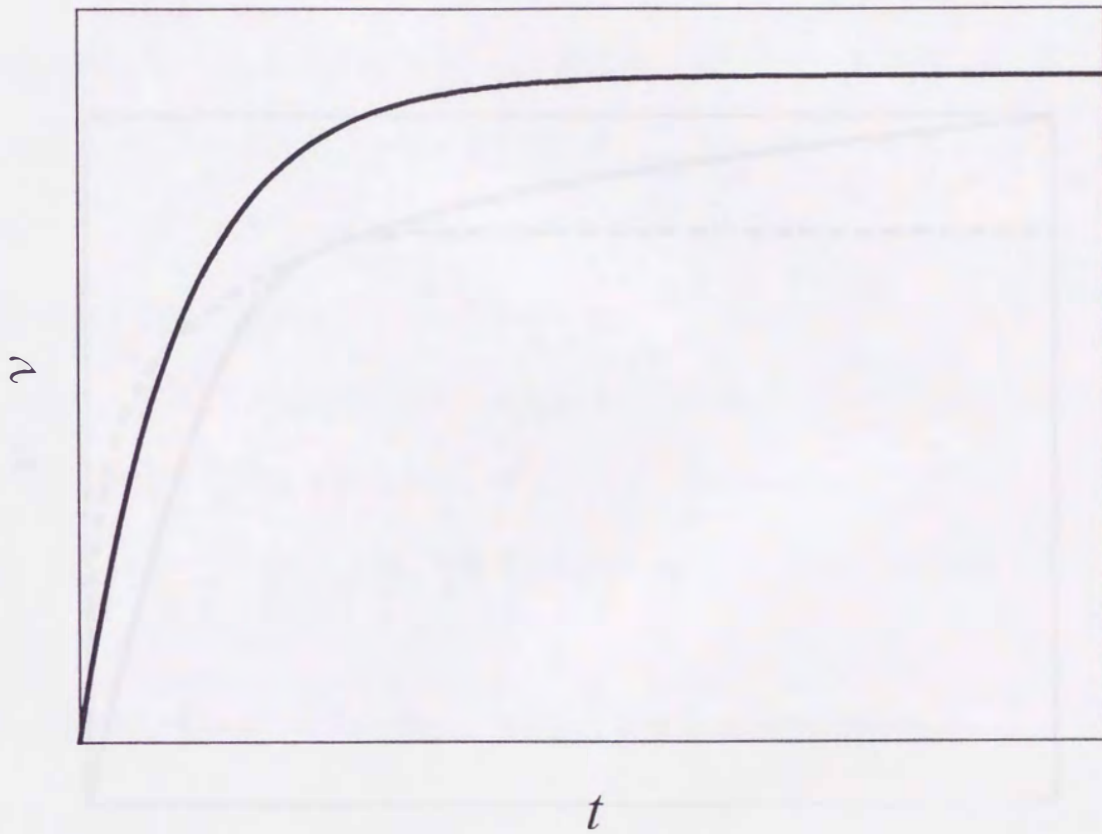


図 2-7 Langmuir 吸着に対応した吸着の経時変化.
式 (2.4) による.

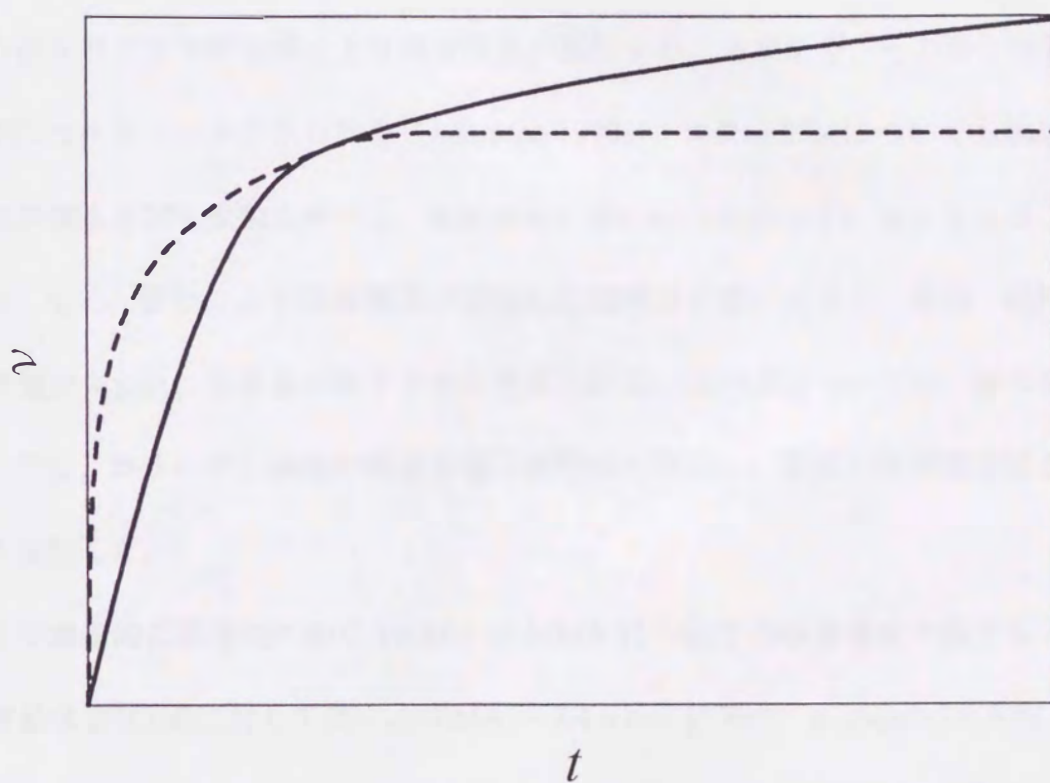


図 2-8 多孔性物質への吸着の経時変化.
 鮫島の理論速度式による. 実線; 初期吸着
 (式 2.5), 破線; 後期吸着 (式 2.6).

(図 2-6). ここで BTC(D)に対する吸着量 v_D と BTC(N)に対する吸着量 v_N の比を採ると (図 2-9), HEMA, MMA, エタノール, メタノールの BTC(D)に対する吸着量は BTC(N)に対する吸着量の 0.5~0.66 倍であり, 変性コラーゲンへの吸着量は著しく低下していることがわかる. 一方, 水についてはこの比はほぼ 1 で, コラーゲンの変性, 未変性状態に吸着量が依存しないことが明らかになった.

前節ではコラーゲンが多孔性物質に似た吸着挙動を示すことを指摘した. 多孔性物質の細孔内では毛管凝縮により吸着蒸気が凝縮することがあり, その場合吸着・脱着曲線にヒステリシスが見られる (Adamson 1990c). コラーゲンについても繊維同士の間隙が細孔と同じ役割を果たし, 毛管凝縮が濡れにつながっていると考えることができる. もし, 変性により線維構造が熔融した無構造状態になると, 吸着, 凝縮の起こる空間が失われ, 吸着量が低下すると考えられる. この点については, 後の節に述べるように, コラーゲン線維の構造を電子顕微鏡で観察し, 変性が微細構造に及ぼす影響を検討した.

化学構造的に関連性のある HEMA と MMA についての吸着量を比較すると, 平衡吸着量は BTC(N)に対しては $v_N(\text{HEMA}) = 7.4 \mu \text{ mol g}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, $v_N(\text{MMA}) = 0.97 \mu \text{ mol g}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, BTC(D)に対しては $v_D(\text{HEMA}) = 4.3 \mu \text{ mol g}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, $v_D(\text{MMA}) = 0.41 \mu \text{ mol g}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ であり, 同一状態のコラーゲンに対しては MMA に比べて HEMA の吸着量が非常に高かった. この差は, HEMA と MMA の化学構造の違いに起因しているものと考えられる. 両者はメタクリロイル基 ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-C}(=\text{O})\text{O-}$) を共通に持つことから, 吸着特性の差は HEMA の 2-ヒドロキシエチル基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) と MMA のメチル基 ($-\text{CH}_3$) の違いに由来している. また, 同族体アルコールであるエタノールとメタノールを比較すると, 平衡吸着量は BTC(N)に対しては $v_N(\text{EtOH}) = 0.52 \mu \text{ mol g}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, $v_N(\text{MeOH})$

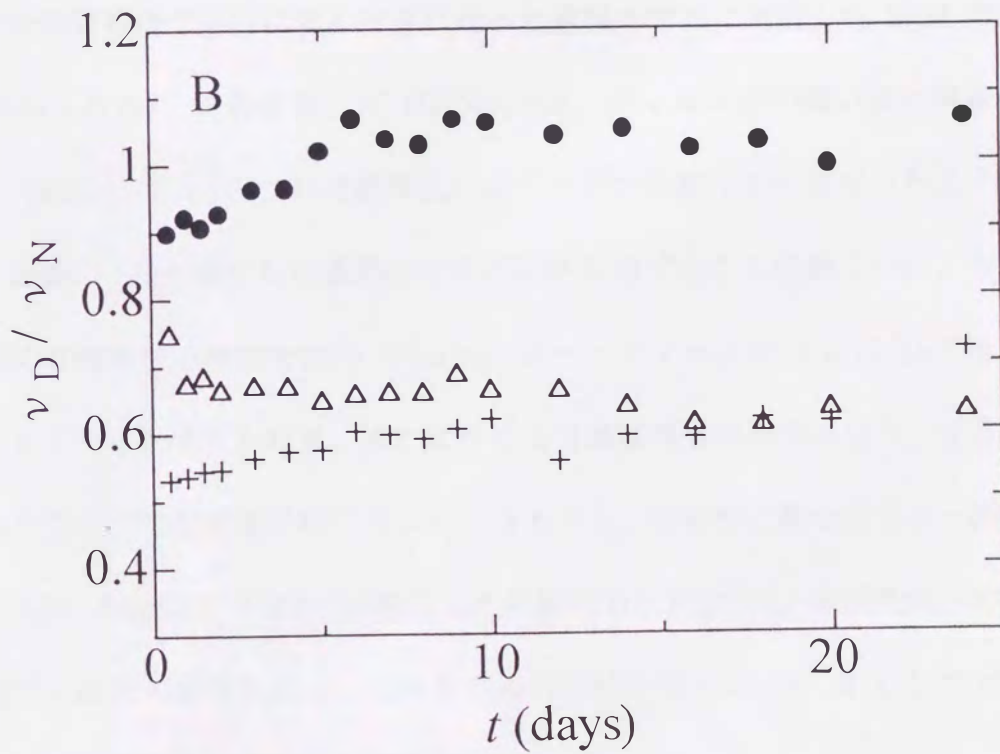
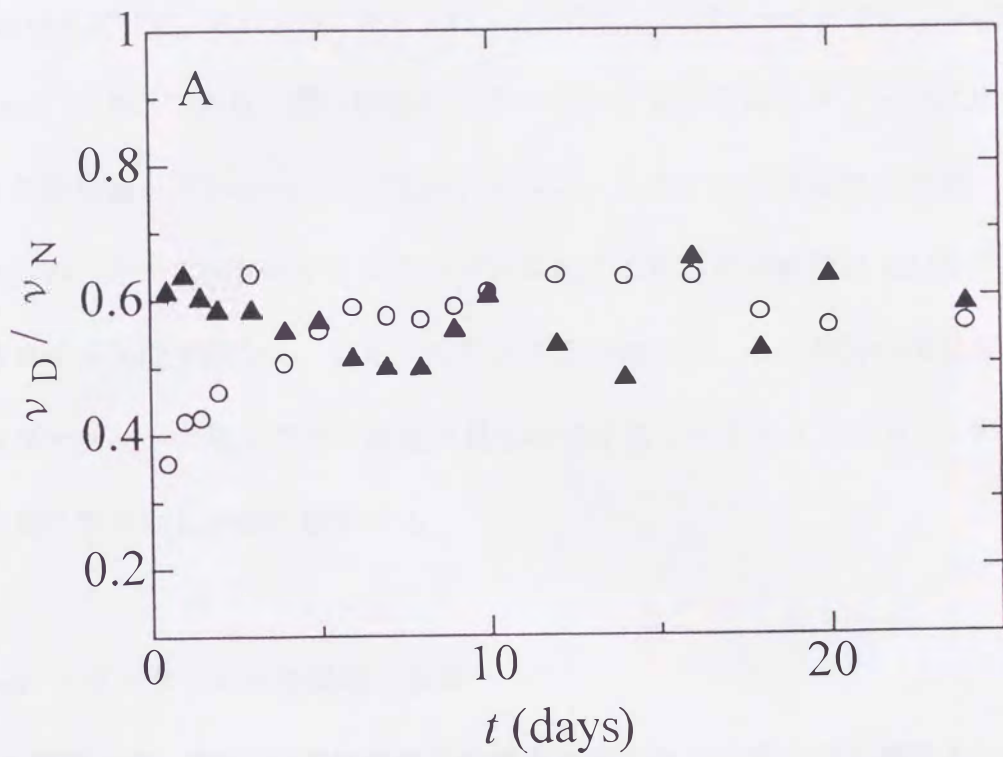


図 2-9 吸着量比 v_D/v_N の経時変化.
 ○ : HEMA, ▲ : MMA, △ : メタノール,
 + : エタノール, ● : 蒸留水.

$= 0.38 \mu \text{ mol g}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, BTC(D)に対しては $v_D(\text{EtOH}) = 0.32 \mu \text{ mol g}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, $v_D(\text{MeOH}) = 0.23 \mu \text{ mol g}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ であり, 同一状態のコラーゲンに対してはメタノールに比べてエタノールの吸着量が高かった. この差は, アルコールのアルキル鎖部分の違いによる.

これらのことから, HEMA のコラーゲンに対する相互作用部位は MMA と共通のメタクリロイル部位ではなく, 2-ヒドロキシエチル部位で, その部分の構造が変わることによってコラーゲンへの相互作用の程度が異なってくるものと考えられる. この点については, 第3章で別に詳細に検討する.

2-3-3 コラーゲンの表面構造と吸着

SEM 観察より, BTC(N)では線維状の構造が見られ, 三重らせん構造のコラーゲン分子が分子間架橋で平行に並んで束になった線維モデルに対応した SEM 像が得られた (図 2-10 A). これに対して BTC(D)では, フィルム様の薄い膜状構造が多く見られた (図 2-10 B). これは線維状のコラーゲンが融合して連なったように見える. 2次元画像の SEM 像から定量的に表面の起伏を論ずることは難しいが, 少なくとも定性的には線維状の構造を保つ BTC(N)に比べてフィルム状の BTC(D)では比表面積が減少していると考えられる. また変性により表面構造が平滑になり, 小さな間隙が消失したことで毛管凝縮が起こりにくくなるのも, 吸着量に差の生じる一因と思われる. さらに, 線維状の BTC(N)が融合した状態の BTC(D)では, 線維内部への物質の浸透が妨げられた可能性もある. これらの幾何学的な理由により BTC(D)では BTC(N)よりも吸着量が低下したと解釈した.



図 2-10 A BTC(N)の SEM 像 (×350)

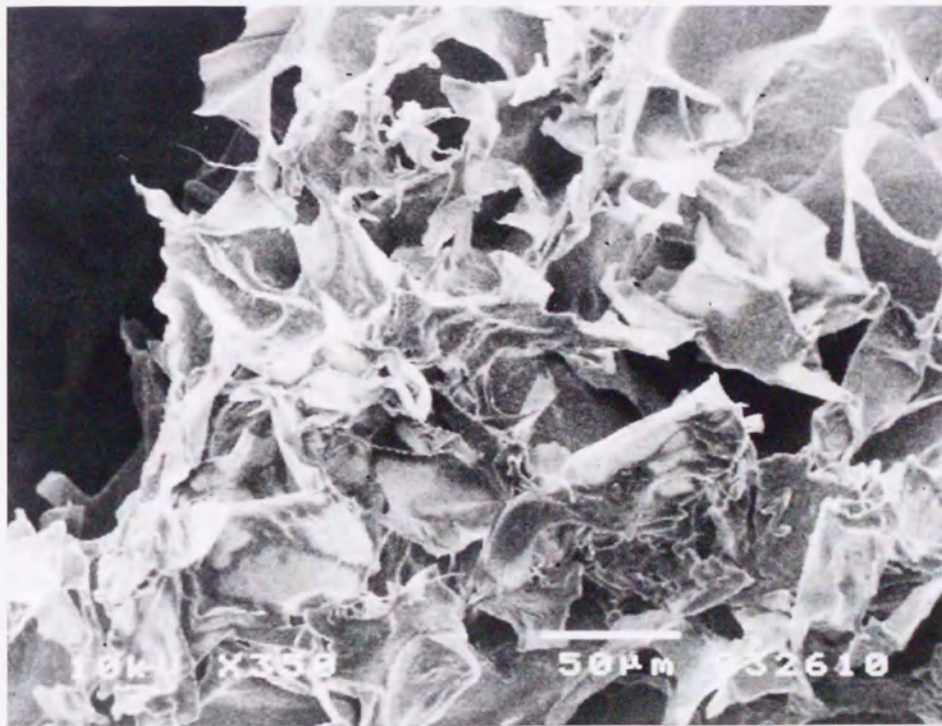


図 2-10 B BTC(D)の SEM 像 (×350)

2-3-4 吸着の可逆性

吸着平衡後、吸着物質の脱着操作を行ったコラーゲンの重量は、吸着前の重量と比べ、5%以内の誤差で等しく、すべての吸着物質において吸着量と脱着量が一致することがわかった。このことから、コラーゲンへの HEMA, MMA, エタノール, メタノール, 水の吸着は、コラーゲンの変性、未変性状態に関わらず可逆的な物理吸着であり、反応を伴う化学吸着ではないと結論される。

また、脱着後の BTC(N)について DSC 測定を行うと、その変性温度は吸着前の BTC(N)とほぼ同じであった。これに対して次章で述べるように、HEMA 等の物質が共存する状態では変性温度が著しく変わる。すなわち、これらと相互作用している状態では熱安定性に関してコラーゲンは何らかの影響を受けているが、脱着操作後の熱安定性は吸着前と同じであるとみなせる。このことから、真空乾燥という単純な脱着操作で吸着物質が除去された、すなわち吸着は物理吸着であったと言える。