

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15800

研究課題名(和文)デュアルファンクションポリマーによる持続的抗菌性発現技術の開発

研究課題名(英文) Development of dual-function polymer with the ability to exhibit long-lasting antibacterial effects

研究代表者

今里 聡 (Imazato, Satoshi)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：80243244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、MDPBとMPCの混合濃度の異なる5種のコポリマーからなるコート液を試作し、それらを用いてコートしたレジン表面でのタンパク吸着阻害作用、Streptococcus mutansに対する抗菌効果、ならびにバイオフィーム形成抑制作用を評価した。その結果、試作した5種のコート材のうち、MDPBおよびMPCをともに15(wt)%の割合で混合して作製したコポリマーからなるコート材は、唾液の存在下でも、レジン表面への唾液タンパクの吸着を阻害し、固定化されたMDPBによる接触型の抗菌効果を十分に発現することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔領域の疾患の多くは口腔内に棲息するさまざまな細菌の感染に起因しているが、義歯や充填材等の修復材料に用いられているレジン系材料は、元来、口腔細菌に対する抑制作用を示さないため、その表面への細菌付着とバイオフィーム形成による二次的疾患や材料の劣化が引き起こされることが問題となっている。本研究により、MDPB/MPC二元系ポリマーによって実際の口腔内のような唾液タンパクの存在下でも接触型の抗菌効果を発現できる技術を開発できたことで、薬剤の溶出に依存せずに細菌の付着を抑制できるさまざまな歯科材料の実用化が可能となると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, five experimental surface coatings composed of copolymers of MDPB and MPC at different ratios were fabricated. Each coat was applied to the resin surface, and the protein repellent properties, antibacterial effects against Streptococcus mutans, and inhibitory effects of biofilm formation were evaluated. The copolymer composed of 15 (wt)% MDPB and 15(wt)% MPC inhibited protein adsorption and exhibited bactericidal effects on its surface, indicating that this composition was effective to achieve contact inhibition of bacteria in the presence of saliva.

研究分野：歯科材料学，生体材料学

キーワード：歯学 歯科材料 レジン ポリマー 抗菌性 タンパク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、歯科用修復材料が具備すべき重要な機能のひとつとして抗菌性に注目が集まり、歯科用レジンに抗菌性を付与する試みが盛んに行われるようになってきた。研究代表者らは、古くからレジン系材料への抗菌性付与に関する研究を進め、抗菌性モノマー 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB)を開発し、さまざまな歯科用修復材料への応用研究を展開してきた。しかし、口腔内環境では修復材料表面に唾液タンパクが吸着するため、MDPBの重合によって材料表面に固定化された抗菌活性部位がマスクされてしまい、抗菌効果が著しく減弱するという問題がある。そこで、研究代表者は、超親水性や立体排除機構によってタンパク吸着を抑制することが知られている 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)に着目し、MDPBにMPCを組み合わせれば、MPCの抗 biofouling 効果によってタンパクの被覆が阻害され、固定化 MDPB による接触型の抗菌効果を確実に発揮させることが可能となるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、MDPBとMPCの混合濃度の異なる5種のコポリマーからなるコート液を試作し、これらを用いてコートしたレジン表面でのタンパク吸着阻害作用、および *Streptococcus mutans* に対する抗菌効果を評価した後、バイオフィーム形成試験を実施して、唾液タンパクの存在下でも接触型の抗菌効果を発現できる MDPB/MPC 二元系ポリマーの組成の確定を目指した。

3. 研究の方法

1) MDPB/MPC 二元系ポリマーの作製

MDPB、MPC、および MPC の溶解性調整成分としての n-butyl methacrylate (BMA) を重量比で 0/30/70、5/25/70、15/15/70、25/5/70、30/0/70 の割合で混合し、ラジカル重合させた後、未反応物の除去を行い、5種の精製ポリマーを得た。合成した各ポリマー粉末をエタノールに溶解させてコート液を作製し、polymethyl methacrylate レジンディスクをコート液に浸漬して、MDPB/MPC/BMA コート試料を作製した。以下、MDPB/MPC/BMA = 0/30/70、5/25/70、15/15/70、25/5/70、30/0/70 のポリマーでコートした試料を、それぞれ、D0/C30、D5/C25、D15/C15、D25/C5、D30/C0 とする。

2) タンパク吸着抑制効果の検討

2-1) モデルタンパクの吸着状態の観察と吸着量の測定

各コート試料を Fluorescein isothiocyanate でラベルしたウシ血清アルブミン (FITC-BSA) 溶液に浸漬し、共焦点レーザー顕微鏡により BSA の吸着状態を観察した。

また、各コート試料をウシ血清アルブミン (BSA) 溶液に浸漬後、ドデシル硫酸ナトリウム溶液を用いて吸着した BSA を回収し、BCA プロテインアッセイにて吸着量を測定した。

2-2) ヒト唾液タンパクの吸着量の測定

健康な成人 2 名より採取した唾液に各コート試料を浸漬後、BCA プロテインアッセイにてタンパク吸着量を測定した。

3) *S. mutans* に対する抗菌効果の検討

1%スクロース添加 BHI 培地を用いて、 1×10^3 CFU/mL に調整した *S. mutans* NCTC10449 の菌液 20 μ L を各コート試料上に播種し、24 時間培養後、コロニーカウント法によって菌数測定を行った。

4) 唾液存在下でのバイオフィーム形成試験

1%スクロースを添加した *S. mutans* NCTC10449 の菌液 (1×10^6 CFU/mL) に、唾液処理を施した各コート試料を浸漬し、48 時間培養後、試料上に形成したバイオフィームの付着状態を走査型電子顕微鏡 (SEM)にて観察した。また、Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit を用いて形成したバイオフィームを染色後、Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) にて観察し、得られた三次元画像からバイオフィームの厚み、およびバイオフィーム中の生菌・死菌の割合を算出した。

4. 研究成果

1) タンパク吸着抑制効果の検討

5 種のコート試料のうち、D0/C30、D5/C25、D15/C15 の 3 種では BSA の有意な吸着抑制が認められ、とくに D0/C30 と D5/C25 においてより吸着量が少なかった (図 1)。

ヒト唾液タンパクにおいても、MPC の濃度が高くなるにしたがって、その吸着量が減少する傾向が認められた。

2) *S. mutans* に対する抗菌効果の検討

いずれのコート試料においても非コートのコントロールレジンに比べて生菌数の有意な低下が認められたが、とくに D30/C0、D25/C5、D15/C15 の 3 種の試料上では、*S. mutans* が完全に死滅することが確認された (図 2)。

3) 唾液存在下でのバイオフィーム形成試験

抗菌試験の結果と、MPC の濃度が高くなるにしたがって BSA および唾液タンパクの吸着が抑制される傾向があるという結果を踏まえて、作製した 5 種のうちでは、MDPB/MPC/BMA = 15/15/70 のポリマーによるコートが、唾液存在下で抗菌効果を発揮させるうえで最も有望であると考えられた。

そこで、実際に唾液が存在する条件下での抗菌効果を評価するため、D15/C15、D0/C30、D30/C0、および非コートの 4 種の試料を用いて、バイオフィーム形成試験を実施した。

まず、SEM にて試料上に形成されたバイオフィームを観察したところ、D30/C0 および非コート試料に比べて、D0/C30、D15/C15 では細菌の付着が少なかった。また、CLSM 観察によって得られた三次元画像からバイオフィームの厚みを測定した結果、MPC を組成に含む D0/C30 および D15/C15 では、D30/C0 や非コート試料に比べて薄いことが分かった (図 3)。さらに、各試料上でのバイオフィーム中の生菌・死菌の割合を画像解析によって算出したところ、MDPB を含む D15/C15、D30/C0 では、死菌率がそれぞれ 60.5% および 62.5% と高い値を示したのに対して、D0/C30 では死菌率が 37.5% と低かった。

以上のように、本研究により、MDPB および MPC をともに 15(wt)% の割合で混合して作製したコポリマーからなるコート材は、唾液の存在下でも、レジン表面への唾液タンパクの吸着を阻害し、固定化された MDPB による接触型の抗菌効果を十分に発現することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Hashimoto M, Hirose N, Kitagawa H, Yamaguchi S, Imazato S. Improving the durability of resin-dentin bonds with an antibacterial monomer MDPB. Dent Mater J. 査読有, 37: 620-627, 2018. DOI: 10.4012/dmj.2017-209.

Muratovska I, Kitagawa H, Hirose N, Kitagawa R, Imazato S. Antibacterial activity and dentin bonding ability of combined use of Clearfil SE Protect and sodium hypochlorite. Dent Mater J. 査読有, 37: 460-464, 2018. DOI: 10.4012/dmj.2017-294.

Kitagawa H, Miki-Oka S, Mayanagi G, Abiko Y, Takahashi N, Imazato S. Inhibitory effect of resin composite containing S-PRG filler on *Streptococcus mutans* glucose metabolism. J Dent. 査読有, 70: 92-96, 2018. DOI: 10.1016/j.jdent.2017.12.017.

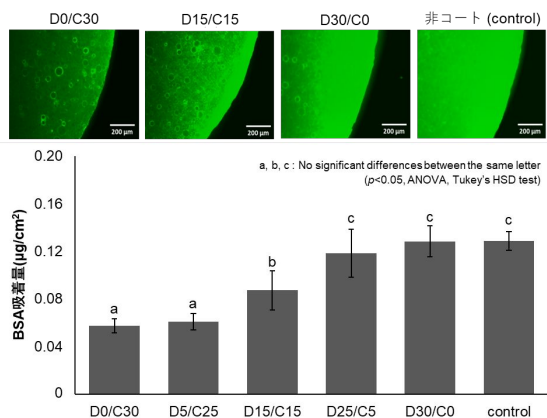


図 1. コーティング試料上での BSA の吸着

(A) FITC-BSA 吸着状態 (蛍光顕微鏡像)、(B) BSA 吸着量

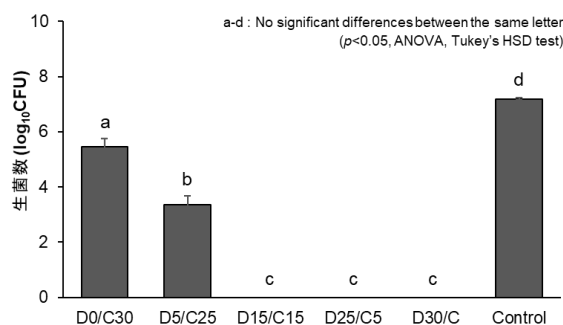


図 2. コーティング試料上で 24 時間培養後の生菌数

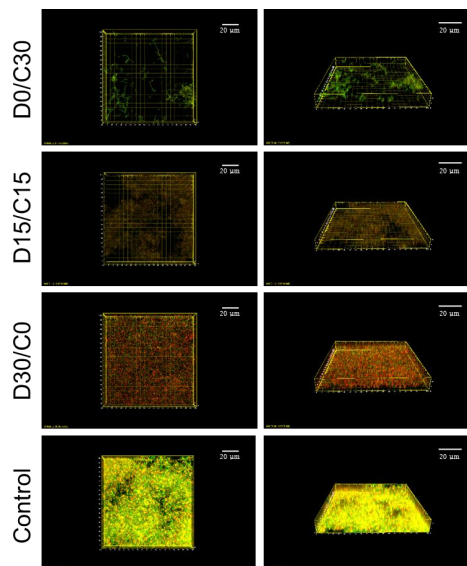


図 3. コーティング試料上でのバイオフィーム形成

(CLSM 像)

Kamonwanon P, Hirose N, Yamaguchi S, Sasaki JI, Kitagawa H, Kitagawa R, Thaweboon S, Srihirin T, Imazato S. SiO₂-nanocomposite film coating of CAD/CAM composite resin blocks improves surface hardness and reduces susceptibility to bacterial adhesion. Dent Mater J. 査読有, 36: 88-94, 2017. DOI: 10.4012/dmj.2016-135.

今里 聡. 抗菌性を発揮する“バイオアクティブ”な修復材・コーティング材を用いたう蝕の予防とマネージメント. 小児歯科臨床. 査読無, 21: 29-33, 2016.

[学会発表](計 10件)

Imazato S. Approaches to achieve next generation restorative materials with “bio-active” functions. Turkish-Japanese Dental Workshop, 2019/2/10, Istanbul, Turkey.

Thongthai P, Kitagawa H, Kitagawa R, Hirose N, Iwasaki Y, Imazato S. Novel surface coating composed of MDPB and MPC with antibacterial effect and protein repellent ability. 8th Japan-Thailand-Korea Joint Symposium, 2018/11/27, London, England.

Imazato S. Approaches to achieve next generation restorative materials with “bio-active” functions. The 37th Annual Academic Session of the Korean Division of the IADR, 2018/11/10, Seoul, Korea.

Thongthai P, Kitagawa H, Kitagawa R, Hirose N, Iwasaki Y, Imazato S. Anti-biofilm effects of dual-functional coating composed of MDPB and MPC. 96th General Session of the IADR, 2018/7/28, London, England.

Imazato S. New generation restorative materials with “bio-active” functions. 2018 Seoul National University International Conference for Future Dentistry, 2018/6/22, Seoul, Korea.

Thongthai P, Kitagawa H, Kitagawa R, Hirose N, Iwasaki Y, Imazato S. Antibacterial and protein-repellent surface coating composed of MDPB and MPC. 第65回国際歯科研究学会日本部会学術大会, 2017/11/19, 東京都.

Imazato S. “Bio-active bonding” by antibacterial adhesive -Essential strategy for treatment of caries. Keynote Lecture, The 7th Temu Ilmiah Nasional (TIMNAS) and The 4th Joint Scientific Meeting in Dentistry, 2017/10/7, Surabaya, Indonesia.

Imazato S. Caries management and prevention by “bio-active” restorative/coating materials. 89th Congress, Taiwan Academy of Pediatric Dentistry, 2017/1/8, Taipei, Taiwan.

Imazato S. Antibacterial and bioactive dental restorative materials: Do they really work? “Incorporation of bacterial inhibitor in dental resins”. 94th General Session & Exhibition of the IADR, 2016/6/24, Seoul, Korea.

Imazato S. Caries management and prevention by “bio-active” restorative/coating materials with antibacterial effects. 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, 2016/5/27, Tokyo, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：岩崎 泰彦

ローマ字氏名：IWASAKI YASUHIKO

所属研究機関名：関西大学

部局名：化学生命工学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：90280990

研究分担者氏名：北川 晴朗
ローマ字氏名：KITAGAWA HARUAKI
所属研究機関名：大阪大学
部局名：歯学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：50736246

研究分担者氏名：北川 蘭奈
ローマ字氏名：KITAGAWA RANNA
所属研究機関名：大阪大学
部局名：歯学部附属病院
職名：医員
研究者番号（8桁）：70711068

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。