

機関番号：32650

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592281

研究課題名 (和文) 歯冠用硬質レジンへの唾液タンパクの吸着をコントロールできるのか

研究課題名 (英文) Can you control saliva protein adsorption to crown composite resins surfaces?

研究代表者

三宅 菜穂子 (MIYAKE NAHOKO)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40276978

研究成果の概要 (和文) : アパタイトと歯冠用硬質レジン (レジン) 表面への唾液タンパク吸着を想定し、アパタイトとレジン、牛血清アルブミン (BSA)、吸着実験前後と BSA のゼータ電位から、BSA の吸着状態を比較した。レジンでは BSA とのゼータ電位の差が大きい場合、吸着実験後のゼータ電位が BSA のゼータ電位の影響を受け、負に小さくなると考えられた。以上により歯冠用硬質レジンではタンパクの吸着をコントロールできることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : The aim of the present study was to examine bovine serum albumin (BSA) adsorption to hydroxyapatite and crown composite resin (resin) surfaces by means of zeta potential. We measured the zeta potentials of resins alone, BSA alone and hydroxyapatite and resins after BSA adsorption. These results showed the zeta potentials of resins used for prosthodontic materials with BSA adsorption were demonstrated less negative than without BSA. As a result the materials might have possibility to control the adsorption protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：ゼータ電位、接触角、補綴材料、アパタイト、牛血清アルブミン

1. 研究開始当初の背景

界面における微生物の吸着、脱離などの挙動に作用する力として①物質を構成している分子の間に働く力 (疎水性) と②表面電荷に起因する電氣的相互作用の 2 種類がある。接触角や表面自由エネルギーを測定することにより物質表面の疎水性を定性的に評価することができるが、表面電位の測定は難し

く、電気泳動移動度から界面動電位 (ゼータ電位) を計算し、定量している (森崎久雄、大島広行、磯辺賢治編集 (1998) : バイオフィルムその生成メカニズムと防止のサイエンス.)。

歯科修復材料の表面自由エネルギーに着目して材料への口腔内細菌の付着性を調べる試みは数多くなされている。In vivo で表

面自由エネルギーの異なる数種の材料表面に形成されるプラーク（3日後のプラーク）を調べた研究では、表面自由エネルギーの低い材料表面は高いものよりも形成されるプラーク中の細菌数が少ないことが報告されている。さらに、それらの材料表面に付着した細菌叢を調べたところ、表面自由エネルギーの低い材料には表面自由エネルギーの低い細菌が付着しており、高い材料では表面自由エネルギーの高い細菌が付着する結果が得られている（Weerkamp, A. H., Quirynen, M., Marechal, M., Van Der Mei, H. C., Van Steenberghe, D., Busscher, H. J. (1989) : The role of surface free energy in vivo formation of dental plaque on human enamel and polymeric substrata, *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2, 11-18.)。

これまで申請者は補綴材料表面に対する口腔内細菌の吸着の機序を明らかにすることを目的とし、補綴材料への口腔内細菌の吸着実験によって界面における口腔内細菌の初期挙動を明らかにし、口腔内細菌と補綴材料の界面化学的性質をゼータ電位の測定によって調べ、補綴材料表面に対する口腔内細菌の吸着には、静電的相互作用が関与していることを明らかとし、ゼータ電位は補綴材料への口腔内細菌の吸着現象に重要な因子であることを示した（中村菜穂子(1995)：補綴材料への口腔内細菌の吸着に関する実験的研究、*歯科学報*、95、375～390）。

ひきつづき、電気泳動光散乱光度計（大塚電子社製、ELS-800）による口腔内細菌（5種 17 菌株）および平板状の歯冠用硬質レジン（エナメル6種）のゼータ電位測定を行った（三宅菜穂子、佐藤 亨、眞木吉信(2002)：歯冠用硬質レジンのゼータ電位の測定、*日補綴歯会誌* 46(107 回特別号)、164）。

さらに被験材料にはアパタイトを加え、アパタイト表面へのレーザー照射前後のゼータ電位のほかに接触角の測定と SEM・AFM による微細構造観察し比較したところ、ゼータ電位ではレーザー照射前 (-9.1 mV±1.9、n=18) よりもレーザー照射後 (-11.2 mV±1.7、n=9) のほうが負に大きくなる傾向が認められ、接触角ではレーザー照射前 (29.5° ± 4.9、n=37) よりもレーザー照射後 (27.5° ± 4.08、n=14) のほうが小さくなる傾向が認められ、SEM 像ではアパタイト表面へのレーザー照射の有無にかかわらずいずれも多数の研磨傷が観察され、差異はみとめられなかったが、AFM3 次元表示（断面プロファイル）像ではレーザー照射アパタイトは非照射アパタイトよりも研磨傷先端が丸くなっていた（Kenich Matuzaka, Nahoko Miyake, et al. : Transformation of hydroxyapatite surface characteristics during diode laser irradiation, *Biomedical Research*,

25(2), 105～108, 2004)。ついで電気泳動装置を用いた試料片表面への牛血清アルブミン (BSA) の吸着実験では、吸着実験前後のゼータ電位から BSA の吸着状態を比較した。歯冠用硬質レジンでは材質によって BSA の吸着状態をコントロールできることが示唆された。一方、アパタイトでは今回使用したレーザー照射条件で非アパタイトとレーザー照射アパタイトに BSA 吸着状態に差が認められず、レーザー照射後のアパタイト表面への唾液タンパクの吸着阻止効果は確認できなかった（基盤研究(C) 17592045、17年度～18年度、ゼータ電位による補綴材料およびアパタイト表面への唾液タンパク吸着性と吸着防止評価）。

2. 研究の目的

本研究は、吸着前後のゼータ電位を測定することによって表面荷電密度の変化が認められ吸着量を計算できるという原理に基づき、補綴材料の開発と関連してタンパクや酵素など生体高分子の吸着性の評価、洗浄によるタンパク質の剥離、コーティングによる吸着防止などを検討するものである。

3. 研究の方法

本研究では歯冠用硬質レジン（レジン）とアパタイトへの唾液タンパクの吸着を想定し、レジンとアパタイトと牛血清アルブミン (BSA) それぞれ単体と BSA 吸着実験後の表面のゼータ電位を測定した。それぞれのゼータ電位の所見から静電的相互作用の関与について考察した。

(1) 被験材料

① 平板試料（レジンとアパタイト）

レジンにはボディレジン 8 種を使用し、大きさは 25×50×3 mm とした。アパタイトには焼結アパタイト（アパタイトペレット™、ペンタックス社製）を使用し、大きさは 20×40×2 mm とした。

表 1. 実験に使用したレジン

製造販売業者	
エステニアC&B	クラレメディカル
エブリコード	クラレメディカル
グラディア	ジーシーデンタルプロダクツ
グラディアフォルテ	ジーシーデンタルプロダクツ
セラマージュ	松 風
ソリデックス	松 風
プロシモ	ジーシーデンタルプロダクツ
ルナウイング	山本貴金属地金

耐水研磨紙（# 180、# 320、# 600、# 1200）で平面を仕上げ、アルミナ質研磨材（5 μm、0.05 μm）を用いてバフ研磨を行いプレート状に調整した。その後 15 分間超音波洗浄し、ディシケーターに 1 週間保存してから使用した。

②粉砕試料（レジン）

ボディレジン8種を使用し、300~1000 nmの粒径に粉砕して使用した。

③BSA

試料へ吸着させるタンパクには BSA (Sigma-Aldrich Co. 製、Missouri、St. Louis) を用いた。BSA 2.0×10^{-5} mol/l を 10 mM NaCl に溶解させて調整した。なお、10 mM NaCl は大気圧下での CO₂ 吸収の平衡状態が pH5.6 であった。

(2) ゼータ電位測定

①平板試料

平板状材料の表面電位が測定可能な電気泳動光散乱光度計 (ELS-800™ 大塚電子社製) を使用した。測定に際しては材料と相互作用をもたないモニター粒子として、ポリスチレンラテックス (粒径: 520 nm、大塚電子社製) をヒドロキシプロピルセルロース (MV=30 $\times 10^5$ 、Scientific Polymer Products 社製) でコーティングしたものを使用し、10 mM NaCl (pH5.6) に懸濁させ測定した。

②粉砕試料と BSA、モニター粒子

画像処理法を応用した顕微鏡式電気泳動装置 (ZEEMOM ZC-2000™、マイクロテック・ニチオン社製) を使用した。これは顕微鏡下で電気泳動によって動く粒子をテレビ画面に映し出し、移動した粒子の距離をパソコンで画像処理することによって、ゼータ電位を自動的に求めるものである。

また特性の異なる装置間での測定値を比較するためにモニター粒子のゼータ電位も測定した。

(3) BSA 吸着実験

①平板試料

BSA 2.0×10^{-5} mol/l を 10 mM NaCl (pH5.6) に懸濁し、注入して 30 分放置し、その後セルおよびチューブ系統を 10 mM NaCl 約 50 ml を流して洗浄し、10 mM NaCl にモニター粒子を注入してゼータ電位を測定した。

②粉砕試料

2.0×10^{-5} mol/L の 10 mM NaCl-BSA 溶液 1.5 ml に試料 5 mg を分散させ、①20~25℃で rotator にて 50rpm で回転させ 3 時間 (pH5.7) ②37℃で rotator にて 6 rpm で回転させ 1 時間 (pH6.5) BSA を吸着させる 2 条件とした。

(4) 接触角の測定には静滴法を用いた。

4. 研究成果

(1) 平板試料のレジン表面のゼータ電位と BSA 吸着実験後のゼータ電位の比較と接触角から次のような 3 つの傾向が認められた。

BSA 吸着実験後のゼータ電位が正に大きくなった材料 (エプリコードとソリデックス、エステニアC&B)、BSA 吸着実験後のゼ

ータ電位が負に大きくなった材料 (ルナウイングとグラディアフォルテ)、BSA 吸着実験後のゼータ電位に有意な差が認められず、接触角が大きい材料 (セラマージュとプロシモ、グラディア) に分けられた。

表 2. レジンのゼータ電位と接触角

	ゼータ電位 (mV)		接触角 (°)
	BSA 吸着前	BSA 吸着後	
エステニアC&B	13.4 ±3.6	24.4 ±0.6	52.6±0.8
エプリコード	18.0 ±1.0	30.9 ±0.6	49.4±1.8
グラディア	27.3 ±0.7	26.1 ±0.6	63.7±0.7
グラディアフォルテ	-0.9 ±0.8	-7.0 ±0.7	49.9±1.3
セラマージュ	23.5 ±4.9	27.6 ±0.1	99.5±1.5
ソリデックス	18.5 ±0.6	30.1 ±0.4	49.8±4.7
プロシモ	-0.2 ±0.1	-3.7 ±0.8	64.3±0.8
ルナウイング	2.0 ±1.0	-7.3 ±0.3	50.3±3.9

以上により、歯冠用硬質レジンでは BSA の吸着前後のゼータ電位と接触角の測定によって材料表面への BSA 吸着が多いものと少ないものに分けられる可能性が示唆された。

(2) アパタイト、BSA それぞれ単体と BSA 吸着実験後のアパタイト表面のゼータ電位を測定した。それぞれのゼータ電位の所見から静電的相互作用の関与について考察した。

アパタイト平板表面と BSA のゼータ電位はすべて負となり、BSA はアパタイトよりも負に小さかった。アパタイト表面への BSA 吸着実験後のゼータ電位はアパタイト表面のゼータ電位よりも負に大きな値を示し、有意な差 ($p < 0.0001$) が認められた。

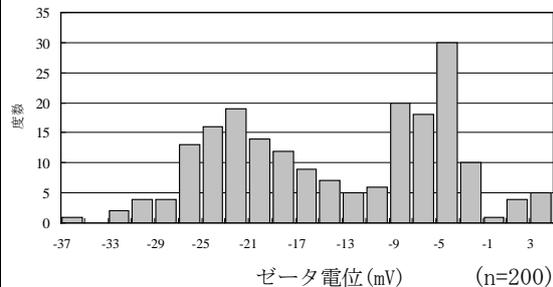


図 1. BSA のゼータ電位

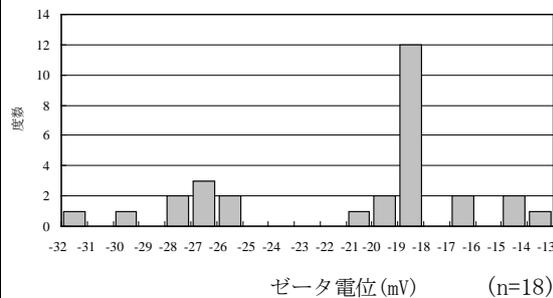


図 2. BSA 吸着後のアパタイト表面のゼータ電位

BSA 単独のゼータ電位にはヒストグラムに 2 つのピークが認められ、また BSA 吸着後のアパタイト表面にも BSA 単独と同様に 2 つのピークがみられた。このことからアパタイト表面に対する BSA の吸着に静電的相互作用の関与が示唆された。(ゼータ電位によるアパタイト表面への牛血清アルブミンの吸着に関する実験的研究、歯科学報、110、105~109)

(3) 粉碎したレジン、BSA それぞれ単体と BSA 吸着実験後のアパタイト表面のゼータ電位を測定した。それぞれのゼータ電位の所見から静電的相互作用の関与について考察した。

表 3. pH5.7 におけるゼータ電位 (n=150)

	ゼータ電位 (mV)	
	BSA吸着前	BSA吸着後
エステニアC&B	-36.5 ± 4.2	-11.2 ± 3.5
エブリコード	-23.1 ± 11.2	-19.2 ± 3.6
グラディア	-35.9 ± 6.8	-26.4 ± 4.2
グラディアフォルテ	-38.6 ± 5.7	-26.5 ± 3.9
セラマージュ	-23.8 ± 4.8	-21.0 ± 3.1
ソリデックス	-43.1 ± 6.9	-14.0 ± 4.4
プロシモ	-21.7 ± 6.4	-14.9 ± 3.1
ルナウイング	-16.9 ± 5.5	-17.7 ± 4.6
BSA	-14.5 ± 9.4	

表 4. pH6.5 におけるゼータ電位 (n=150)

	ゼータ電位 (mV)	
	BSA吸着前	BSA吸着後
エステニアC&B	-33.5 ± 7.9	-28.2 ± 5.7
エブリコード	-31.7 ± 6.0	-25.1 ± 5.4
グラディア	-40.8 ± 10.1	-21.2 ± 5.2
グラディアフォルテ	-48.1 ± 8.4	-33.9 ± 4.1
セラマージュ	-42.3 ± 7.4	-25.9 ± 5.6
ソリデックス	-29.9 ± 7.4	-34.6 ± 6.8
プロシモ	-32.5 ± 6.4	-21.0 ± 5.0
ルナウイング	-38.1 ± 9.0	-21.2 ± 5.5
BSA	-19.6 ± 6.0	

レジンと BSA のゼータ電位はすべて負となり、BSA はレジンよりも負に小さかった。条件①では 1 種には吸着前後の変化は認められなかったが、ほかの 7 種は負に小さくなった ($p < 0.0001$)。吸着前後の変化は 2 種が少なく、2 種で大きかった。条件②では 3 種はレジンと BSA のゼータ電位の差が小さく、ほかの 5 種は BSA のゼータ電位との差が大きかった。BSA 吸着後は、1 種を除き負に小さくなった ($p < 0.0001$)。

以上により、レジンと BSA のゼータ電位の差が小さい場合、静電的相互作用は反発力として作用するため、BSA の吸着量が少なく BSA 吸着前後のゼータ電位の差が小さいと考えられた。しかし、ゼータ電位の差が大きい場合、引力型へ逆転するため、BSA の吸着量が多く、BSA 吸着後のゼータ電位が BSA のゼータ電位の影響を受け、負に小さくなると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 三宅菜穂子、佐藤 亨、眞木吉信、ゼータ電位によるアパタイト表面への牛血清アルブミンの吸着に関する実験的研究、歯科学報、査読あり、110 巻、2010、105—109

[学会発表] (計 5 件)

- ① 三宅菜穂子、佐藤 亨、眞木吉信、ゼータ電位による歯冠用硬質レジンへの BSA 吸着性の評価、第 117 回日本補綴歯科学会学術大会、平成 20 年 6 月 7~8 日、名古屋市、日本補綴歯科学会誌、52(第 117 回特別号)、192、2008
- ② 三宅菜穂子、佐藤 亨、眞木吉信、冨田友美子、歯科材料のゼータ電位と接触角、第 47 回日本油化学会年会、平成 20 年 9 月 18~19 日、東京、第 47 回日本油化学会年会講演要旨集、251、2008
- ③ 三宅菜穂子、佐藤 亨、眞木吉信、粉碎した歯冠用硬質レジンへの BSA 吸着性の評価、第 118 回日本補綴歯科学会学術大会、平成 21 年 6 月 6~7 日、京都市、日本補綴歯科学誌 1(第 118 回特別号)、239、2009
- ④ 三宅菜穂子、佐藤 亨、眞木吉信、冨田友美子、粉末歯科材料および牛血清アルブミンのゼータ電位、第 48 回日本油化学会年会、平成 21 年 9 月 10~12 日、名古屋市、第 48 回日本油化学会年会講演要旨集、237、2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 菜穂子 (MIYAKE NAHOKO)
東京歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：40276978

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：