

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09892

研究課題名（和文）口腔バイオフィーム制御能を備えた酵素担持フィラーの開発と修復材料への応用

研究課題名（英文）Development of enzyme-loaded fillers with the ability to control oral biofilm and their application to restorative materials

研究代表者

神野 友樹（Kohno, Tomoki）

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号：10839202

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、口腔バイオフィームの菌体外多糖を分解するデキストラナーゼやフルクタンナーゼを担持させたフィラーを新規に作製し、修復材料への応用が可能なバイオフィーム制御技術確立を試みた。その結果、シリカ系多孔質フィラーに3-アミノプロピルトリエトキシランを反応させ、グルタルアルデヒドによりアルデヒド基を修飾することにより、各酵素が活性を維持した状態でフィラー表面に固定化されることが明らかとなった。しかし、各酵素担持フィラーを配合したレジン系コート材表面での抗バイオフィーム効果は認められなかったことから、さらに高濃度の酵素をフィラー表面に固定化する必要があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固定化酵素は、一般的な化学触媒とは異なり、常温・常圧の条件下での反応性が高く、効率的で作用特異性の高い触媒として食品や繊維、医薬品製造などの工業化学の分野で応用されている。一方で、抗バイオフィーム効果の発現を目的とした各種酵素を担持させたフィラーの開発やそれを歯科修復材料に応用する試みはこれまで報告されていない。本研究により、デキストラナーゼやフルクタンナーゼといったバイオフィームの菌体外多糖を分解する酵素をフィラー表面に固定化する技術の確立に成功した。今後、これらの酵素を高濃度で固定化する手法を検討することで、臨床的に有用な口腔バイオフィーム制御技術の確立が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a novel filler loaded with dextranase and fructanase that degrade extracellular polysaccharides in oral biofilms and establish a biofilm control technology applicable to restorative materials. As a result, it was found that the enzymes dextranase and fructanase could be immobilized on the surface of a silica-based porous filler while maintaining their activity by reacting the filler with 3-aminopropyltriethoxysilane and modifying it with glutaraldehyde to introduce aldehyde groups. However, since the anti-biofilm effect was not observed on the surface of the resin-based coating material containing the enzyme-carrying filler, it suggested the need to immobilize a higher concentration of the enzymes on the filler surface.

研究分野：保存修復学，歯科材料学

キーワード：バイオフィーム 酵素 フィラー 歯科材料 菌体外多糖

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯科における二大疾患であるう蝕と歯周病は、ともに口腔細菌により引き起こされる感染性疾患であり、歯あるいは修復材料表面への細菌の付着や定着を制御することが、これら疾患の予防、治療に必要不可欠である。また、高齢者や要介護者では、堆積したプラークの誤嚥や誤飲によって呼吸器・消化器系疾患をまねく危険性もあり、歯あるいは修復材料表面におけるプラークの制御に更なる注意が必要である。

このような背景から近年、修復材料表面でのバイオフィーム形成を制御することを目的として、修復材料に抗菌性を付与する試みが行われている。応募者らは、これまでに、抗菌成分である亜鉛イオンの溶出によって口腔細菌の付着や増殖を抑制できる亜鉛含有ガラスを開発し、修復・予防用材料に応用する研究を展開してきた。亜鉛含有ガラスを配合したこれらの材料は、酸性環境で効果的に亜鉛イオンを溶出させることで、材料表面への細菌の付着や増殖を抑制する作用を発揮する。しかし、これらの材料表面に一旦成熟したバイオフィームが形成されると、菌体外多糖を主体とする粘着性の高い細胞外マトリックスにより、亜鉛イオンによる抗菌効果が減弱してしまうことが課題となっている。そこで、応募者は、菌体外多糖を分解するデキストラナーゼやフルクタンナーゼのような酵素に着目し、デキストラナーゼやフルクタンナーゼを担持させたフィラーを作製することで、修復材料への応用が可能なバイオフィーム制御技術を確立できるのではないかと着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず、多孔質フィラーに、各種反応性官能基を用いてデキストラナーゼまたはフルクタンナーゼを共有結合(固定化)させ、フィラーに担持された酵素活性を評価することで、各酵素の担持に適したフィラーおよび反応性官能基の反応条件を検証した。さらに、確定した条件で作製した各酵素担持フィラーをレジン系歯面コート材に配合し、試作レジン表面でのバイオフィーム形成抑制効果を検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 酵素担持フィラーの作製

##### フィラー表面の修飾条件の検討

細孔径(14、21、26 nm)の異なる平均粒径 5.0  $\mu\text{m}$  の3種類のシリカ系多孔質フィラーを使用した。酵素とフィラーを媒介する反応性官能基として、まずフィラー表面に種々の条件下(後述)において3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)を反応させ、さらにグルタルアルデヒドで処理することでフィラー表面にアルデヒド基を結合させた。また、FT-IR(拡散反射法)により、フィラー表面へのAPTES結合能を評価した。

##### フィラー表面への各酵素担持能の検討

上記により作製した表面処理フィラーを、デキストラナーゼまたはフルクタンナーゼ溶液に24時間浸漬することで、各酵素を共有結合させた。次に、作製した各フィラーに担持された酵素量を評価するため、デキストラナーゼまたはフルクタンナーゼ溶液中の担持前後での各酵素濃度をBCA法により測定することで、各酵素の担持量を算出した。さらに、各酵素担持フィラーをデキストランまたはイヌリン溶液に浸漬し、37 $^{\circ}\text{C}$ 下で24時間保管後、溶液中の還元糖を定量することで、担持された各酵素の活性を評価した。

#### (2) 酵素担持フィラーのバイオフィーム形成抑制効果の検証

実験(1)において、細孔径26 nmの多孔質フィラーを用いて作製したデキストラナーゼまたはフルクタンナーゼ担持フィラーを、市販レジン系歯面コート材(G-ガード、ジーシー、東京)にそれぞれ10、20、40 wt%、あるいはデキストラナーゼ担持およびフルクタンナーゼ担持フィラーを共に20 wt%(2種合わせて計40 wt%)の比率で配合したコート材を試作した。

BHI液体培地を用いて、10<sup>6</sup> CFU/mLになるように調整した*Streptococcus mutans* NCTC10449の細菌懸濁液に、各試作コート材を用いて作製した硬化試料(直径9 mm、厚さ1 mm)を浸漬し、嫌気条件下で24時間培養することで、各試料上に*S. mutans*バイオフィームを形成した。コロニーカウント法により、各試料上に形成されたバイオフィーム内の細菌数を測定し、また試料上に形成したバイオフィームにLIVE/DEAD染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡により観察することで、画像解析によりバイオフィームの厚さを定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 酵素担持フィルターの作製

###### フィルター表面の修飾条件の検討

まず、3種類の各シリカフィルターに対してAPTESを用いたシランカップリング処理を行った。その際、温度を室温と75°C、反応時間を1時間、3時間、24時間、反応溶液の調製を0.1 M 酢酸（酸性）蒸留水の種々の条件下でシランカップリング反応を試みた。その結果、75°Cの蒸留水中で3時間反応させた後、100°Cに設定したオーブンにおいて一晩保管することで、FT-IRにおいて3400 cm<sup>-1</sup>付近と3300 cm<sup>-1</sup>付近にAPTES由来のN-H伸縮振動のピーク、ならびに2900 cm<sup>-1</sup>付近にC-H伸縮振動のピークが最も大きく検出され、良好なカップリング反応が行われていることを確認した（図1）。その後、シランカップリング処理を行ったフィルターをグルタルアルデヒドと反応させ、フィルター表面にアルデヒド基を結合させた。

###### フィルター表面への酵素の担持

APTES - グルタルアルデヒド処理を行ったフィルターへのデキストラナーゼ担持能を検討するため、各処理フィルターをデキストラナーゼ溶液に24時間浸漬し、BCA法によりデキストラナーゼ担持量を定量した（図2）。その結果、いずれの細孔径のフィルターにおいても、APTES - グルタルアルデヒド処理を行わなかった群では、デキストラナーゼの担持が確認されなかった一方で、APTES - グルタルアルデヒド処理を行ったシリカフィルターは、いずれの細孔径においても約50 mg/gのデキストラナーゼがシリカフィルターへ担持されていることが確認された。

さらに、デキストラナーゼ担持フィルターの酵素活性を評価するため、デキストラナーゼ担持フィルターをデキストラン中に浸漬し、DNS法により還元糖を定量した（図3）。デキストラナーゼ担持フィルターは、非担持フィルターと比較して還元糖の生成量が多く、多孔質シリカフィルターに対してデキストラナーゼ活性を維持した状態で担持されていることが明らかとなった。

APTES - グルタルアルデヒド処理を行ったフィルターに対し、フルクタンナーゼを用いた担持を行った場合、デキストラナーゼと同様にいずれの細孔径においてもフルクタンナーゼがシリカフィルターへ担持されていることが確認された。さらに、イヌリンを用いたフルクタンナーゼ担持フィルターの酵素活性評価により、非担持フィルターと比較して還元糖の生成量が有意に多く、多孔質シリカフィルターに対してフルクタンナーゼ活性を維持した状態で担持されていたことが確認された。

##### (2) 酵素担持フィルターのバイオフィーム形成抑制効果の検証

いずれの試作コート材においても、各試料上に形成されたバイオフィーム内の細菌数、およびバイオフィームの厚さは、酵素非添加コート材との間に有意差は認められなかった。そこで、各酵素存在下での*S. mutans*のバイオフィーム形成に及ぼす影響を検討したところ、51.4 U/mLの各酵素存在下において、*S. mutans*によるバイオフィーム形成が抑制されることが確認された。したがって、作製した各酵素担持フィルター表面においては、*S. mutans*のバイオフィーム形成を抑制できる可能性はあるものの、レジ系コート材に配合することで、酵素担持フィルターの表面積が大きく減少することから、今回作製した酵素担持フィルターよりも、さらに高濃度の酵素をフィルター表面に担持させる必要があると考えられた。

以上のように、本研究により、シリカ系多孔質フィルターに3-アミノプロピルトリエトキシシランを反応させ、グルタルアルデヒドによりアルデヒド基を修飾することにより、デキストラナーゼまたはフルクタンナーゼの各酵素が活性を維持した状態でフィルター表面に固定化されることが明らかとなった。しかし、各酵素担持フィルターを配合したレジ系コート材表面での抗バイオフィーム効果は認められなかったことから、さらに高濃度の酵素をフィルター表面に固定化する必要があることが示唆された。

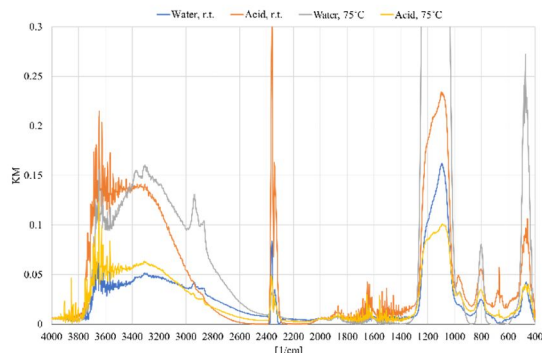


図1. 各種条件のAPTESカップリング処理後のFT-IRスペクトル

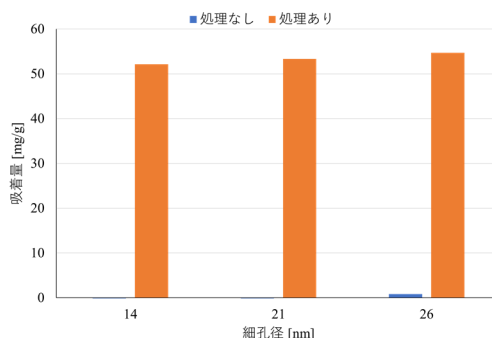


図2. BCA法により測定した単位重量当たりのデキストラナーゼの担持量

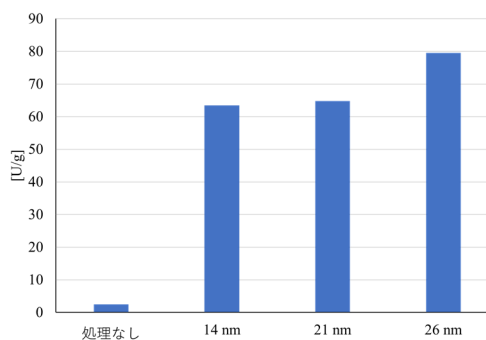


図3. DNS法により定量した各担持フィルターの単位重量あたりの酵素活性

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Deng Fan, Sakai Hirohiko, Kitagawa Haruaki, Kohno Tomoki, Thongthai Pasiree, Liu Yuhan, Kitagawa Ranna, Abe Gabriela L., Sasaki Jun-ichi, Imazato Satoshi	4. 巻 27
2. 論文標題 Fabrication of pH-Responsive Zn <sup>2+</sup> -Releasing Glass Particles for Smart Antibacterial Restoratives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 7202 ~ 7202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27217202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kohno Tomoki, Kitagawa Haruaki, Tsuboi Ririko, Nishimura Yuma, Imazato Satoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Establishment of novel in vitro culture system with the ability to reproduce oral biofilm formation on dental materials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00803-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kohno Tomoki, Kitagawa Haruaki, Tsuboi Ririko, Deng Fan, Sakai Hirohiko, Imazato Satoshi
2. 発表標題 Evaluation of long-term antibacterial effects of resin composite incorporating poly(METAC)
3. 学会等名 2022 IADR/APR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sakai Hirohiko, Deng Fan, Sasaki Jun-ichi, Kitagawa Haruaki, Kohno Tomoki, Abe Gabriela, Xiao Linghao, Imazato Satoshi
2. 発表標題 Characterization of a strontium-releasing phosphate-based bioactive glass for bone regeneration
3. 学会等名 International Dental Materials Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Abe Gabriela, Sakai Hirohiko, Kitagawa Haruaki, Kohno Tomoki, Xiao Linghao, Sasaki Jun-Ichi, Imazato Satoshi
2. 発表標題 Fabrication of a lithium-releasing phosphate-based bioactive glass
3. 学会等名 International Dental Materials Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohno T, Tsuboi R, Kitagawa H, Imazato S
2. 発表標題 Development of antibacterial resin composites containing a QAC-based monomer METAC
3. 学会等名 ADM Virtual meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	北川 晴朗  (Kitagawa Haruaki)  (50736246)	大阪大学・歯学研究科・助教   (14401)	
研究 分担者	壺井 莉理子  (Tsuboi Ririko)  (20827430)	大阪大学・歯学研究科・特任助教(常勤)   (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------