

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861902

研究課題名(和文) 感染制御材料の開発を目指したペリクルタンパク質吸着特性のQCMナノ解析

研究課題名(英文) QCM nano analysis of the adsorption behavior of pellicle protein for the development of infection control material

研究代表者

吉田 英史 (Yoshida, Eiji)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：30410054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：バイオフィーム初期形成は口腔内の歯および修復物表面へのペリクルタンパク質が吸着することから始まると考えられている。本研究では水晶発振子マイクロバランス法(QCM)を用いて、バイオフィーム抑制材料の基礎研究を行った。ペリクルタンパク質であるラクトフェリン、リゾチウム、ディフェンシンおよびムチンが金、シリカおよびチタンへの吸着特性の解析を行った。その結果、それぞれの材料の種類とペリクル成分の種類により、吸着特性が違い、特にSS結合の影響が大きく関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to evaluate the adsorption behaviors of saliva pellicle proteins onto a gold, silica and titanium by using the quartz crystal microbalance method. As pellicle proteins, lactoferrin, lysozyme, defensin and mucin were evaluated. Adsorption amount of lactoferrin to silica was significantly lower than gold and titanium. Significant differences were detected between titanium and silica for the adsorption amounts of lysozyme. Chemical bond formation of sulfur atom of lysozyme and gold could be suggested. There were no significant differences of the adsorption amount of -defensin among each substrate. For mucin adsorption, gold showed the highest adsorption amount. It is presumed that electrostatic repulsion caused less adsorption amounts of mucin to titanium and silica. In conclusion, the differences of the adsorption behaviors of pellicle proteins could be clearly identified.

研究分野：歯科理工学

キーワード：QCM AFM 吸着 バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

(1) バイオフィームとペリクルタンパク質
 バイオフィームとは固相表面に付着した細菌やその産生物からなる複合体のことである。このバイオフィームを形成する上で、固相表面に付く最初の物質は細菌ではなく、微量の有機物である。これらの有機物は過剰の表面荷電と表面自由エネルギーを中和する“コンディショニング層”といわれている。吸着された有機分子は細菌の栄養源として働くことが多い。口腔内において、このコンディショニング層はペリクルと呼ばれており、唾液タンパク質が主成分である。(Mittelman, Microcontamination 3, 51-55, 1985) また、ペリクルタンパク質は唾液中の有機成分であるムチン、酸性高プロタンパク質、塩基性タンパク質、糖タンパク質、免疫グロブリン A、脂肪、リゾチーム、プロテアーゼで構成されている。

(2) 水晶振動子マイクロバランス(QCM)

水晶振動子とは、水晶の結晶を極薄い板状に切り出した切片の両側に金属薄膜を取り付けた構造をし、それぞれの金属薄膜に交流電場を印加するとある一定の周波数で振動する性質である。金属薄膜上にナノグラム程度の物質が吸着すると物質の質量に比例して共振周波数が減少するため微量天秤として利用することが可能である。その質量変化をリアルタイムで計測し、吸着量および吸着速度などの吸着特性を定量出来る機器である。

2. 研究の目的

本研究では唾液成分中に含まれる抗菌タンパク質と口腔内で用いられる生体材料との吸着メカニズムを解明することにより、口腔内の細菌に起因する感染症抑制のための材料開発を行う。本計画では、口腔内で用いられる生体材料とペリクルタンパク質の吸着について QCM を用いて、以下の 3 点を明らかにすることを目的とする。

(1) ペリクル成分(ラクトフェリン、リゾチーム、ディフェンシン、ムチン)と金、シリカおよびチタンとの吸着挙動。

(2) ラクトフェリンのチタン、ジルコニア、ステンレススチールおよび PMMA の飽和法を用いた吸着解析。

(3) 原子間力顕微鏡 (AFM) によるペリクルタンパク質の吸着形態解析

3. 研究の方法

(1) 吸着挙動の測定には周波数 27MHz の高感度 QCM 装置 (AFFINIX QN μ , イニシウム, Japan) を用い、センサーは金、シリカ、チタンの 3 種類とした。吸着材料はラクトフェリン、ディフェンシン、ムチンおよびリゾチームとした。温度 25 のセル内に 0.5ml

の PBS (pH:7.3) を注入し、その後、PBS にて濃度調整を行った各タンパク質溶液を 5 μ l 滴下した (n=3)。いずれの材料もセル内にて 1mM になるように調整した。QCM センサーの振動数変化を測定し、さらに振動数の減少値から Sauerbrey の式を用いて 30 分後の吸着量を算出した。

(2) 飽和法による吸着解析には周波数 27MHz の高感度 QCM 装置 (AFFINIX QN μ , イニシウム, Japan) を用い、センサーはチタン、ステンレススチール、ジルコニアおよび PMMA の 4 種類とした。吸着材料は牛乳由来のラクトフェリン(WAKO)を用いた。本研究では飽和法を用い吸着挙動の解析を行った。温度 25 のセル内に 0.5ml の PBS (pH:7.3) を注入後、PBS にて濃度調整を行った 0.1mg/ml のラクトフェリン溶液を 5 μ l、30 分おきに 4 回滴下し、5 回目に 0.5mg/ml のラクトフェリン溶液を滴下した (n=3)。QCM センサーの振動数変化を測定し、AQUA (イニシウム, Japan) を用いて Langmuir 式への Non-Linear フィッティングにより最大飽和量(Bmax)、解離定数(Kd) および 1 回目の滴下時における速度定数(Kobs)値の算出を行った。

(3) 形態学的なアプローチとして原子間力顕微鏡 (AFM: Nanosurf Easyscan 2, Nanosurf, AG, Smithland) を用い、QCM 測定後、各センサー表面の観察を行った。

4. 研究成果

(1) 図 1 (a:ラクトフェリン、b:リゾチーム、c: ディフェンシン、d:ムチン) に各ペリクルタンパク質の吸着挙動を示す。ムチン以外の吸着挙動は飽和量に達するまで直線的

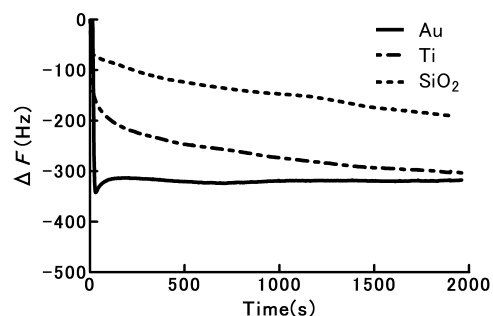


図1-a ラクトフェリンの吸着挙動

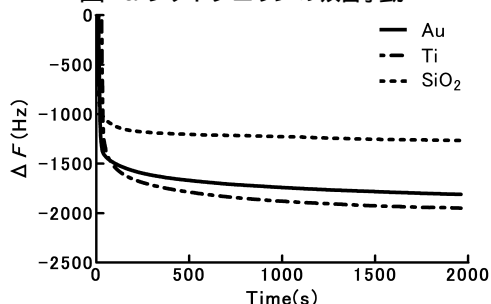


図1-b リゾチームの吸着挙動

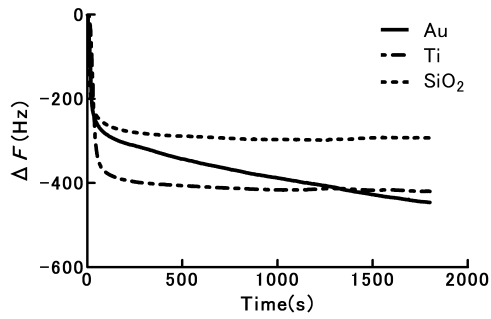


図1c ディフェンシンの吸着挙動

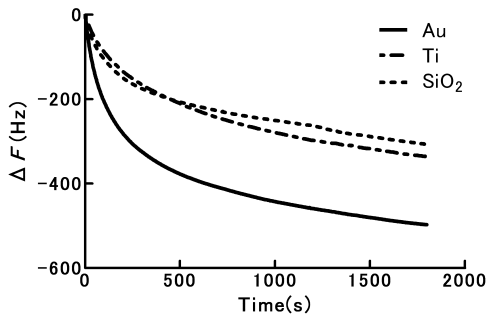


図1d ムチンの吸着挙動

に速い傾向にあった。
ムチンは他のペリクルと比較すると緩やかな減衰であった。

図2に各センサーに対する吸着量を示す。
ラクトフェリンにおいてはチタンが最も多く、リゾチウムでは金の吸着量が多い傾向を示した。

特に図1の吸着挙動から見てもわかるように金とリゾチウムの急激な吸着挙動は顕著に確認されるが、SS結合が起因して一気に吸着

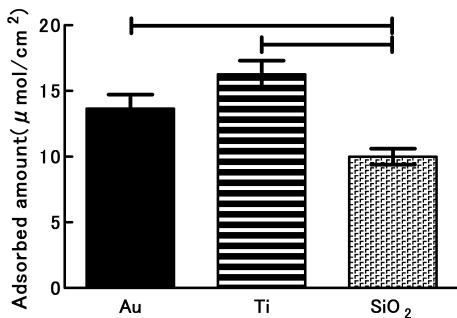


図2-a ラクトフェリンの吸着量

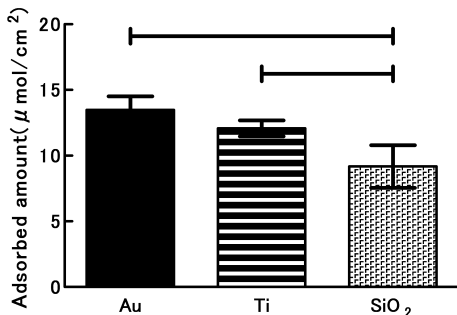


図2-b リゾチウムの吸着量

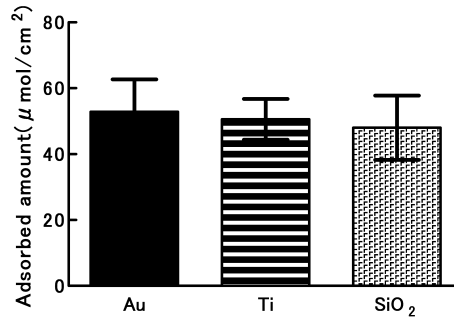


図2-c ディフェンシンの吸着量

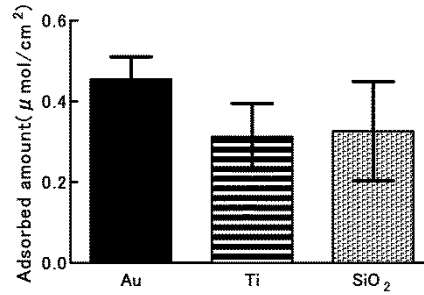


図2-d ムチン吸着量

が起きたと考えられる。
タンパク質別で比較するとディフェンシ
ンが最も多く吸着する材料であることが明らかとなった。この理由についてはさらなる分析が必要だと考えられる。

また、本実験手法では分子量の小さいリゾチウムおよびディフェンシンは検出限界付近での周波数であったため、計測手法の変更が必要だと考えられた。

(2)(1)において詳細な解析方法の必要性が感じられたため、飽和法を用いて吸着解析を行った。図3に各センサーに対するラクトフェリンの吸着挙動を示す。センサー間に特に

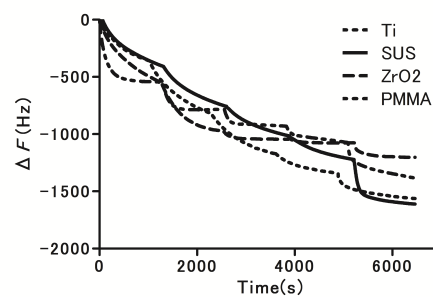


図3 飽和法によるラクトフェリンの吸着挙動

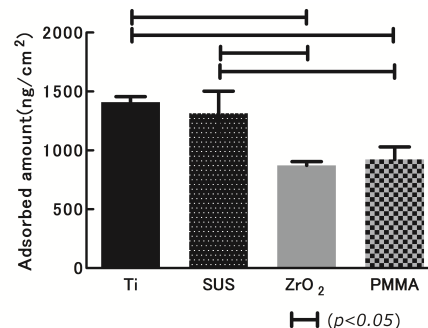


図4 飽和法によるラクトフェリンの吸着量

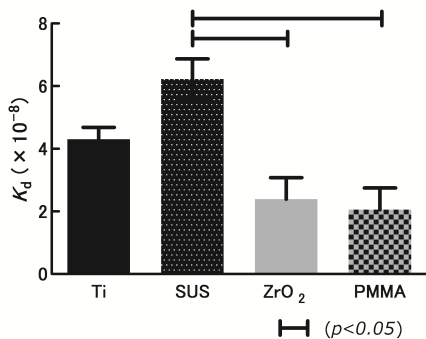


図5 飽和法によるラクトフェリンの解離定数

大きな違いは見られなかった。図4に各センサーに対する飽和吸着量を示す。チタンおよびステンレススチールはジルコニアおよびPMMAより多かった。図5に解離定数であるKd値を示す。Kd値も同様にジルコニアおよびPMMAが小さく、ステンレススチールが最も大きかった。

(3)図5にAFMによるラクトフェリンの吸着前後の観察結果の一例を示す。QCMセンサーは水晶表面に蒸着で薄膜形成しているため、球形である。それに対して、ラクトフェリンも球形であるため非常に見分けづらいことがわかった。基板等を再考して再実験に望みたい。

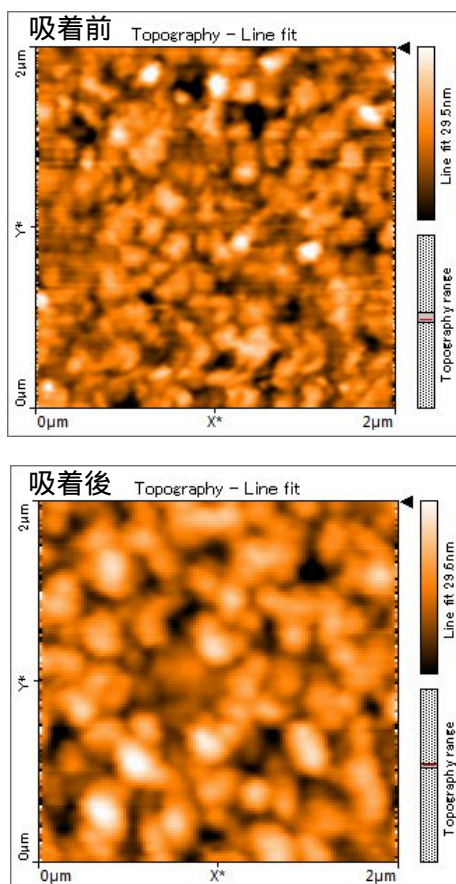


図5 AFM観察の一例

[総括]

本研究結果により、口腔内に用いられている歯科生体材料は材料の種類により、ペリクルタンパク質の吸着量や速度などの相違が確認出来た。今後は細菌由来タンパク質を用い、その吸着メカニズムの違いを明らかにして行く予定である。口腔内におけるペリクルタンパク質をコントロールすることは、バイオフィルム抑制へとつながると考えられる。

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3件)

吉田 英史、早川 徹、分子プレカーサー法にて作製したアパタイト薄膜の原子間力顕微鏡観察、日本歯科産業学会誌、査読有、28、2014、9-16

E. Yoshida, S. Imai, N. Hanada and T. Hayakawa. Biofilm Bormation on Titanium and Hydroxyapatite Surface using Artificial Mouth System. Journal of Hard Tissue Biology. 査読有、22、2013、419-424

DOI: 10.2485/jhtb.22.419

E. Yoshida, T. Hayakawa. Adsorption study of pellicle proteins to gold, silica and titanium by quartz crystal microbalance method. Dent Mater J. 査読有、30;32、2013、883-887

DOI: doi.org/10.4012/dmj.2013-136

(学会発表)(計2件)

吉田 英史、早川 徹、ラクトフェリンの吸着特性、第36回バイオマテリアル学会学術講演会、タワーホール船堀(東京都江戸川区)、2014年11月17-18日

吉田 英史、早川 徹、QCM法によるラクトフェリンの吸着特性解析、第64回日本歯科理工学会学術講演会、広島アステールプラザ(広島県広島市)、2014年10月4-5日

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 英史(YOSHIDA Eiji)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号: 30410054

(2)研究分担者

なし