

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20490

研究課題名(和文) バイオフィーム形成と歯科生体材料に対する抗菌性タンパク質のナノレベル吸着解析

研究課題名(英文) Adsorption nano-analysis of antibacterial protein for the dental materials and the biofilm formation.

研究代表者

吉田 英史 (Yoshida, Eiji)

鶴見大学・歯学部・学内講師

研究者番号：30410054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では歯科用インプラント材料に対する骨再建および抗菌性付与を目的とした基礎的研究を行った。細胞接着タンパク質の吸着試験では、チタンの方がジルコニアより高い吸着量を示した。疑似体液によるハイドロキシアパタイト析出試験では、チタンがジルコニアより早い時間で析出が測定された。これらの結果より、インプラント材料の種類によりナノレベルで骨再建に影響を及ぼすことが確認された。チタンに対する細菌付着性は唾液タンパク質の影響が大きいことが明らかとなった。今後、タンパク質の選択的吸着を可能にする材料を検討中である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is the bone rebuilding and an antibacterial grant for dental implant materials. In the adsorption examination of the cell adhesion protein, titanium showed the adsorption quantity that was higher than zirconia. In the hydroxyapatite precipitation examination with the simulated body fluid, precipitation of hydroxyapatite was measured in the time when titanium was earlier than zirconia. It was confirmed to have an influence on the bone rebuilding at a nano-level by the kind of implant materials as a result of these more. It was revealed that the bacteria adhesion for titanium had great effect on the saliva protein. I am examining implant materials enabling selective adsorption of the protein in future.

研究分野：歯科理工学

キーワード：インプラント タンパク質吸着 原子間力顕微鏡 走査型電子顕微鏡 バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

(1) ペリクル

エナメル質表面にはペリクルやプラークなどの有機物質から成る吸着層が形成されている。これらは歯の直接的な外部環境であり、様々な疾患を引き起こす細菌感染に繋がる重要な領域である。その生成メカニズムの研究は物質代謝の研究とともに口腔生物学における興味がある課題である。歯面に形成される最初の有機層は厚さ 1 μ m 程のペリクルである。その成分はムチン、リゾチーム、ラクトフェリン、IgA およびディフェンシンなどの(糖)タンパク質で構成されている。そのアミノ酸組成は顎、舌下唾液腺あるいは全唾液腺の酸沈殿物のアミノ酸組成と非常に類似しており、唾液タンパク質成分の選択的吸着が起きているものと考えられる。細菌付着によって形成されるバイオフィームはこのペリクルを構成する各(糖)タンパク質に対して特異的に起こることが解析されている。

(2) インプラント

インプラント治療により、患者の QOL 改善が行われている一方、インプラント周囲炎もクローズアップされてきた。天然歯は歯肉上皮が付着上皮を介してエナメル質と結合し組織が連続性をなしており、歯根膜を有する。これに対して、インプラント周囲組織は付着上皮および歯根膜を持っていないため、細菌感染に対して抵抗力が低く、病変の進行は早いことが知られている。現在、主流のインプラント材料であるチタン (Ti) はオステオインテグレーションの獲得は可能だが、インプラント周囲炎による骨吸収には対応できていない。今後、インプラント材料に求められる性質としてインプラント周囲骨の再建や上皮付着および抗菌作用だと考えられる。

(3) 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ナノレベルで定量出来る機器である。

2. 研究の目的

本研究では骨再建、上皮付着および抗菌特性を有するインプラント材料開発の基礎的研究として、以下の 3 項目を目的とした。

(1) 細胞接着タンパク質の吸着解析

インプラント材料のオステオインテグレーション獲得の第一歩はタンパク質の吸着が必要である。そこで、本研究では細胞接着タンパク質でオステオインテグレーションに大きく関与しているフィブロネクチン (Fn) の吸着解析を行った。

(2) ハイドロキシアパタイトの析出特性

インプラント材料に対するオステオインテグレーションの指標となる実験方法の一つとして疑似体液 (SBF) 浸漬実験がある。本研究では SBF を用い、ナノレベルでの析出特性を解析した。

(3) ペリクルタンパク質および細菌表層タンパク質の吸着解析

口腔内におけるエナメル質表面には吸着層が形成されおり、露出したインプラント表面部分にも吸着層が形成されると考えている。本研究ではペリクルタンパク質であるムチン (MUC) と細菌表層タンパク質であるリポタイコ酸 (LTA) の吸着特性を解析した。さらに Ti 表面に吸着した MUC 表面に LTA がどのように吸着するのか検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞接着タンパク質の吸着解析

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) を用いた。QCM センサーとして Ti およびジルコニア (ZrO₂) を用い、Fn およびアルブミン (Alb) の吸着量および見かけ上の吸着速度の測定を行った。測定温度は 25 $^{\circ}$ C とし、測定時間は 30 分間とした。QCM 測定後、AFM (Nanosurf Easyscan 2, Nanosurf, AG, Smithland) を用い、各センサー表面のタンパク質吸着形態観察を行った。

(2) ハイドロキシアパタイトの析出特性

QCM 装置にて、Ti および ZrO₂ センサーのハイドロキシアパタイト析出特性を解析した。SBF としてハンクス溶液に浸漬させ 24 時間の析出量と析出開始時間のモニタリングを行った。QCM 測定後、X 線光電子分光 (XPS) によるハイドロキシアパタイトの分析を行った。さらに走査型電子顕微鏡 (SEM) にて析出状態の微細観察を行った。

(3) ペリクルタンパク質および細菌表層タンパク質の吸着解析

QCM装置にてTiセンサーを用い、LTAの吸着量を計測した。LTAの濃度は0.1、0.3、0.5、1.0および2.0 mg/mlの5種類とした。ペリクルタンパク質がTi表面に形成されている状態を想定するために、TiにMUC(0.5 mg/ml)の吸着をさせた後、5種類のLTAの濃度にて吸着特性を分析した。QCM測定後、AFMにて各タンパク質の吸着形態観察を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞接着タンパク質の吸着解析

TiとZrO₂に対するFnおよびAlbの吸着量を図1に示す。各センサーに対するFnおよびAlbの吸着量はTiの方がZrO₂より有意に大きかった。

図2に見かけ上の吸着速度を示す。見かけ上の吸着速度はAlbにおいてTiの方が速い傾向が見られたが、Fnでは有意差は見られなかった。

図3にAFM観察結果を示す。Tiに対するタンパク質の吸着形態は球状であったが、ZrO₂

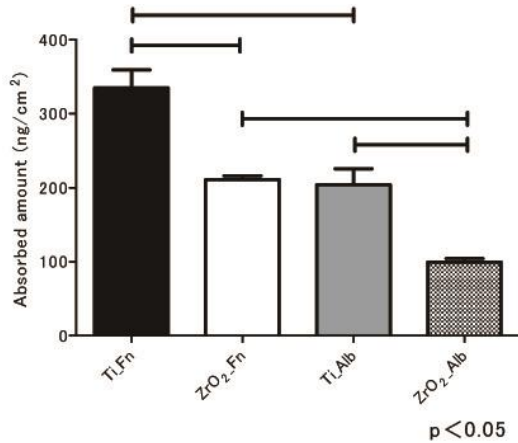


図1 各センサーに対するFnおよびAlbの吸着量

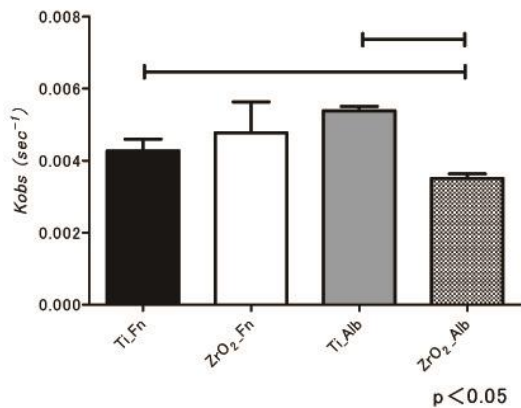


図2 各センサーに対する見かけ上の吸着速度

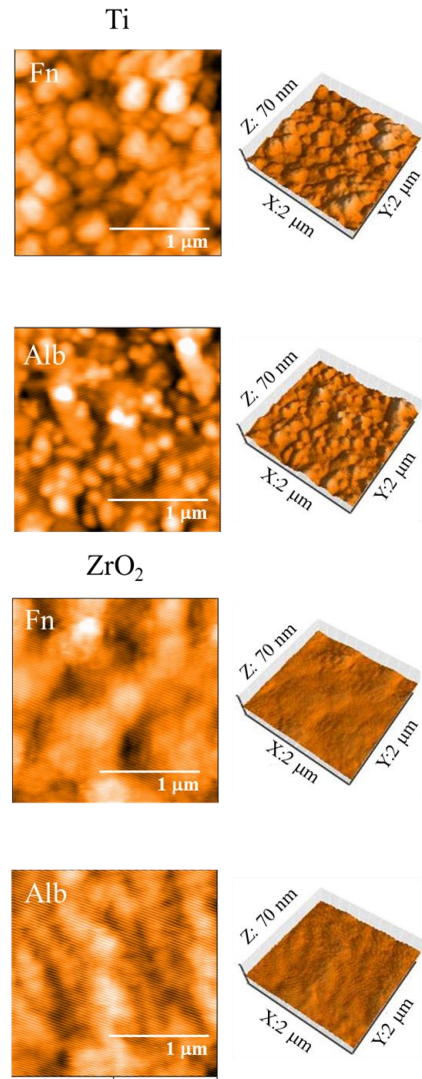


図3 TiおよびZrO₂に対するFnとAlbの吸着形態

は起伏が少ない平坦な形態であることがわかった。

以上の結果より、細胞接着タンパク質であるFnの吸着量はZrO₂より多く330 ng/cm²であることがわかった。本実験環境下ではTiの方がZrO₂より親水性であったため吸着量が多かったのだと考えられた。また、細胞接着タンパク質の吸着は材料およびタンパク質の種類で異なることが明らかとなった。

(2) ハイドロキシアパタイトの析出特性

図4にTiおよびZrO₂に対するハイドロキシアパタイト析出挙動を示す。TiおよびZrO₂のアパタイト析出挙動の傾向はほぼ同じであったが、Tiの方がZrO₂と比較して析出開始時間が早かった(矢印)。これはTiの方がCaイオンの吸着が速かったためだと考えられる。

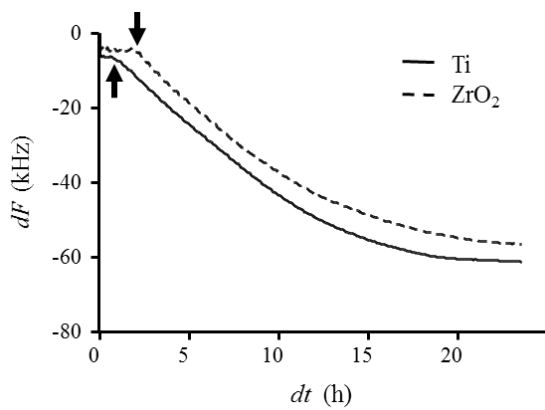


図 4 各センサーのハイドロキシアパタイトの析出挙動

表 1 にハイドロキシアパタイトの析出量および見かけ上の吸着速度を示す。析出量 30~35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で、Ti および ZrO₂ に有意差は見られなかった。同様に、見かけ上の吸着速度にも差は見られなかった。

表 1 ハイドロキシアパタイトの析出量および見かけ上の吸着速度

	Ti	ZrO ₂
Δm ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	30.1 \pm 4.7	33.2 \pm 2.3
K_{obs} (sec^{-1})	2.8 $\times 10^{-5} \pm$ 0.4 $\times 10^{-5}$	3.2 $\times 10^{-5} \pm$ 0.1 $\times 10^{-5}$

図 5 に QCM 測定後の SEM 観察結果を示す。ハイドロキシアパタイト結晶はセンサー表面に疎らに析出していた。また、直径 0.2~0.8 μm であった。図 6 に XPS による析出したハイドロキシアパタイトの解析結果を示す。Ti および ZrO₂ にそれぞれ Ca2p および P2p のピークが確認された。また Ca/P 比は約 1.46 であった

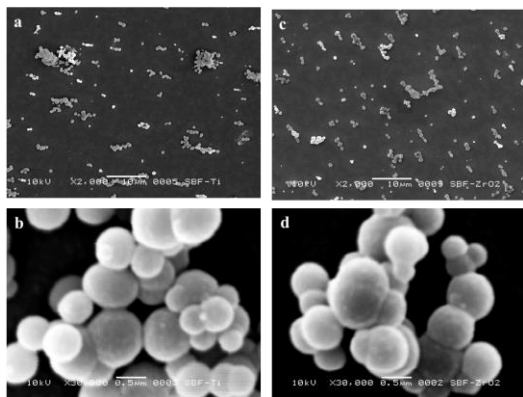


図 5 SEM 観察結果
(a, b: Ti c, d: ZrO₂)

図 6 に XPS による析出したハイドロキシアパタイトの解析結果を示す。Ti および ZrO₂

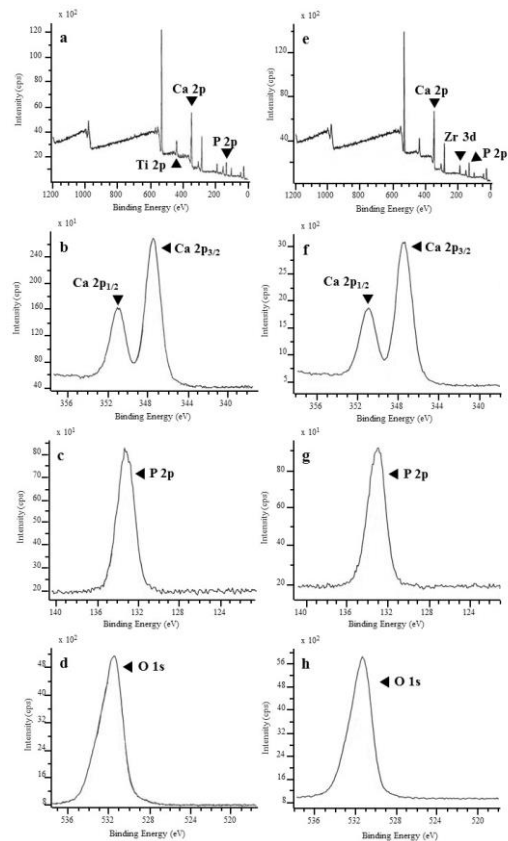


図 6 XPS 解析結果
(a~d: Ti e~h: ZrO₂)

にそれぞれ Ca2p および P2p のピークが確認された。また Ca/P 比は約 1.46 であった。

以上の結果より、Ti の方が ZrO₂ と比較して析出時間が早いことが明らかとなった。ハイドロキシアパタイトの析出には Ca イオンの吸着が大きく関わっている。各材料のゼータ電位は共に負に帯電しているが、Ti の方が ZrO₂ より小さいため、Ca イオンを吸着しやすかったと考えられる。

(3) ペリクルタンパク質および細菌表層タンパク質の吸着解析

図 7 に Ti に対する LTA (0.5mg/ml) の QCM 吸着挙動の一例を示す。MUC 吸着後の LTA の減衰周波数の方が大きかった。

図 8 に LTA の吸着量と濃度の関係を示す。Ti に対する LTA 吸着量は濃度の影響は確認されなかったが、MUC が吸着した Ti に対する吸着量は LTA 濃度が高くなるにつれて大きくなる傾向が見られた。

図 9 に AFM 観察結果を示す。Ti に対する LTA の吸着形態 (図 8-b) は 200 nm ほどの球形で疎らに観察された。MUC は凝集した様相であった (図 8-c)。MUC 吸着後の LTA の吸着形態は部分的に凝集している様子が観察された (図 8-d)。

以上により、LTA は MUC が吸着した Ti 上には、より吸着しやすくなり、濃度が高くなるとともに、吸着量は大きくなった。現在はこの現象の原因を検索中である。

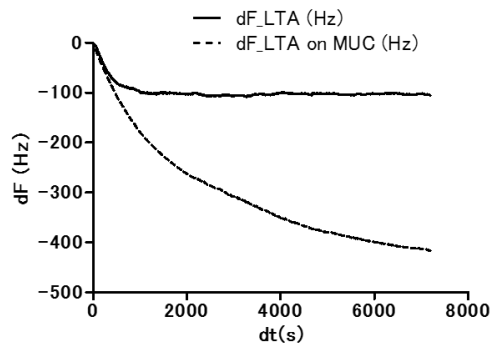


図 7 Ti に対する LTA 吸着挙動

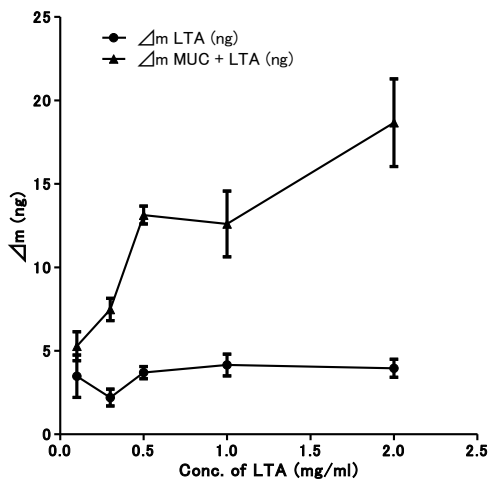


図 8 LTA 吸着量と濃度の関係

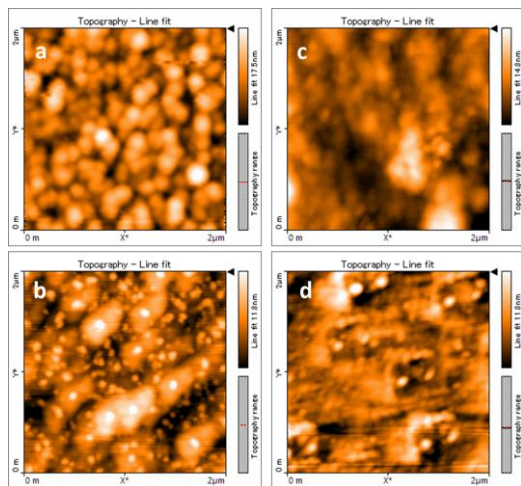


図 9 Ti に対する LTA の AFM 観察結果

(a: Ti, b: LTA on Ti, c: MUC on Ti, d: LTA on MUC)

(4) 総括

本研究では歯科用インプラント材料の Ti に対する骨再建および抗菌作用の基礎的研究を行った。細胞接着タンパク質に対する吸着およびハイドロキシアパタイト析出特性

は、Ti の表面性状が大きく関わっていることが明らかになった。さらにペリクルタンパク質である MUC は酸からの歯面保護を担う一方、細菌の吸着を促進している可能性が示唆された。

今後は細胞接着タンパク質の吸着はより大きく、細菌吸着は阻害する表面改質を目指す予定である。

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)

① Yoshida E, Hayakawa T. Quantitative Analysis of Apatite Formation on Titanium and Zirconia in a Simulated Body Fluid Solution Using the Quartz Crystal Microbalance Method. *Advances in Materials Science and Engineering*. 査読有, 2017;2017:7928379.

DOI:10.1155/2017/7928379

② Kusakawa Y, Yoshida E, Hayakawa T. Protein Adsorption to Titanium and Zirconia Using a Quartz Crystal Microbalance Method. *Biomed Res Int*. 査読有, 2017;2017:1521593.

DOI: 10.1155/2017/1521593.

③ Yoshida E, Hayakawa T. Adsorption Analysis of Lactoferrin to Titanium, Stainless Steel, Zirconia, and Polymethyl Methacrylate Using the Quartz Crystal Microbalance Method. *Biomed Res Int*. 査読有, 2016;2016:3961286.

DOI: 10.1155/2016/3961286.

[学会発表] (計 3 件)

① 草川 洋、吉田 英史、早川 徹、QCM 法によるチタンおよびジルコニアへのタンパク質吸着解析、第 83 回例会鶴見大学歯学会、鶴見大学会館 (神奈川県横浜市)、2016 年 12 月 7 日

② Yoshida E, Hayakawa T. Monitoring of protein adsorption and apatite precipitation on titanium and zirconia by QCM method. *International Dental Materials Congress 2016*, The stone Hotel-Legian Bali (Legian, Bali, Indonesia), 2016 年 11 月 4-6 日

③ 吉田 英史、草川 洋、早川 徹、チタンおよびジルコニアの生体適合性に関

する QCM 解析、第 67 回日本歯科理工学会学術講演会、九州大学医学部百年記念講堂(福岡県福岡市)、2016 年 4 月 16-17 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・学内講師
研究者番号：30410054