

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19593

研究課題名（和文）材料学・分子生物学的アプローチの融合によるバイオターゲティング歯科材料開発の試み

研究課題名（英文）Attempt to develop bio-targeting dental materials through the integration of materials science and molecular biology approaches

研究代表者

今里 聡（Imazato, Satoshi）

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：80243244

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、バイオフィルム内の細胞外マトリックスに存在する細胞外DNA（eDNA）をターゲットとして、歯科材料にバイオフィルム制御能を付与する試みを行った。具体的には、薬剤徐放用キャリアであるpolyHEMA/TMPT粒子に、eDNA分解酵素（DNase）を担持させることで、DNaseの長期徐放技術の確立に成功した。さらに、DNase担持polyHEMA/TMPT粒子を歯科用レジンに配合することにより、DNaseの徐放がeDNAを分解することで、歯科用レジン表面の口腔バイオフィルム形成を効果的に抑制できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔バイオフィルムの制御を目的として歯科材料への抗菌性付与に関する研究が国内外で盛んに行われている。これらの研究では、材料に含まれる抗菌成分が口腔細菌を攻撃し、材料表面への細菌の初期付着を抑制することを目指している。しかし、一旦細菌が材料に付着して細胞外マトリックスを形成すると、バイオフィルム内での抗菌成分の浸透や細菌との接触が妨げられ、抗菌効果が減弱することが課題である。本研究により、DNA分解酵素担持粒子を添加した歯科材料上でのバイオフィルム形成抑制効果を確認できたことで、細胞外マトリックスの制御により抗バイオフィルム効果を発揮する新たな歯科材料の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Aiming to endow dental materials with biofilm control capabilities by targeting extracellular DNA (eDNA) in the extracellular matrix of oral biofilms, we successfully established a technology to achieve sustained release of DNA-degrading enzyme (DNase) by loading the DNase onto polyHEMA/TMPT particles. By incorporating these DNase-loaded particles into dental resins, it was demonstrated that the sustained release of DNase promoted the degradation of eDNA, effectively inhibiting the formation of oral biofilms on the surface of the dental resins.

研究分野：口腔再生医学および歯科医用工学関連

キーワード：歯学 歯科材料学 バイオフィルム 細胞外DNA バイオターゲティング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔バイオフィルムの制御を目的として歯科材料への抗菌性付与に関する研究が国内外で盛んに行われるようになってきた。それらの研究は、材料表面での固定化された抗菌成分との接触、あるいは材料からの抗菌成分の溶出により、抗菌成分が口腔細菌を攻撃することで、主に材料表面への細菌の初期付着を抑制することを狙ったものである。しかし、これらの手法は、材料表面への細菌の付着を一定期間制御できるものの、一旦細菌が材料に付着して細胞外マトリックスを形成すると、バイオフィルム内での抗菌成分の浸透や細菌との接触が妨げられ、抗菌効果が減弱することが課題となっている。そこで、研究代表者は、これまで遂行してきた材料学的アプローチに分子生物学のエLEMENTを加え、バイオフィルム内の細胞外マトリックスに存在する細胞外 DNA (eDNA) をターゲットとして、歯科材料へのバイオフィルム制御能の付与を試みた。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが開発した非生体分解性の薬剤徐放用キャリアである polyHEMA/TMPT 粒子に、バイオフィルムの構造安定化に重要な役割を担う eDNA を分解する酵素 (DNase) を担持させ、DNase の徐放によるバイオフィルム形成抑制能を検討した。さらに、DNase 担持粒子をポリメチルメタクリレート (PMMA) レジンに添加し、試作レジンのバイオフィルム形成抑制効果を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) DNase 担持 polyHEMA/TMPT 粒子の作製

親水性モノマーである 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) と三官能性架橋性モノマーである Trimethylolpropane trimethacrylate (TMPT) を重量比で 90 : 10 の割合で混和し、過酸化ベンゾイル (BPO) を 0.5% 濃度で加えて 120 °C で 2 時間加熱重合した。得られた硬化体を粉碎し、平均粒径が約 380 μm のポリマー (polyHEMA/TMPT) 粒子を得た。作製した polyHEMA/TMPT 粒子を滅菌蒸留水に浸漬し、24 時間攪拌した後、蒸留水を新しいものに交換して再度 24 時間攪拌・洗浄した。これを 9 日間繰り返すことで、粒子に残留した未重合モノマーを除去した。

つづいて、滅菌蒸留水を用いて DNase を溶解し、0.8、8、あるいは 40 μM の DNase 溶液を調製した。各濃度に調製した DNase 溶液 (30 μL) に polyHEMA/TMPT 粒子 30 mg を浸漬し、室温下で 30 分間保管後、凍結乾燥処理を施して DNase 担持粒子を得た。

#### (2) DNase 担持粒子からの DNase 溶出特性の評価

得られた各 DNase 担持ポリマー粒子を、50 mM の HEPES 緩衝液 (pH 8.0) に 1、3、7、14、および 28 日間浸漬し、溶出媒を交換しながら粒子からの DNase 溶出濃度を Micro BCA Protein assay Kit を使用して定量した。

#### (3) DNase 溶出液の DNA 分解作用の解析

40 μM の DNase 溶液に浸漬することで作製した DNase 担持ポリマー粒子を、50 mM の HEPES 緩衝液 (pH 8.0) に 1、3、7、14、および 28 日間浸漬し、DNase 溶出液を採取した。得られた各 DNase 溶出液を仔ウシ胸腺由来二本鎖 DNA (CT-DNA) に 60 分間作用させ、アガロースゲル電気泳動により DNA 分解能を検討した。さらに、各溶出液を作用させた CT-DNA に 4 (vol)% の過塩素酸を添加し、過塩素酸により溶解される低分子量の DNA 濃度を微量分光光度計により測定することで、分解された低分子量 DNA の定量評価を行った。コントロールとして、0.3 μM の DNase 標準溶液を作用させた CT-DNA 溶液を使用した。

#### (4) DNase 担持粒子のバイオフィルム形成抑制効果の検討

40 μM の DNase 溶液に浸漬することで作製した DNase 担持ポリマー粒子を Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地に 28 日間浸漬し、DNase 溶出液を採取した。DNase 非担持ポリマー粒子を 28 日間浸漬し、得られた溶出液をコントロールとして使用した。

ポリメチルメタクリレート (PMMA、ユニファースト、GC) の硬化レジンにヒト唾液に 2 時間浸漬し、*Streptococcus mutans* NCTC10449 の菌液に浸漬して 6 時間培養後、PMMA レジン上に *S. mutans* を付着させた。DNase 溶出液存在下で PMMA レジンを 18 時間培養後、BHI 培地を交換して更に 24 時間培養し、PMMA レジン上に形成されたバイオフィルム内の細菌数とタンパク、ならびに糖の量をそれぞれコロニーカウント法、BCA 比色法、フェノール硫酸法により測定した。また、培養後のバイオフィルムに LIVE/DEAD 染色および RhodamineB 染色を施して共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察を行い、画像解析によりバイオフィルムの厚みや生菌率を計測した。さらに、PMMA レジン上に形成されたバイオフィルムを走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。

#### (5) DNase 担持粒子添加レジンのバイオフィルム形成抑制効果の検討

##### DNase 担持粒子添加レジンの作製

40 μM の DNase 溶液に浸漬して作製した DNase 担持粒子を市販 PMMA レジンの粉材に 10 (wt)%

添加し、粉液比 2.0/1.0 (g/mL) で液材と混和した後、直径 5 mm、厚さ 1 mm の DNase 担持粒子添加レジンの硬化試料を作製した。

#### DNase 溶出特性の評価

実験(2)と同様に、作製した DNase 担持粒子添加レジン を 50 mM の HEPES 緩衝液に 1、3、7、14、および 28 日間浸漬し、粒子からの DNase 溶出濃度を測定した。

#### バイオフィーム形成抑制効果の検討

作製直後、または 50 mM の HEPES 緩衝液に 28 日間浸漬後の DNase 担持粒子添加レジンに唾液処理を施した後、*S. mutans* の菌液に浸漬し、BHI 培地を交換しながら 48 時間培養後、形成されたバイオフィームに LIVE/DEAD 染色および Rhodamine B 染色を施して CLSM 観察を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) DNase 溶出特性の評価

0.8、8  $\mu$ M の濃度の DNase 溶液を使用して担持させた場合、粒子からの DNase の溶出が 3 および 7 日間しか持続しなかった (図 1)。一方、40  $\mu$ M の濃度の DNase 溶液を使用した場合には、1 日浸漬後の DNase 溶出濃度は  $3.4 \pm 0.1 \mu$ M で、28 日間経過後も  $0.38 \pm 0.05 \mu$ M の DNase の溶出が認められ、DNase の溶出が持続することを確認した。

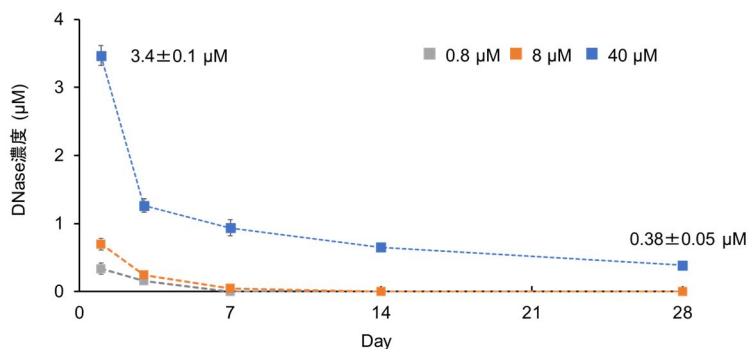


図 1 DNase 担持粒子からの DNase 溶出特性

#### (2) DNase 溶出液の DNA 分解作用の解析

アガロースゲル電気泳動により、DNase 溶出液の DNA 分解能を検討したところ、1 日および 28 日間浸漬後の DNase 溶出液の存在下において、0.3  $\mu$ M の DNase 標準溶液 (コントロール) と同等の CT-DNA 分解作用が認められた (図 2A: 矢印)。また、微量分光光度計を用いて分解された DNase の定量を行ったところ、1~28 日間浸漬後のいずれの DNase 溶出液存在下においても、コントロールとの間で差が認められなかった (図 2B)。

#### (3) DNase 担持粒子のバイオフィーム形成抑制効果の検討

PMMA レジン上に形成されたバイオフィームを CLSM (図 3、4) および SEM (図 5) にて観察した結果、DNase を担持する粒子から溶出した DNase を含む溶液の存在下であっても、非担持粒子から得られた溶出液 (コントロール) を使用した場合と同様に、生菌主体のバイオフィームが形成されることが確認された。ただし、バイオフィーム内の細菌および細胞外マトリックスの密度は共に低く、その厚さも顕著に減少することが観察された。

さらに、バイオフィームに含まれる細菌数、タンパク、糖の定量を行ったところ、DNase 溶出液の作用により、これらの成分がコントロールと比較して、有意に減少することが分かった (図 6)。しかし、生菌の比率については、DNase 溶出液が存在してもコントロールとの間に有意な差は認められなかった。

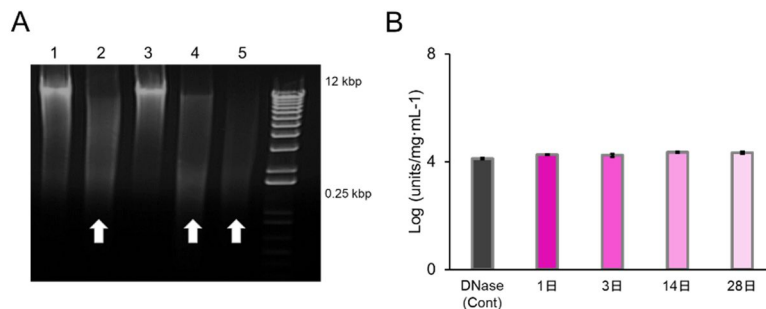


図 2 DNase 溶出液の DNA 分解作用

(A) アガロースゲル電気泳動による DNA 分解能の検討

1. CT-DNA のみ (Cont)
2. 0.3  $\mu$ M の DNase 標準溶液を作用させた CT-DNA (Cont)
3. DNase 非担持粒子を 1 日浸漬後、得られた溶出液を作用させた CT-DNA
4. DNase 担持粒子を 1 日浸漬後、得られた溶出液を作用させた CT-DNA
5. DNase 担持粒子を 28 日間浸漬後、得られた溶出液を作用させた CT-DNA

(B) 分解 DNA の定量

DNase 担持粒子を 1、3、14、および 28 日間浸漬後、0.3  $\mu$ M の DNase 標準溶液 (Cont) あるいは各 DNase 溶出液を CT-DNA に作用させ、DNase により分解された低分子の DNA 濃度。

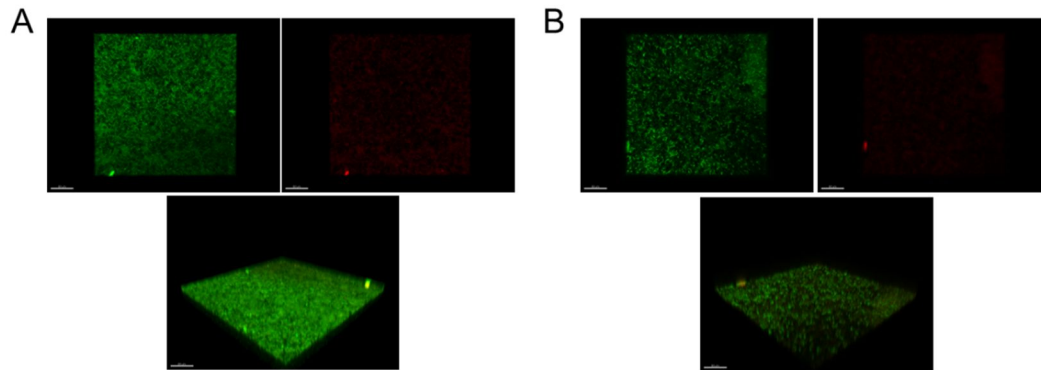


図 3 DNase 担持粒子のバイオフィーム形成抑制効果の検討 (CLSM 像、Live/Dead 染色)

- (A) DNase 非担持粒子からの溶出液存在下で形成されたバイオフィーム  
 (B) DNase 担持粒子から溶出した DNase 含有溶液存在下で形成されたバイオフィーム

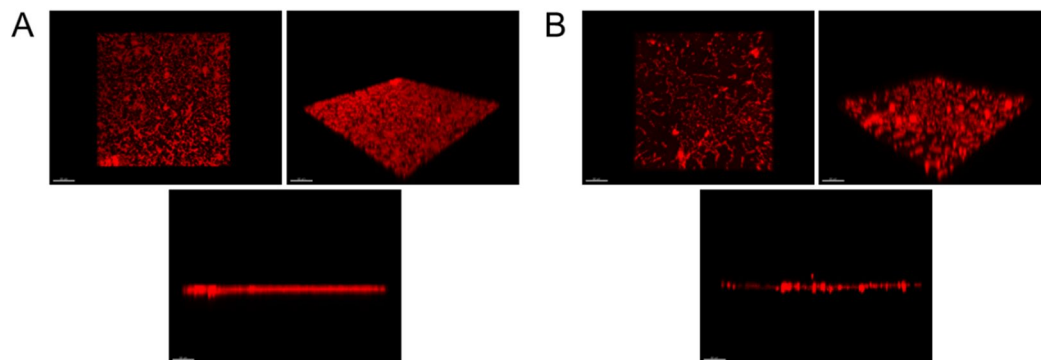


図 4 DNase 担持粒子のバイオフィーム形成抑制効果の検討 (CLSM 像、RhodamineB 染色)

- (A) DNase 非担持粒子からの溶出液存在下で形成されたバイオフィーム  
 (B) DNase 担持粒子から溶出した DNase 含有溶液存在下で形成されたバイオフィーム

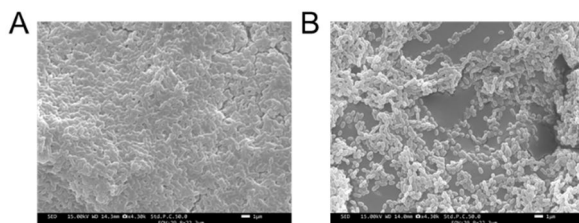


図 5 DNase 担持粒子のバイオフィーム形成抑制効果の検討 (SEM 像)

- (A) DNase 非担持粒子からの溶出液存在下で形成されたバイオフィーム  
 (B) DNase 担持粒子から溶出した DNase 含有溶液存在下で形成されたバイオフィーム

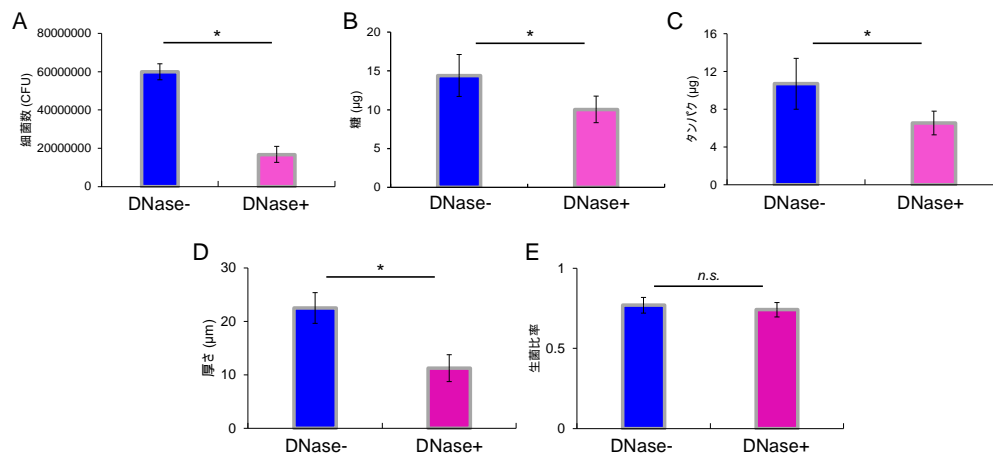


図 6 DNase 担持粒子のバイオフィーム形成抑制効果の検討 (定量的解析)

- (A) 細菌数, (B) 糖, (C) タンパク, (D) バイオフィームの厚さ, (E) バイオフィーム内の生菌比率

\* $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test,  $n = 5$ , エラーバーは S.D. を示す.

(4) DNase 担持粒子添加レジンのバイオフィーム形成抑制効果の検討

DNase 担持粒子を 10 (wt)% 添加した PMMA レジンからの DNase の溶出は、28 日間持続することが分かった (図 7)。

また、作製直後および 28 日間浸漬後の DNase 担持粒子添加レジン上では、DNase 非担持粒子添加レジンと同様に、生菌主体のバイオフィームが形成されたが、バイオフィーム内の細菌および細胞外マトリックスの密度や厚さが共に減少することが観察された (図 8、9)。このことから、DNase 担持粒子添加レジンから溶出される DNase は、バイオフィーム内の細菌の生存率には影響を与えず、細胞外マトリックス内の eDNA の制御により、バイオフィーム形成を抑制することが示唆された。

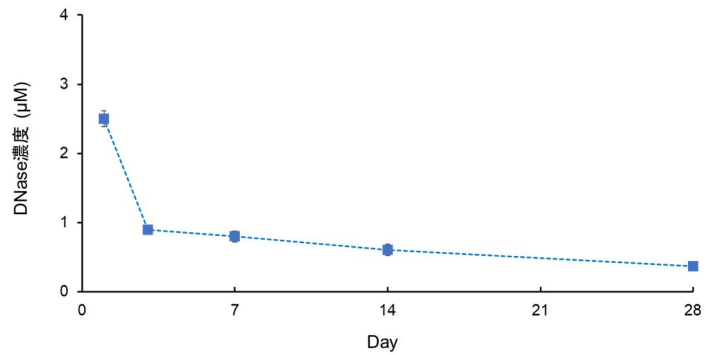


図 7 DNase 担持粒子添加レジンの DNase 溶出特性

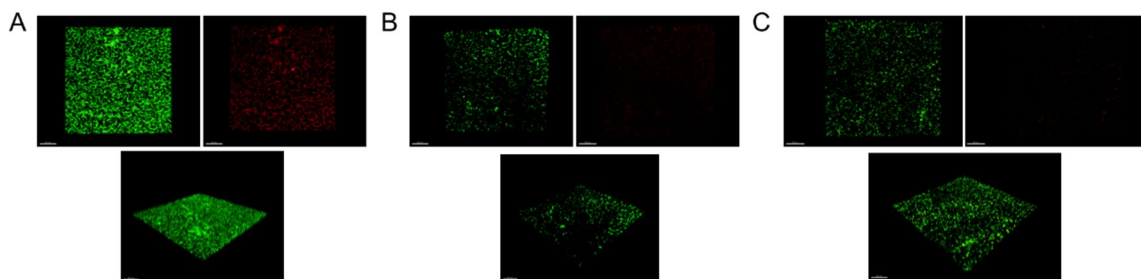


図 8 DNase 担持粒子添加レジンのバイオフィーム形成抑制効果の検討 (CLSM 像、Live/Dead 染色)

(A) DNase 非担持粒子添加レジン上に形成されたバイオフィーム (Live/Dead 染色)

(B) 作製直後の DNase 担持粒子添加レジン上に形成されたバイオフィーム (Live/Dead 染色)

(C) HEPES 緩衝液に 28 日間浸漬後の DNase 担持粒子添加レジン上に形成されたバイオフィーム (Live/Dead 染色)

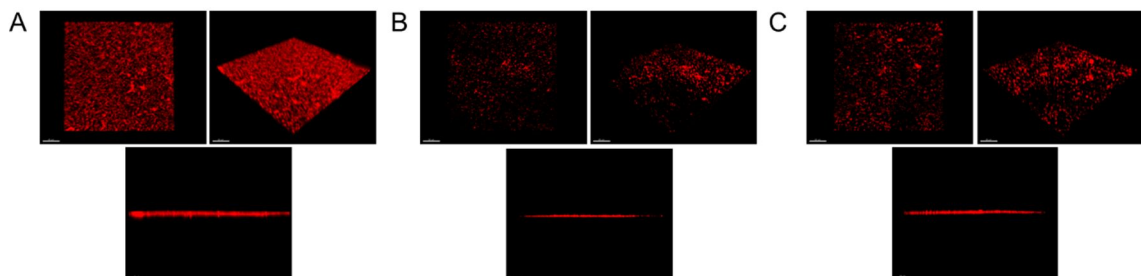


図 9 DNase 担持粒子添加レジンのバイオフィーム形成抑制効果の検討 (CLSM 像、Rhodamine B 染色)

(A) DNase 非担持粒子添加レジン上に形成されたバイオフィーム

(B) 作製直後の DNase 担持粒子添加レジン上に形成されたバイオフィーム

(C) HEPES 緩衝液に 28 日間浸漬後の DNase 担持粒子添加レジン上に形成されたバイオフィーム

以上のように、本研究により、非生体分解性 polyHEMA/TMPT 粒子に DNase を担持させることで、歯科用レジンから DNase を長期徐放できる技術の確立に成功した。さらに、DNase の徐放によりバイオフィーム内の eDNA を分解することで、歯科用レジン表面で口腔バイオフィームを効果的に抑制できることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kitagawa H, Kitagawa R, Tsuboi R, Hirose N, Thongthai P, Sakai H, Ueda M, Ono S, Sasaki JI, Ooya T, Imazato S	4. 巻 37
2. 論文標題 Development of endodontic sealers containing antimicrobial-loaded polymer particles with long-term antibacterial effects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 1248 ~ 1259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dental.2021.04.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitagawa H, Kohno T, Deng F, Abe GL, Sakai H, Fan YS, Wu T, Sasaki JI, Imazato S	4. 巻 10
2. 論文標題 Metal-doped silicate and phosphate glasses for antibacterial dental biomaterials	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomaterial Investigations in Dentistry	6. 最初と最後の頁 2284372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/26415275.2023.2284372	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6件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Imazato S
2. 発表標題 Smart bio-active restorative materials - Designing the next-generation materials for restorative dentistry-
3. 学会等名 7th International Congress on Adhesive Dentistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Imazato S
2. 発表標題 Bio-active restorative materials -What are they and their clinical benefits?
3. 学会等名 FDI World Dental Congress 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kitagawa H, Jakubovics NS, Wu T, Tsuiki K, German MJ, Imazato S
2. 発表標題 Fabrication of polymer particles loaded with eDNA-degrading enzyme
3. 学会等名 2023 IADR/LAR General Session & Exhibition with WCPD
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北川晴朗, 今里 聡
2. 発表標題 歯科材料への抗菌性付与のアプローチ
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023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・大学院歯学研究科・助教    (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		
英国	Newcastle University		