

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：47131

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670901

研究課題名(和文)人工脂質、プロタミンから合成した抗菌性複合体による口腔細菌抑制と口腔ケア向上

研究課題名(英文)Improvement of oral condition and control of oral bacteria by using antibacterial complexes synthesized with artificial lipid and protamine

研究代表者

井上 勇介 (Inoue, Yusuke)

福岡医療短期大学・その他部局等・教授

研究者番号：20105688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌性を有するL-Alanine decyl ester p-toluene sulfonic acid salt (C12-L-A1aと略す)とプロタミンをアルギン酸、ヒアルロン酸、CMCと反応させ、複合体を合成した。複合体の抗菌・抗真菌性および徐放性の検討後、義歯安定材、歯磨剤、義歯床用レジン、リベース材に添加して抗菌・抗真菌性を検討した。複合体はP. aeruginosa以外の細菌、真菌には抗菌・抗真菌性を示した。試作義歯安定材と歯磨剤の抗菌・抗真菌性は、複合体を10wt%添加しないと認められなかった。義歯床用レジン、リベース材の抗菌・抗真菌性は10wt%添加しないと認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The complexes were synthesized with the artificial lipid (L-Alanine decyl ester p-toluene sulfonic acid salt) and sodium alginate, sodium hyaluronate and CMC respectively. And also the complexes were synthesized with protamine and sodium alginate, sodium hyaluronate and CMC respectively. Antibacterial activity and antifungal activity of the complexes were estimated by using MIC (minimum inhibitory concentration). The complexes showed antibacterial activity to S. mutans and S. aureus and also showed antifungal activity to C. albicans. The denture adhesive or dentifrice which added the complexes of 10 wt% showed antibacterial activity and antifungal activity. The denture base resin or rebase resin which added the complexes of 10 wt% showed antibacterial activity and antifungal activity.

研究分野：生体材料学

キーワード：人工脂質 プロタミン 抗菌性 口腔ケア

1. 研究開始当初の背景

カチオン性人工脂質と DNA を反応させた複合体はフィルム化が可能で抗菌性および抗真菌性が認められることを報告した¹⁾。また、平成 18~20 年度の基盤研究で DNA/キトサン複合体の残余のリン酸基に人工脂質を結合させ、DNA/キトサン/人工脂質複合体を合成し、複合体に抗菌性が認められたことを報告した。一方、Miura らはプロタミンの酵素分解物が *C. albicans* に対して抗真菌性を有すると報告し²⁾、福島らは DNA/プロタミン複合体が水と混和するとペースト状になり、抗菌性を示すと報告している。筆者は以上の研究成果等を基に、抗菌・抗真菌性を有する人工脂質/アニオン性高分子複合体およびプロタミン/アニオン性高分子複合体を合成し、これら複合体を高齢者が日常的に使用する義歯安定材、歯磨剤、義歯床用レジン、リベース材に配合し、高齢者の口腔細菌のコントロールを行うことにより、口腔ケアの向上を図ることを考えた。

2. 研究の目的

研究代表者が合成した抗菌性を有する人工脂質や抗菌性のプロタミンは生体内でも比較的安全である。本研究では、まずカチオン性である人工脂質やプロタミンをアニオン性高分子（アルギン酸、ヒアルロン酸、カルボキシメチルセルロース）と静電的に反応させて新規の抗菌性を有する複合体を合成し、これらの複合体の口腔細菌に対する抗菌スペクトルおよび複合体からの抗菌成分の徐放性を検討する。そして、これらの複合体を高齢者が用いる義歯安定材、歯磨剤に配合して口腔細菌の抑制を図り、

口腔ケアの向上に寄与することを目的としている。また、メタクリレートモノマーへの溶解も可能性があり、義歯床用レジン、リベース材への応用も可能と考えている。

3. 研究の方法

1) 人工脂質の合成

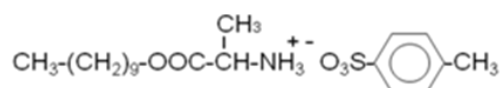


図1 C12-L-Ala

ラウリル酸、L-Alanine、p-Toluenesulfonic acid をトルエン中で反応させた後、アセトニトリル中で再結晶を繰り返し、減圧乾燥して L-Alanine decyl ester p-toluene sulfonic acid salt（以下 C12-L-A1a と略す）を合成した。（図1）

2) C12-L-Ala およびプロタミンとアニオン性高分子からの抗菌・抗真菌複合体の合成

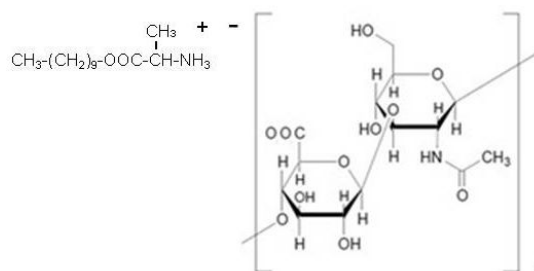


図2 C12-L-Ala/hyalu

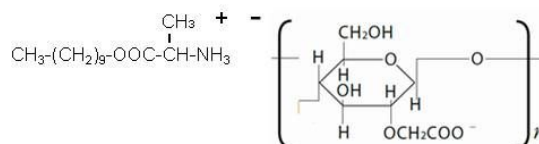


図3 C12-L-Ala/CMC

合成した C12-L-Ala とアニオン性高分子であるヒアルロン酸（hyalu と略す）、カルボキシメチルセルロース（CMC と略す）、アルギン酸（Alg と略す）を水溶液中で攪

拌して反応させ、水洗と遠心分離を繰り返した後、凍結乾燥して C12-L-Ala ベースの複合体 (C12-L-Ala/ hyalu 、 C12-L-Ala/ CMC 、 C12-L-Ala/ Alg) を合成し、白色の合成物を得た (図 2,3,4)。同様にプロタ

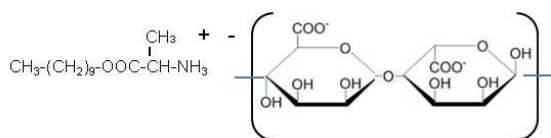


図4 C12-L-Ala/ Alg

ミンと上記のアニオン性高分子から、プロタミンベースの複合体 (Pro/ hyalu 、 Pro/ CMC 、 Pro/ Alg) を合成し、白色の合成物を得た (図 5,6,7)。

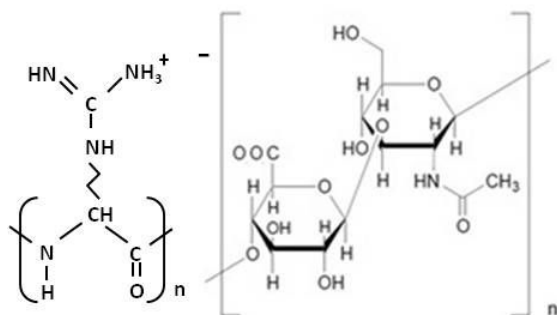


図5 Pro/ hyalu

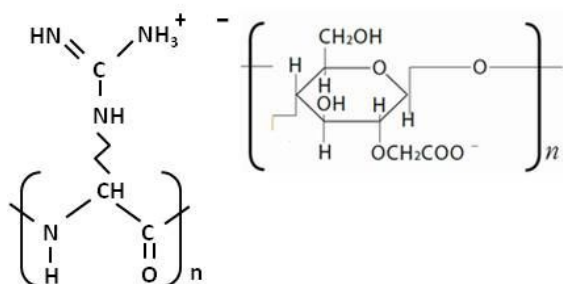


図6 Pro/CMC

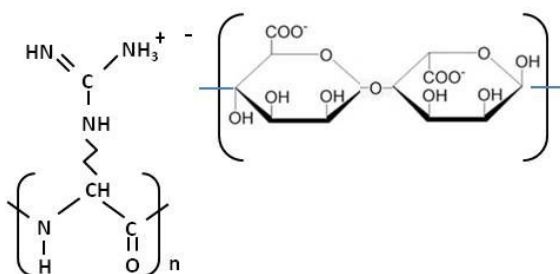


図7 Pro/Alg

3) 各種複合体の抗菌・抗真菌試験：抗菌・抗真菌性試験に用いた細菌

本研究で用いた細菌および真菌は *Streptococcus mutans* (clinically isolated) (*S. mutans*)、 *Staphylococcus aureus* 209P (*S. aureus*)、 *Pseudomonas aeruginosa* (laboratory stocked) (*P. aeruginosa*)、真菌は *Candida albicans* JCM9061 (*C. albicans*)であった。

4) 抗菌・抗真菌性試験

前培養は、 *S. mutans* は BHI ブイヨン培地、 *S. aureus*、 *P. aeruginosa* はトリプトソイブイヨン培地、 *C. albicans* は YM 培地を用い 37 °C で 24 時間前培養した。そして各々の菌液の濃度が 10⁶CFU/mL になるようにトリプトソイブイヨン培地あるいは BHI ブイヨン培地を用いて希釈した。

C12-L-Ala およびプロタミンとアニオン性高分子から合成した複合体は微粉碎してジメチルスルホキシド (DMSO) 中に 1000 μg/mL の濃度になるように溶解し、37 度の恒温室内で 24 時間震盪した溶液を抗菌試験液とした。希釈調整した菌液に抗菌試験液を倍々で希釈してマイクロプレートに入れ、24 時間震盪して培養した。

抗菌・抗真菌試験の評価は、マイクロプレートを用いる微量液体希釈法で行い、マイクロプレートリーダーを用いた吸光度法により最小発育阻止濃度 (MIC) で行った。

5) 徐放性の検討

合成した複合体を微粉碎し、脱イオン蒸留水中および人工唾液中に浸漬し、37 度の恒温室内で 24 時間、7 日、14 日、30 日間震盪する。震盪後の試料を再度、脱イオン蒸留水中および人工唾液中に浸漬し、37 度

の恒温室内で 24 時間震盪後メンブランフィルターを用いて濾過を行った液を徐放性検討用抗菌試験液とした。4) で調整した菌液 50 μ L と徐放性検討用抗菌試験液 50 μ L を用い、マイクロプレートに入れ、24 時間震盪して培養し、マイクロプレートリーダーを用いた吸光度法により徐放性の検討を行った。

6) 義歯安定材、歯磨剤の試作と抗菌・抗真菌性および徐放性の検討

CMC、メトキシエチレン無水マレイン酸共重合体、白色ワセリン、流動パラフィンを用いて試作した義歯安定材に合成した各種複合体を 2、5、10wt%と変えて配合したものを脱イオン蒸留水中に浸漬し、37 度の恒温室内で 24 時間震盪した。ただし、C12-L-Ala/ CMC、Pro/ CMC については、CMC の代わりに用いた。そして遠心機で義歯安定材を分離した液を抗菌試験液とした。抗菌・抗真菌性についてマイクロプレートリーダーを用いた吸光度法により評価した。

リン酸水素カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、プロピレングリコール、アルギン酸ナトリウムを用いて試作した歯磨剤に合成した各種複合体を 2、5、10wt%と変えて配合したものを脱イオン蒸留水中に浸漬し、37 度の恒温室内で 24 時間震盪した。そして遠心機で歯磨剤を分離した液を抗菌試験液とした。抗菌・抗真菌性についてマイクロプレートリーダーを用いた吸光度法により評価した。

また、5) と同様の方法で徐放性の検討を行った。

7) 歯科用モノマーとの相溶性

歯科で汎用されるモノマーとして MMA (メチルメタクリレート)、2HEMA (2 ヒ

ドロキシエチルメタクリレート)を選択し、合成した複合体を微粉碎して 1~10wt%の間でモノマーに添加した後、震盪させて目視で溶解性の検討を行った。

8) 抗菌・抗真菌性の義歯床用レジン、リベース材の検討

市販の義歯床用レジン、リベース材の粉末に微粉碎した複合体を混和重合させ、抗菌性、抗真菌性を Disk Diffusion 法で検討した。

4. 研究の成果

C12-L-Ala/ hyalu、C12-L-Ala/ CMC、C12-L-Ala/ Alg の *P aeruginosa* への抗菌性は認められなかったが *S. mutans*、*S. aureus*、*C. albicans* への抗菌・抗真菌性は認められた。Pro/ hyalu、Pro/ CMC、Pro/ Alg の抗菌・抗真菌性の傾向は人工脂質複合体と同じであった。

表 1 合成複合体の抗菌性・抗真菌性 (MIC : μ g \cdot mL)

| | <i>S. mutans</i> | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
|-----------------|------------------|------------------|----------------------|--------------------|
| C12-L-Ala/hyalu | 125 | 62.5 | - | 125 |
| C12-L-Ala/CMC | 250 | 125 | - | 500 |
| C12-L-Ala/Alg | 250 | 62.5 | - | 125 |
| Pro/hyalu | 250 | 125 | - | 250 |
| Pro/ | 500 | 500 | - | 500 |

| | | | | |
|-------------|-----|-----|---|-----|
| CMC | | | | |
| Pro/ Alg | 250 | 125 | - | 250 |

C12-L-Ala/hya、C12-L-Ala/CMC、C12-L-Ala/Arg、Pro/Arg、Pro/hyalu、Pro/CMCを1日、7日、14日、30日蒸留水中および人口唾液中に浸漬し、浸漬後の抗菌・抗真菌性と浸漬液の抗菌・抗真菌性を検討した。C12-L-Ala/Arg、C12-L-Ala/hyaluは人口唾液中では30日後には溶解していた。Pro/Arg、Pro/hyaluはいずれも人口唾液中30日後に抗菌・抗真菌性を示した。C12-L-Alaを用いた複合体は、7日後でも抗菌・抗真菌性の低下が見られ、また、人口唾液中の方が抗菌性の低下が早い傾向が見られた。

義歯安定材成分として知られるCMC、メトキシエチレン無水マレイン酸共重合体塩に白色ワセリン、流動パラフィンを添加して義歯安定材を試作したがいずれの複合体もそれらの液成分には溶解せず、試作した義歯安定材に複合体粉末を添加して実験を行った。その結果、いずれの複合体においても10wt%添加しないと抗菌性も抗真菌性も認められなかった。また、C12-L-Ala/CMC、Pro/CMCをカルボキシメチルセルロースの代わりに配合したものは、水中、人口唾液中において1日後で抗菌・抗真菌性を示した。

歯磨剤の基本組成（リン酸水素カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、プロピレングリコール、アルギン酸ナトリウム等）を基に歯磨剤を試作したが、複合体はそれらの液成分には溶解せず、試作した歯磨剤に複合体粉末を添加して実験を行った。義歯安定材と同様に複合体を10wt%添加しな

いと抗菌性も抗真菌性は認められず、水中、人口唾液中において1日後では抗菌・抗真菌性は認められた。

歯科で汎用されるMMA、2HEMAを選択して相溶性を検討したが、溶解性は認められなかった。そこで、計画では義歯床用レジン、リベース材の液に複合体を溶解させて重合し抗菌・抗真菌性の義歯床用レジン、リベース材の可能性について検討を行う予定であったが、義歯床用レジン、リベース材のそれぞれ粉末に微粉碎した複合体を2、5、10wt%添加して検討を行うことにした。

その結果、義歯床レジン重合体では10wt%添加では抗菌性は認められたが、それ以下の濃度では抗菌性が認められなかった。また、複合体微粉末を添加した義歯床レジン重合体の機械的性質はもろいものであり、実用にはならないものであった。今後、一部の複合体はフィルム化の可能性があるため、モノマーへの溶解ではなく、義歯床にフィルムを貼り付けることを考えてみたい。また、リベース材は義歯床ほど機械的性質が求められないので、アニオン性高分子に比較的低いbp（ベースペア）のDNAを選んで合成すれば、抗菌・抗真菌性リベース材の可能性はあると考える。

<引用文献>

- 1) Inoue Y, et al. Antibacterial characteristics of newly developed amphiphilic lipids and DNA-lipids complexes against bacteria. J Biomed Mater Res 2003;65A:203-208
- 2) Miura T, et al. Antifungal activity against *Candida albicans* on PMMA coated with protamine derivatives. Journal of Oral Tissue

Engineering 2011;8(3),30-38

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Yusuke Inoue, Minoru Kawaguchi,
Ichiro Masui, Harumi Horibe, Tetsuya
Rikimaru, Madoka Kuroki, Yuri
Katsumata, Nana Mori, Tohru Hayakawa,
Tadao Fukushima
Biological and Chemical Assessment of
DNA/Chitosan Complex Film
Journal of Hard Tissue Biology

[学会発表](0 件)

[図書](0 件)

[産業財産権](0 件)

[その他](0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 勇介 (INOUE Yusuke)

福岡医療短期大学・歯科衛生学科・教授

研究者番号 20105688

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし