

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462943

研究課題名(和文)新規バイオセンサを利用した口腔内における義歯の汚れの脱着の解析

研究課題名(英文)Analysis of desorption of denture in oral cavity using new biosensors

研究代表者

小正 裕 (KOMASA, Yutaka)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10131385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：各種歯科材料への唾液関連タンパク質の吸着および汚れのメカニズム等を解明するため、今回は各種義歯材料を模倣したバイオセンサ(PMMA, Ti QCMセンサ)を作製し、QCMおよびXPSによって異なる唾液関連タンパク質の吸着挙動を明らかにした。QCMの結果から示される通り、唾液関連タンパク質の吸着量はPMMAが最多であった。また、接触角とXPSの結果から、材料表面上の汚れの吸着には、濡れ性と化学的組成が関与していると考えられる。従って、今回作製したPMMA及びTi QCMセンサは義歯材料表面を模倣し、義歯の汚れの吸着を定量する上で有用である事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate the difference in the adsorption behavior of different types of bovine salivary proteins on the PMMA and Ti QCM sensors are fabricated by spin-coating and sputtering onto bare QCM sensors by using QCM and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The SPM images showed a relatively homogeneous surface with nano-order roughness. The XPS survey spectra of the thin films coated on the sensors were similar to the binding energy of the characteristic spectra of PMMA and Ti. Additionally, the amount of salivary related protein on the PMMA QCM sensor was higher than those on the Ti and Au QCM sensors. The difference of protein adsorption is proposed to be related to the wettability of each material. The PMMA and Ti QCM sensors are useful tools to study the adsorption and desorption of albumin and mucin on denture surfaces.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：義歯 QCM 唾液関連タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

高齢社会の中で、有病者や要介護者の増加により、在宅医療の介入は増加の一途を辿っている。平成 23 年歯科口腔保健法の導入においても「在宅歯科診療の推進」が重視されており、在宅歯科医療は重要な役割を果たしている。在宅診療において、最も大事なことは口腔衛生の管理である。また、義歯・補綴上の汚れ(デンチャープラーク)により、義歯を装着した高齢者の口腔ケアは、健常者でも十分ではなく、要介護者では清掃不良である事が多い。亀水らは、義歯の汚れであるデンチャープラークはバイオフィルムを形成しており、全身感染症の原因となる微生物のリザーバーになるといえる、と述べており、残存歯において、う蝕、歯周病をもたらす、義歯性口内炎や口角炎など口腔疾患の原因になる事が知られている。そして、義歯・補綴物への細菌等の付着が誤嚥性肺炎、ひいては全身疾患に關与する危険性を有している。その為、口腔内清掃状態を良好にする事が重要である。よりよい口腔衛生状態を提供するためには、補綴物に対する汚れの付着のメカニズムを知ることが必要である。

在宅歯科治療で行われる口腔ケアとしてあげられるのはブラッシング指導および義歯の清掃であるが、口腔内にはインプラント、義歯、歯冠修復物等の様々な歯科材料が存在しており、それぞれに清掃条件が異なり、特に在宅歯科治療という特殊な環境下における口腔衛生管理は最も困難である。そこで、衛生面を向上させる為の新たな歯科材料の開発もしくは洗浄効果が高い新たな洗浄剤の開発において、今回提示するバイオセンサが有用である事が示唆される。バイオセンサとは、酵素・微生物・抗体といった生体に関連する物質が有する分子識別機能を利用して、検出対象物質の検出・計測を行うセンサの事である。

今回使用した水晶振動子マイクロバランス(以下、QCM とする)法は、振動子の振動数が液体、気体などの媒介中の含有物、微粒子の吸着量に応じて変化することから、ホストを振動子上に固定すれば、ゲストの吸着量をナノレベルで分析することができる。

## 2. 研究の目的

本研究では、QCM センサ表面上にスピンコート法を利用して PMMA を成膜、スパッタ法を用いて Ti を成膜し、義歯表面を模倣した PMMA QCM センサ及び Ti QCM センサの作製を行った。また、PMMA と Ti QCM センサを用いて、唾液関連タンパク質であるアルブミン及びムチンの吸着挙動を QCM 及び XPS にて測定を行い、義歯表面への汚れの付着における解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 試料作製

無処理の initium 社製 Au QCM センサを洗

浄する為にピランハ溶液(配分:過酸化水素水:濃硫酸=1:3)に5分間浸漬し、その後蒸留水にて洗浄した。この操作を2回行った後、酢酸エチル溶液に溶解した PMMA (0.1g/ml)をスピンコート15秒間3000回転中に約10 $\mu$ l滴下し、PMMA QCM センサを作製した。また、ターゲットとの距離は50mm、スパッタリングチャンバーは7 $\times$ 10<sup>-4</sup>、スパッタリングガスはAr gas、スパッタ圧は0.2Pa、放電電圧は200Wの条件下でのスパッタ法にてTi QCM センサを作製した。

### (2) 表面解析

コーティング前後の薄膜表面の観察を走査型プローブ顕微鏡(SPM:SPM-9600; SHIMADZU)、表面の元素解析をX線電子分光分析装置(XPS:PHI-X tool; ULVAC-PHI)、ぬれ性の分析を接触角測定(DSA10Mk2 Drop Shape Analysis; KRÜSS)にて行った。

### (3) 吸着量の解析

QCM センサ表面におけるタンパク質の吸着挙動について分子間相互作用定量 QCM 装置(INITIUM 社製 AFFINIX QN  $\mu$ ユニット型)を用いて比較検討を行った。評価対象は0.2mg/mlのウシ血清アルブミン(以下BSA)及びウシ血清ムチン(以下BSM)を用いた。QCM センサを装置に装着し、ガラスセルにリン酸緩衝液を500 $\mu$ l入れ25に設定した後、評価対象である0.2mg/mlのBSA及びBSMをガラスセルに5 $\mu$ L滴下した。振動数の減少から評価対象の各種QCM センサ上の吸着を確認致した。各種センサ上にBSA及びBSM付着後、XPSにてセンサ上の付着物の元素解析を行った。

### (4) QCM 装置

QCM システムは極薄く板上に切り出した水晶の結晶の両側に金属被膜を取り付けた水晶発振子(QCM センサ)をある一定の周波数(共振周波数)で振動させる。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という性質を微量天秤として利用したシステムである。本システムを利用すると、試薬滴下後に継時的な下降を示す曲線を描く。共振周波数の減少はセンサ上に試薬が付着したことを示す。また、Sauerbrey の式より、1Hz減少すると0.62ng/cm<sup>2</sup>センサ上に付着している事が分かるので、その事より、周波数の減少量よりセンサ上に付着したBSA及びBSMの定量を行った。

### (5) 統計解析

各種センサの評価は計測を各3回ずつ行い、各々の計測値をSauerbreyの式にて数値変換し、一元配置分散分析にて統計解析を行った。また有意差を認められた場合、Tukeyの多重比較検定を行った。有意水準は5%未満とする。

#### 4. 研究成果

##### (1) 表面解析

SPMの結果(図1)から、QCM センサ表面にはPMMAおよびTiが均一に成膜されていることが明らかとなった。表面粗さについては材料間に差は認められなかった。XPSの結果では、Au センサ(図2)ではAuに特有のピークであるAu4fを、PMMA センサ(図3および図4)では構成元素である炭素(C)に特有のC1sと酸素(O)に特有のO1sのそれぞれのピークを、Ti センサ(図5)ではTi特有の金属Tiと酸化TiのそれぞれのTi2pのピークを認めた。接触角の結果(図6)では、各種金属材料においては接触角に有意差は見られず、それと比較してPMMA QCM センサは接触角が有意に大きく、疎水性であることが明らかとなった。

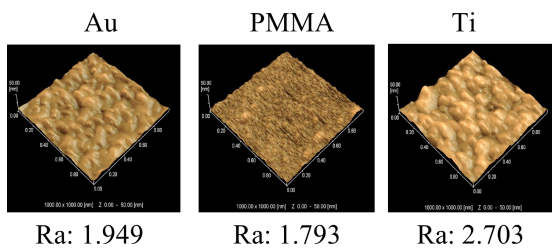


図1 SPM 画像

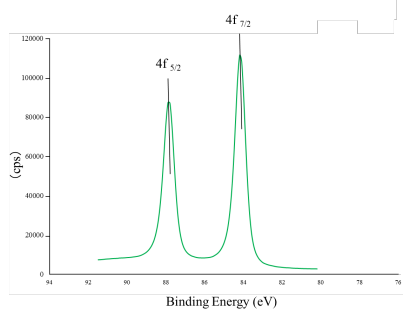


図2 XPS 解析 (Au QCM センサ)

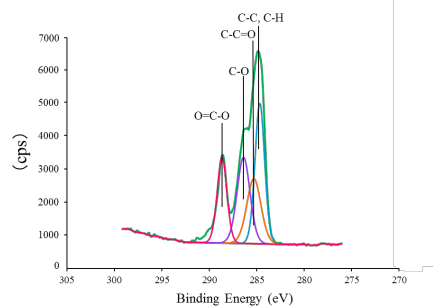


図3 XPS 解析 (PMMA QCM センサ C1s)

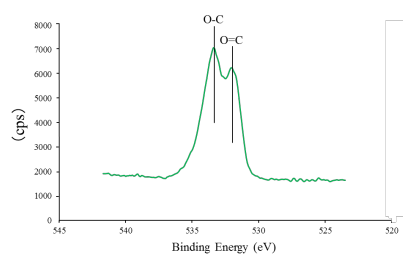


図4 XPS 解析 (PMMA QCM センサ O1s)

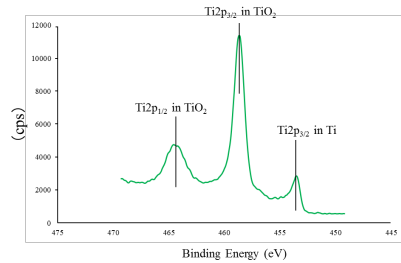


図5 XPS 解析 (Ti QCM センサ)

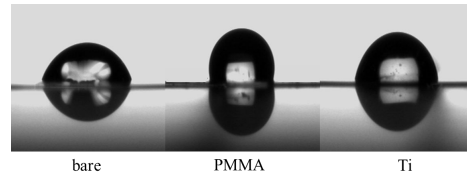


図6 接触角測定

##### (2) タンパク質吸着量

QCMの結果(図7)から、BSA及びBSMの吸着量はPMMA QCM センサでは他のセンサと比較して統計学的に有意に高い値を示した。

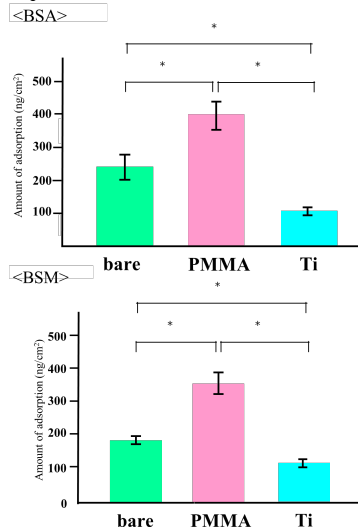


図7 QCM 測定結果

##### (3) タンパク質吸着後のXPS解析

有機材料や金属酸化物の汚れには炭素C、酸素O、窒素Nが関与していると過去の論文において述べられており、特にNは唾液タンパク質のペプチド結合に寄与することが考察されている。その為、今回はBSAとBSMの付着後の研究において、CとNのピークについて検討を行った。BSA及びBSM吸着後、各種QCMセンサにおいて、C1sのピークについて検討したところ(図8、10)付着前後の結合様式にほぼ変化は無いものの吸着量に変化があることが示唆された。また、吸着前には3種のセンサ全てにN1sのピークは認められなかったが、付着後に顕著なN1sのピークの変化を認めた(図9、11)。

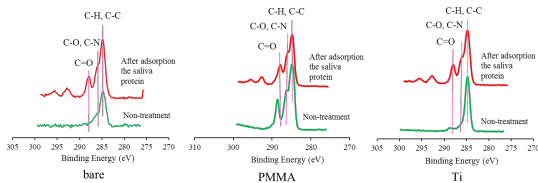


図8 BSA 付着後のXPS解析 (C1s)

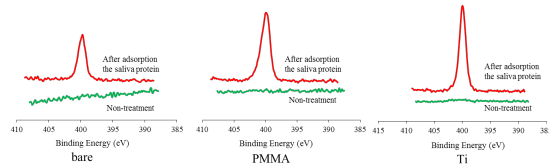


図9 BSA 付着後のXPS解析 (N1s)

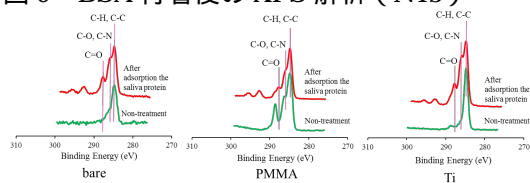


図10 BSM 付着後のXPS解析 (C1s)

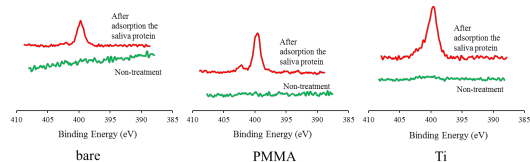


図11 BSM 付着後のXPS解析 (N1s)

以上より、QCMの結果から示される通り、PMMAの吸着量が最多であった事は、今回の接触角とXPSの結果から、材料表面上の汚れの吸着には、濡れ性と化学的組成が関与していると考えられる。

今回作製したPMMA及びTi QCMセンサは義歯材料表面を模倣し、義歯の汚れの吸着を定量する上で有用である事が明らかとなった。現在は、過ギ酸を使用する事により、義歯表面に付着した汚れの脱着ができている事を確認しており、新規の義歯洗浄剤の開発に取り組んでいる。

##### 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. Miyake A, Komasa S, Hashimoto Y, Komasa Y, Okazaki J.

Adsorption of Saliva Related Protein on Denture Materials: An X-Ray Photoelectron Spectroscopy and Quartz Crystal Microbalance Study. *Advances in Materials Science and Engineering*. 査読有

2016, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5478326>.

2. Miyake A, Komasa S, Hashimoto Y, Kusumoto T, Fujiwara I, Taguchi Y, Nishizaki H, Komasa Y, Okazaki J.

Fabrication of PMMA QCM sensor. *日本口腔リ*

ハビリテーション学会雑誌 査読有 2015; 26(1): 22-9.3.

3. Komasa S, Xing H, Taguchi Y, Kayama T, Fujio M, Miyake A, Shimamura S, Kusumoto T, Nishizaki H, Okazaki J.

Osteogenesis related gene expression on titanium surfaces with nano-network structures formed by treatment with alkali solutions. *Journal of Osaka Dental University*. 査読有 2014; 48(2): 133-9.

〔学会発表〕(計17件)

1. 小正 聡、三宅 晃子、田代 悠一郎、中澤 修一、寺田 知里、恩地 良幸、楠本 哲次、西崎 宏、小正 裕、岡崎 定司  
新規バイオセンサの臨床応用の可能性について

平成 28 年度日本補綴歯科学会関西支部学術大会

2016年10月29日~30日

あべのハルカス(大阪府大阪市)

2. 田代 悠一郎、小正 聡、三宅 晃子、中澤 修一、橋本 典也、高橋 一也、西崎 宏、小正 裕、岡崎 定司

チタン QCM ナノシートセンサを利用した細胞接着タンパク質の吸着挙動の測定

平成 28 年度日本補綴歯科学会関西支部学術大会

2016年10月29日~30日

あべのハルカス(大阪府大阪市)

3. 小正 裕、三宅 晃子、小正 聡、橋本 典也、西崎 宏、高橋 一也、岡崎 定司

新規バイオセンサを利用した口腔内における義歯の汚れの脱着の解析

第23回日本歯科医学会総会

2016年10月21日~23日

福岡国際会議場(福岡県福岡市)

4. 三宅 晃子、小正 聡、橋本 典也、高橋 一也、西崎 宏、小正 裕、岡崎 定司

新規バイオセンサによる口腔内の汚れの分析

第23回日本歯科医学会総会

2016年10月21日~23日

福岡国際会議場(福岡県福岡市)

5. 三宅 晃子、小正 聡、田代 悠一郎、中澤 修一、橋本 典也、西崎 宏、小正 裕、岡崎 定司

義歯材料への唾液関連タンパク質の吸着分析

日本バイオマテリアル学会 第11回関西若手研究発表会

2016年8月6日

神戸大学 百周年記念館(兵庫県神戸市)

6. 三宅 晃子、小正 聡、高橋 一也、西崎 宏、小正 裕、岡崎 定司

義歯表面を模倣した新規バイオセンサの開発

第29回日本口腔リハビリテーション学会学術大会

2015年11月14日~15日

徳島大学 長井記念ホール(徳島県徳島市)  
7. 三宅 晃子, 小正 聡, 橋本 典也, 小正 裕, 岡崎 定司  
義歯材料への唾液関連タンパク質の吸着  
XPS と QCM による研究  
平成 27 年日本補綴歯科学会関西支部学術大会  
2015 年 11 月 7 日~8 日  
兵庫医療大学(兵庫県神戸市)  
8. 三宅 晃子, 小正 聡, 西崎 宏, 高橋 一也, 小正 裕, 岡崎 定司  
口腔内補綴物材料を模倣した QCM センサにおける汚れの吸着について  
日本老年歯科医学会 第 26 回学術大会  
2015 年 6 月 12 日~14 日  
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)  
9. Miyake A, Komasa S, Hashimoto Y, Nishizaki H, Komasa Y, Okazaki J  
Investigation of protein's adsorption on the some Dental prosthesis  
日中韓 3 か国合同補綴学会  
2015 年 4 月 10 日~12 日  
箱根小涌園ルネッサン(神奈川県横浜市)  
10. Miyake A, Komasa S, Hashimoto Y, Takahashi K, Nishizaki H, Komasa Y, Okazaki J  
Investigation of stain's adsorption on the PMMA QCM sensors  
93<sup>rd</sup> General Session & Exhibition of the IADR  
2015 年 3 月 11 日~14 日  
Boston (USA)  
11. 藤尾 美穂, 小正 聡, 三宅 晃子, 橋本 典也, 高橋 一也, 西崎 宏, 小正 裕, 岡崎 定司  
純チタンの QCM マイクロセンサへの応用  
平成 26 年度 日本歯科補綴歯科学会 中国・四国, 関西支部合同学術大会  
2014 年 9 月 6 日~7 日  
倉敷市芸文館(岡山県岡山市)  
12. 三宅 晃子, 小正 聡, 橋本 典也, 藤尾 美穂, 高橋 一也, 西崎 宏, 小正 裕, 岡崎 定司  
義歯表面を模倣した PMMA QCM センサを利用した汚れの吸着量の分析  
平成 26 年度 日本歯科補綴歯科学会 中国・四国, 関西支部合同学術大会  
2014 年 9 月 6 日~7 日  
倉敷市芸文館(岡山県岡山市)  
13. 三宅 晃子, 小正 聡, 西崎 宏, 高橋 一也, 小正 裕, 岡崎 定司  
改良型 PMMA QCM センサにおける吸着挙動の測定について  
日本老年歯科医学会 第 25 回学術大会  
2014 年 6 月 13 日~14 日  
電気ビルみらいホール(福岡県福岡市)  
14. 小室 聖子, 三宅 晃子, 小正 聡, 橋本 典也, 高橋 一也, 岡崎 定司, 小正 裕  
義歯表面を模倣した PMMA QCM センサの開発について  
日本歯科補綴歯科学会 第 123 回学術大会  
2014 年 5 月 23 日~25 日

仙台国際センター(宮城県仙台市)  
15. 三宅 晃子, 小正 聡, 橋本 典也, 藤原 到, 西崎 宏, 岡崎 定司  
酢酸エチルを利用した PMMA QCM 改良センサの作製について  
日本歯科補綴歯科学会 第 123 回学術大会  
2014 年 5 月 23 日~25 日  
仙台国際センター(宮城県仙台市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小正 裕(KOMASA, Yutaka)  
大阪歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 10131385

### (2)研究分担者

岡崎 定司(OKAZAKI, Joji)  
大阪歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 80169094

小正 聡(KOMASA, Satoshi)  
大阪歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 70632066