

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792078

研究課題名(和文)小分子化合物を応用した感染応答性義歯床材料の開発

研究課題名(英文)Development of a rechargeable infection responsive antifungal denture material using small molecule compounds

研究代表者

綿本 隆生 (Watanabe, Takao)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60420444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：抗真菌作用を有する新たな小分子化合物を探索するため、1280種の薬理活性を持つ小分子化合物ライブラリーを用い、カンジダに対する抗真菌性のスクリーニング検査を行った。その結果、抗真菌作用を有する35個の小分子化合物が検出された。5つの小分子化合物は強い抗真菌作用を有しており、バイオフィルムに対しても有効であり、ヒト歯肉線維芽細胞に対し、250 μM未満のCV-3988が毒性が低いことが示された。これを抗真菌剤として用い、義歯床用材料の作製を行った。ディスク拡散法により評価した結果、抗真菌性を認めた。

以上の結果より、この義歯床用材料は口腔カンジダ症の予防および治療に貢献する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To develop new small-molecule antifungal compounds by library screening methods using *Candida Albicans*, and to evaluate their antifungal effects on *Candida* biofilms and cytotoxic effects on human cells. Wild-type *C. albicans* strain SC5314 was used in this study. To identify antifungal compounds, we screened a small-molecule library using an antifungal susceptibility test (AST). We tested the cytotoxicity of the hit compounds using human gingival fibroblast (hGF) cells to evaluate their clinical safety. Only 35 compounds were identified by screening, which inhibited the metabolic activity of *C. albicans* by >50%. Five compounds had strong fungicidal effects and could inhibit the metabolic activity of *Candida* biofilms. Only CV-3988 showed no cytotoxicity at a fungicidal concentration of 0.25M. CV-3988 had fungicidal effects on *C. albicans*, but low cytotoxic effects on hGF cells. Therefore, CV-3988 could be a novel treatment for superficial mucosal candidiasis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：口腔細菌学 バイオフィルム カンジダ 小分子化合物 抗真菌剤 レジン床義歯

1. 研究開始当初の背景

*Candida albicans*は、口腔内および膈内に常在し、日和見感染や院内感染の原因菌となる。特にAIDS患者、化学療法を受けているガン患者、重度糖尿病患者や臓器移植を受けた患者など免疫能力の低下した患者では、カンジダ症は死亡に至る深刻な問題となっている。近年、カンジダ院内感染による死亡率も増加傾向にあり、それに伴う治療費も莫大な額に上っている。特に、口腔内の*C. albicans*は義歯床用レジンに容易に付着・定着し、義歯性口内炎を惹起する原因となる。高齢化に伴い、レジン床義歯を装着している患者は増加しており、それに伴い*C. albicans*の保菌者およびカンジダ症を発症する人口の増加が懸念される。さらに抗真菌剤に抵抗性を示す薬剤耐性菌の出現が報告されており、カンジダ症の治療を困難にする原因の一つとなり、大きな問題となっている。それらの対応策として、義歯性口内炎の予防、抗真菌剤の適正な使用および新たな抗真菌剤の開発などを行う必要がある。

近年、義歯性口内炎の治療のために抗真菌性を付与できる義歯床用材料の作製方法が開発され⁽¹⁾、その臨床応用が期待されている。この方法は必要に応じ義歯床用材料に抗真菌性を付与することが可能であり、抗真菌剤の適正使用を行うことが可能となる。さらに、新たな抗真菌剤を開発することにより、既存の薬剤耐性菌に対し治療効果が期待され、義歯性口内炎のみならずカンジダ症の治療に有用であることが予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗真菌作用を有する新たな小分子化合物を見出し、その*C. albicans*に対する抗真菌作用及びヒトの細胞に対す

る細胞毒性を評価し、さらに検出された小分子化合物を応用した抗真菌性を有する新規義歯床用材料を開発し、その効果を検討することである。

3. 研究の方法

新規抗真菌剤のスクリーニングには、*C. albicans* 正常株 (SC5314, 野生株) および小分子化合物ライブラリー (LOPAC1280™, Sigma) を用いた。米国臨床検査標準協議会 (CLSI) 法と XTT reduction assay を応用した抗真菌剤感受性テスト⁽²⁾により、*C. albicans* に対する抗真菌作用を評価し、抗真菌剤の候補となる小分子化合物の検出を行った。次に、検出された小分子化合物が *C. albicans* の様々な生育環境に対する抗真菌作用を検討するため、菌を「浮遊培養」、「付着培養」、「バイオフィーム培養」し、それぞれの生育環境において、抗真菌剤感受性テストを行った。「浮遊培養」には Sabouraud's dextrose agar (SDA) 培地 (Gibco) 上に培養された菌を yeast nitrogen base (YNB) 液体培地 (Difco) にて 37 °C で一晩培養し、細胞濃度 1×10^7 cells/mL に調製したものをを用いた。さらに、その懸濁液を 96well 細胞培養プレート (Iwaki) に播種し、37 °C のロータリーシェイカー中で 90 分間培養し、プレートに付着した菌を「付着培養」とした。その後、同条件で 24 時間培養したものを「バイオフィーム培養」とした。次にヒトの細胞に対する安全性および *C. albicans* に対する選択毒性を検討するため、検出された小分子化合物の細胞毒性を評価した。細胞にはヒト由来の歯肉線維芽細胞を用い、細胞増殖試験 (WST Cell counting assay, Dojindo) により小分子化合物が細胞増殖に与える影響を検討した。以上により *C. albicans* に抗真菌作用を有し、ヒトに対し毒性の少ない小分子化合物の検出を

行った．最後に，抗真菌性を有する義歯床用材料の作製を行った．義歯床用材料にはジウレタンメタクリレート (Sigma) にメタクリル酸 (Sigma) を 10% 配合し，重合開始剤としてアゾビスイソブチロニトリル (Sigma) を用いた．それらを 70 で 3 時間重合を行い，直径 13mm，厚さ 1mm の円盤状試料を作成した．最終的に検出された小分子化合物溶液中に試料を 24 時間浸漬し，その表面に小分子化合物を結合させた．さらに試料表面の小分子化合物は 5% エチレンジアミン四酢酸 (EDTA, Sigma) に 8 時間浸漬し 除去を行った．*C. albicans* に対する抗真菌作用はディスク拡散法を応用し，義歯床用材料 (浸漬なし，浸漬後，EDTA 浸漬後) が形成する菌発育阻止円の測定を行い評価した．

4. 研究成果

スクリーニングにより *C. albicans* に対し抗真菌作用を有する 35 個の小分子化合物が検出された．そのうち 26 個は静菌的作用，9 個は殺菌的作用 (表 1) を有し，中でも Bay11-7082, Bay11-7085, Ellipticine, Sanguinarine, CV-3988 は強い抗真菌作用を有しており，新たな抗真菌剤の候補として検出された．

表1. *C. albicans* に対し殺菌的作用をもつ小分子化合物

小分子化合物	発育阻止率
Bay 11-7085	100
Chelerythrine chloride	82.4
Dequalinium chloride hydrate	71.5
Ellipticine	100
Indatraline hydrochloride	85.2
Palmitoyl-DL-carnitine chloride	76.0
Bay 11-7082	100
Sanguinarine chloride hydrate	100
CV-3988	93.3

これら 5 個の小分子化合物に対し，様々な育成環境における抗真菌剤感受性テストを行った結果，「浮遊培養」に対する 50% 最小発育阻止濃度 (MIC) は Bay11-7082, Bay11-7085 と Ellipticine, Sanguinarine,

CV-3988 はそれぞれ 15.6 μM , 3.91 μM , 1.95 μM , 7.81 μM であった．「付着培養」に対する MIC は，Bay11-7082 と Bay11-7085, Ellipticine, Sanguinarine, CV-3988 はそれぞれ 125 μM , 31.3 μM , 125 μM , 62.5 μM であった．「バイオフィルム培養」に対する MIC は Bay11-7082, Bay11-7085, Ellipticine, Sanguinarine と CV-3988 はそれぞれ 1 mM, 500 μM , 62.5 μM , 250 μM であった．

次に，ヒト歯肉線維芽細胞に与える影響を検討した結果，培養 4 日目までは Bay 11-7082 と Bay 11-7085, Ellipticine, Sanguinarine, CV-3988 はそれぞれ 15.6 μM , 3.91 μM , 1.95 μM , 250 μM 未満の濃度では細胞増殖の抑制を認めなかったが，細胞の死滅は認めなかった．したがって，250 μM 未満の CV-3988 が *C. albicans* に対し抗真菌作用を有し，ヒト線維芽細胞に対し毒性が低いことが示された．

そこで，CV-3988 を抗真菌剤として使用した義歯床用材料の作製を行った．ディスク拡散法により床用材料の抗真菌性を評価した結果，CV-3988 を結合させない場合，発育阻止円の形成は認めず，CV-3988 結合させた場合，ディスクの端より $2.5 \pm 0.4\text{mm}$ の発育阻止円が形成された．さらにディスクを EDTA に浸漬することにより，抗真菌作用は消失し，ディスク拡散法による発育阻止円は形成されなかった (図 1)．

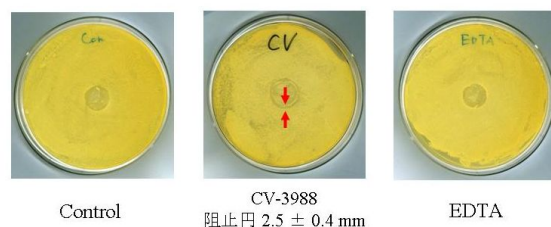


図1. ディスク拡散法による発育阻止円の形成

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 1 件)

Watamoto T, Egusa H, Sawase T, Yatani H.
Clinical evaluation of chlorine dioxide
for disinfection of dental instruments.
Int J Prosthodont. 査読有 . 2013
Nov-Dec; 26(6):541-4. doi:
10.11607/ijp.3465.

[学会発表] (計 2 件)

綿本隆生, 江草宏, 矢谷博文, 澤瀬隆 .
小分子化合物を応用した免疫応答性義歯床
用材料の開発 . 日本補綴歯科学会第 122 回
学術大会 . 2013 年 5 月 18 日 (福岡)

綿本隆生, 宮原健治, 澤瀬隆 . チタン合
金へのマイクログループ付与は骨組織の形
成を促進する . 第 42 回公益社団法人日本イ
ンプラント学会学術大会 . 2013 年 9 月 14
日 (福岡)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

綿本 隆生 (Takao Watamoto)

長崎大学・医歯 (薬) 学総合研究科・助教

研究者番号 : 60420444

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :