

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20461

研究課題名(和文) アドヘジン様物質の競合機構を利用したCandidaバイオフィルム付着阻害法の開発

研究課題名(英文) Development of adhesion inhibition method for Candida biofilm using competitive mechanism of adhesin-like polysaccharides

研究代表者

佐藤 薪 (SATO, Maki)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：10712094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：カンジダの細胞壁を構成する多糖類である3種のアドヘジン様物質(マンナン、ガラクトマンナン、グルカン)を義歯床用レジンへコーティングしてカンジダ付着阻害効果を確認した。それぞれ濃度1mg/mlと10mg/mlで検討した結果、マンナンは濃度依存的に付着阻害効果が確認できたが、ガラクトマンナンとグルカンは全く効果が認められなかった。同様に細胞壁の構成成分とされ抗真菌作用が確認されているキトサンを床用レジンに応用したが期間内に効果を確認することができなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the inhibitory effects of denture plate resin coatings on the adherence of Candida to the resin. Three adhesin-like polysaccharides (mannan, galactomannan, and  $\beta$ -glucan), which are structural components of the Candida cell wall, were used as coatings. A concentration-dependent inhibition of Candida adherence to the denture plate resin was observed in the groups coated with either 1 or 10 mg/ml mannan, but neither galactomannan nor  $\beta$ -glucan showed any inhibition effect. Similarly, chitosan, another structural component of the cell wall, which is known to have antimycotic properties, was applied to the denture plate resin, but no effect was observed over the period of this study.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：義歯床用レジン デンチャーブランク バイオフィルム Candida

## 1. 研究開始当初の背景

義歯床用レジンの表面は多孔性であり、デンチャープラークが付着しやすい。義歯床用レジンへの微生物の感染は非常に急速であり、*Candida* 種は義歯床用材料に強く付着する。義歯の装着とともに *Candida* 種の口腔内保菌率は増加し、義歯表面への付着は義歯床用材料の劣化を招くだけでなく、義歯性口内炎を引き起こす。さらに、口腔衛生の欠如は高齢者の誤嚥性肺炎の感染リスクを増加させ、全身状態の低下した高齢者の口腔内に微生物のリザーバーとなる不衛生な義歯を装着することは極めて危険である。義歯性口内炎は、義歯装着者に影響を与える非常に一般的な疾患であり、急性期治療には抗真菌療法が有効である。しかしながら、抗真菌療法の有効性は限られ、治療を中止した後、短期間で義歯性口内炎が急速に再発し得る。この疾患の再発は義歯の表面に残存する *Candida* 種による持続感染によるものと思われる。高齢化社会においてレジン床義歯は多くの需要があるが、清潔に保つことは困難であり、要介護者など自分で義歯の清掃や管理が困難な場合も多いため、付着自体を阻害する方法が求められている。

バイオフィルムの付着阻害には、抗菌剤を取り込む方法があり、添加した抗菌剤の徐放性によってバイオフィルムを阻害または抑制することが可能である。クロルヘキシジンなどの抗菌剤の添加は抗菌物質の溶出後に生じる空隙により機械的性質を低下させることが懸念され、銀ナノ粒子などの抗菌剤が使用されているが、銀ナノ粒子を添加したアクリルレジンに変色が問題とされている。

そこで、本研究ではプラスチック製培養プレートに対して菌糸型 *Candida albicans* の付着阻害効果が報告されている *Saccharomyces cerevisiae* 由来のマンナンに着目した。

義歯床用材料の表面の疎水性は義歯表面にコロニーを形成する *C. albicans* の菌糸形態能力を高めることが示されており、*in vitro* の研究では親水性コーティング材料は *C. albicans* だけでなく他の *Candida* 種の付着を低下させることが示されている。

一方、*Candida* の細胞壁の最外層はマンナンやβグルカンなどの親水性多糖類で覆われている。これらの真菌の表面に存在するマンナンはアドヘジンとして機能し、宿主細胞への接着に関与しているだけでなく、プラスチック板にも吸着を示す。また、マンナンやβグルカンは日常の食品に多く含まれており、日本人は長い食経験をもち、さらに、近年マンナンを成分とする食品や医療用具

が開発され、マンナンは線維芽細胞や血管内皮細胞を増殖させ、コラーゲンの産生を高めることで創傷治癒を促進する他、インフルエンザや細菌感染症、アレルギー性疾患の予防などへの有効性と安全性も確認されている。

本研究ではアドヘジン様物質を義歯床用レジンにコーティングしてアドヘジン様物質を競合させることで *Candida* の付着阻害を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究ではマンナン、ガラクトマンナン、βグルカンの3種の *Candida* の細胞壁を構成する多糖類であるアドヘジン様物質を義歯床へコーティングして付着阻害効果を確認した。さらに、安定的にレジン表面に固定化することで長期間効果が持続する *Candida* バイオフィルム付着阻害法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 義歯床用レジン片の準備

クリアタイプの義歯床用流し込みレジン(パラエクスプレス®、ヘレウスクルツァージャパン、東京)をメーカー指示に従い重合させ、直径5mm、厚さ2mmに形成したものをを用いた。全ての試料片は80%エタノールで消毒し、蒸留水に浸漬した。

### (2) 試薬とコーティングの準備

本研究では濃度1mg/ml、10mg/mlの *S. cerevisiae* 由来のマンナン(Sigma Chemical Co., MO, USA)、ローカストビーンガム(ガラクトマンナン;富士フィルム和光純薬、大阪)、黒酵母由来のβグルカン(東京化成工業、東京)を使用した。ローカストビーンガムとβグルカンは蒸留水に溶解すると粘度が発現するため、溶解温度を80度に設定して超音波洗浄機で攪拌するなど試みたが、蒸留水への溶解は困難であったため、乳鉢を用いて混和しゲル化を行った。ゲル状の試薬はレジン片に均一に広げてコーティングした後、乾燥滅菌機80度で殺菌乾燥させレジン片に試薬を固定化した。マンナン溶液は濾過滅菌した後に同様にコーティングした。実験には蒸留水に一晩浸漬したものを対照群とした。各試薬をコーティング後、ヒト濾過唾液に一晩浸漬した。

### (3) *Candida albicans* 菌株と培養条件

*Candida albicans* 標準菌株 ATCC18804 は前培養として 10 ml の 5%Dextrose 含有 Trypticsoy broth (TSBD; Difco, Becton, Dickinson, Sparks, MD, USA) 培地にサブロー寒天培地から 1 コロニーの *C. albicans* を加え, TSBD 培地にて 37 で振盪培養した. *C. albicans* の培養には菌糸型を使用するため 10%ウシ胎児血清添加 RPMI1640 培地 3ml に前培養液 300 $\mu$ l を接種した. 前培養液濃度は約  $1 \times 10^6 \sim 10^7$ CFU/ml に調整し, レジン片とともに 72 時間振盪培養してバイオフィルムを形成させた.

#### (4) REDOX indicator 試験

培養後, 3 回蒸留水に浸漬して浮遊菌を取り除き, レジン片を 96 ウェルのマイクロプレートに移し, 残存菌量を REDOX Indicator (Alamar blue<sup>®</sup>, Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH, USA) 添加 RPMI 1640 培地で 18 時間, 30 時間培養時に蛍光量として測定 (EX:530, EM:590) した. 培地中の REDOX Indicator は代謝を蛍光量として測定できるので, 生存菌数を反映する.

統計解析は多群間の比較を Kruskal-Wallis で解析し, 2 群間の比較を Mann-Whitney の U 検定で解析した. 危険率は 5%未満とした (SPSS Version 14.0 J).

#### 4. 研究成果

REDOX indicator 試験による培養 18 時間後 (図 1) と 30 時間後 (図 2) のレジン片の *C. albicans* 残存菌量の測定結果を次に示す.

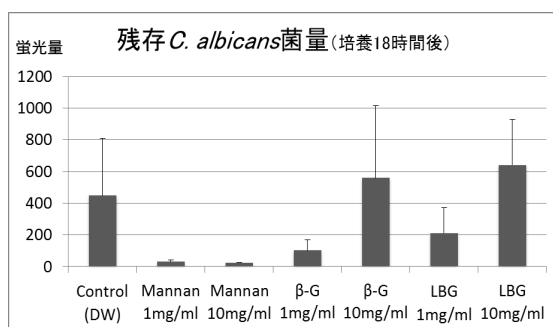


図 1. 培養 18 時間後の残存 *C. albicans* 菌量 (DW: 蒸留水, Mannan: マンナン,  $\beta$ -G:  $\beta$  グルカン, LBG: ローカストビーンガム)

培養 18 時間後 (図 1) では  $\beta$  グルカンとローカストビーンガムは濃度依存的に *C. albicans* 菌量が増加しており, 濃度 10mg/ml では対照群よりも菌量が多い傾向にあったが, マンナンでは 1mg/ml および 10mg/ml とともに菌量の増加は認められなかった.

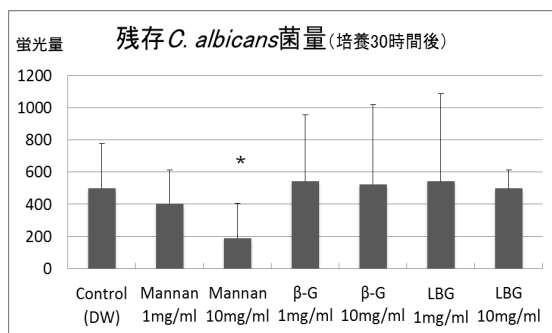


図 2. 培養 30 時間後の残存 *C. albicans* 菌量 (DW: 蒸留水, Mannan: マンナン,  $\beta$ -G:  $\beta$  グルカン, LBG: ローカストビーンガム)

培養 30 時間後の残存 *C. albicans* 菌量を図 2 に示す. マンナン 10mg/ml が最も残存菌量が少なく, 対照群の蒸留水と比較して有意差が存在した. 次いでマンナン 1mg/ml が少ない傾向を示し,  $\beta$  グルカンとローカストビーンガムについては対照群よりもわずかに菌量が多い結果となり効果は認められなかった.

以上により, 付着阻害作用はマンナンのみに効果が認められた. アドヘジン様物質である  $\beta$  グルカンとローカストビーンガムには効果が確認できなかったため, カンジダの細胞壁の構成成分であり抗真菌作用があることも確認されている甲殻類由来のキトサン (Sigma Chemical Co., MO, USA) を酢酸で濃度 10mg/ml に調整して同様の実験を試みたが, 期間内に結果を得ることができなかった.

#### <引用文献>

- Iwamoto L, Watanabe T, Ogasawara A, Mikami T, Matsumoto T. Adherence of *Candida albicans* Is Inhibited by Yeast Mannan. YAKUGAKUZASSHI 2006; 126(3):167-172.
- Shibata N, Okawa Y. Structure of Fungal Cell Wall Polysaccharides. Japanese journal of medical mycology 2006; 47(3):179-184.
- Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. Acemannan; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. J Pharmacol Sci 2009; 109(4): 525-531.
- Han Y, Cutler JE. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. Infect Immun 1995; 63(7): 2714-2719.
- Han Y, Riesselman MH, Cutler JE.

Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody. Infect Immun 2000; 68(3): 1649-1654.

## 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 薪 ( SATO, Maki )

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号 : 10712094