

短 報

ナノ銀粒子を静電吸着させたコラーゲン水解ペプチド (GX-95) の抗真菌活性

矢口 貴志¹ 滝澤 香代子¹ 田口 英昭¹
田中 玲子¹ 窪田 規² 窪田 宜昭²
窪田 正昭² 福島 和貴¹

¹千葉大学真菌医学研究センター

²株式会社 UFS 研究開発センター

要 旨

銀は、古くから細菌などの微生物に対して抗菌作用を有することが知られており、食器をはじめ歯科用充填材などに用いられている。今回、ナノ銀粒子を静電吸着させたコラーゲン水解ペプチド (GX-95) の病原真菌を中心とした真菌に対する抗真菌活性について検討した。その結果、検討したすべての菌種に対し、抗真菌活性を有することが明らかとなった。最小発育阻止濃度 (MIC) は、fluconazole, itraconazole, flucytosine 耐性株を含めた *Candida albicans* に対して 0.25–3.1 $\mu\text{g/ml}$, *Cryptococcus neoformans* に対して 0.05–0.2 $\mu\text{g/ml}$, *Aspergillus fumigatus* に対して 0.025–0.4 $\mu\text{g/ml}$, *Trichophyton rubrum* に対し 0.4 $\mu\text{g/ml}$, *Cladophialophora carrionii* に対して 0.05 $\mu\text{g/ml}$ などとなり、GX-95 は幅広く強い抗真菌活性を示した。

Key words: MIC, 銀 (silver), 抗真菌活性 (antifungal activity), コラーゲン水解ペプチド (peptidic hydrolysates from collagen), ナノ粒子 (nanometer-scale particles)

序 文

従来より、銀、銅、亜鉛等の金属イオンが細菌などの微生物に対して抗菌作用を有することが知られており、これらを利用した抗菌剤、抗菌処理技術等も多数開発されている^{1–4)}。中でも、銀は他の金属とは異なり、古くから食器をはじめ歯科用充填材などに用いられ、経験的にその安全性が推定されている。

近年、亜鉛、銀および銅などの金属イオンを無機質系の担体 (ゼオライト、多孔質セラミックス、モンモリロナイト、低分子ガラス、炭素繊維など) に担持させた無機金属系殺菌剤が開発されている^{2, 5)}。これらは、金属イオンを徐放させる機能を持たせたもので、金属イオン単独の場合に比較し高い耐熱性を有している。これら薬剤の多くには主として銀イオンが利用され、イオン交換反応、キレートおよび包接化合物などを利用して担体に担持されている。その抗菌作用は、遊離した銀イオンおよび光触媒反応により生じたスーパーオキシドアニオンラジカルとヒドロキシラジカルにより発揮される^{2, 6)}。しかし、担体から遊離した銀イオンの変色による商品価

値の低下や、銀イオンが不安定なことによる効能の低下という欠点がある。

これまで、銀イオンの抗菌、抗真菌活性に関する研究報告や、それらを応用した製品が開発されてきたが^{1–11)}、銀微細粒子の抗菌、抗真菌作用に関する研究報告はこれまでにない。そこで銀イオンの欠点を補うことが可能である銀微細粒子に着目し、その抗菌、抗真菌活性を最大限発揮させるため、ナノ銀粒子をこれまで使用されていない有機系担体であるコラーゲン水解ペプチドに静電吸着により担持させて得た新規複合化合物 (GX-95) を開発した。本論文では、この物質の病原真菌を中心とした真菌に対する抗真菌活性を検討したので、その結果について報告する。

材料と方法

銀微細粒子の担持担体 GX-95: 本化合物については現在特許申請中で、その製造の概略は以下の通りである。タンパク質コラーゲン ((株) ニッピ製) を部分加水分解して得られるペプチドに銀塩溶液を反応させて銀キレート化合物を得る。次いでこれらの光還元を行い、ペプチド基の窒素原子に van der Waals 力によりナノ銀粒子が担持した水溶性の GX-95 を製造した。電子顕微鏡による観察から GX-95 のナノ銀粒子はすべての径は 10 nm 以

別刷請求先: 矢口 貴志

〒260-8673 千葉市中央区亥鼻 1-8-1
千葉大学真菌医学研究センター

Table 1. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of GX-95 against pathogenic fungi

Fungal strain and strain number	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	48 hr	72 hr	120 hr
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	3.1		
<i>Candida albicans</i> IFM 5801	0.5		
<i>Candida dublimiensis</i> IFM 51756	0.8		
<i>Candida glabrata</i> IFM 5771	2		
<i>Candida glabrata</i> IFM 40217	2		
<i>Candida glabrata</i> IFM 46843	2		
<i>Candida glabrata</i> IFM 46888	3.1		
<i>Candida tropicalis</i> IFM 5746	2		
<i>Candida tropicalis</i> IFM 5777	2		
<i>Candida tropicalis</i> IFM 40018	2		
<i>Candida tropicalis</i> IFM 46816	0.4		
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90112		0.2	
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90113		0.05	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFM 40210	3.1		
<i>Trichosporon asahii</i> var. <i>asahii</i> IFM 48429	0.05		
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFM 41362	0.025		
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFM 47078	0.4		
<i>Aspergillus niger</i> IFM 41398	6.25		
<i>Aspergillus flavus</i> IFM 41935	0.4		
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> IFM 40951			0.8
<i>Trichophyton rubrum</i> IFM 45802			0.4
<i>Microsporum canis</i> IFM 45108			0.1
<i>Exophiala dermatitidis</i> IFM 41818	0.05		
<i>Aureobasidium pullulans</i> IFM 4802	0.1		
<i>Alternaria alternata</i> IFM 41348	0.05		
<i>Phialophora verrucosa</i> IFM 41881			0.05
<i>Cladophialophora carrionii</i> ATCC 32279			0.05

Table 2. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of GX-95 against *Candida albicans* resistant to antifungal agents

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
	GX-95	AMPH	5-FC	FLCZ	ITCZ	MCFG	MCZ
ATCC 90029 ^a	0.25	0.5	>64	0.25	0.03	≤ 0.03	0.06
IFM 46907	0.25	0.5	0.125	16	0.5-1	≤ 0.03	2-4
IFM 46908	0.25-0.5	0.5	≤ 0.125	4-32	0.125-0.25	≤ 0.03	0.5-2
IFM 46910 ^b	2	0.5	≤ 0.125	>64	>8	≤ 0.03	4
IFM 54354 ^b	1-2	0.5	0.125	>64	>8	≤ 0.03	8

AMPH=amphotericin B, 5-FC=flucytosine, FCZ=fluconazole, ITZ=itraconazole, MCFG=micafungin, MCZ=miconazole.

^a: 5-FC resistant strain. ^b: FCZ, ITZ resistant strain.

下で、平均 5 nm 程度である。

使用菌株：千葉大学真菌医学研究センター保存の菌株を使用し、Table 1, 2 にまとめた。

薬剤感受性試験：NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (現 CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute) M27-A (酵母) および M38-A (糸状菌) ガイドラインに準拠して実施した^{12, 13)}。

被検菌は試験前に新たに培養し、酵母類は滅菌蒸留水に懸濁し、 1×10^4 cells/ml に調整した。糸状菌類においては、*Aspergillus fumigatus* において界面活性剤 (0.05% Tween 80) 添加滅菌蒸留水を用いた他は、滅菌蒸留水で懸濁後、ナイロンメッシュで濾過し分子を集め $1 \times$

10^4 cells/ml に調整した。*Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora carrionii* については 3×10^4 cells/ml とした。検定は 96 well 滅菌プレートで行い、培地は Sabouraud dextrose broth (SDB) (Difco 社製) を使用し、酵母類は 35°C、糸状菌類は 27°C で培養した。判定は、Table 1 に示すとおり培養 48 時間後、72 時間後もしくは 120 時間後に実施し、被検菌の生育が認められない well の最も少ない濃度を最小生育阻止濃度 (MIC) とした。GX-95 (銀含有量 1 mg/ml) を適宜滅菌蒸留水で希釈して使用し、MIC はそれに含まれる銀微粒子の濃度に換算して表示した。各種抗真菌剤に対する MIC の測定には酵母様真菌 FP “栄研” (栄研化学

(株)製)を使用した。なお、GX-95の担体自体には抗真菌活性がないことを確認した。

結 果

GX-95の各種病原性真菌に対する抗真菌活性をTable 1にまとめた。MICは、各種*Candida*属に対して0.05–3.1 $\mu\text{g/ml}$ 、*Cry. neoformans*に対して0.05–0.2 $\mu\text{g/ml}$ など、病原酵母に対して強い抗真菌活性を示した。また、各種*Aspergillus*属に対して0.025–6.25 $\mu\text{g/ml}$ 、*Cl. carrionii*に対して0.05 $\mu\text{g/ml}$ 、*Exophiala dermatitidis*に対して0.05 $\mu\text{g/ml}$ 、白癬原因菌に対して0.1–0.8 $\mu\text{g/ml}$ となり、幅広い病原糸状菌に対しても強い抗真菌活性を示した。

さらに、*Can. albicans*のfluconazole耐性株(IFM 46910, IFM 54354)、itraconazole耐性株(IFM 46910)、flucytosine耐性株(ATCC 90029)、感受性株(IFM 46907, IFM 46908)に対するGX-95と各種抗真菌剤との抗真菌活性の比較をTable 2に示した。GX-95のMICは0.25–2 $\mu\text{g/ml}$ となり、今回同時に試験した他の抗真菌剤の中ではamphotericin Bとほぼ同等の抗真菌活性を示した。

考 察

銀粒子の有する抗菌もしくは抗真菌活性の作用機作に関する研究はこれまで行われていないが、以下のように推定される。すなわち、銀は金属の状態でも安定であり、酸化されても瞬時に還元される性質があるため、電子を放出してイオンになっても、瞬時に電子を受け取り簡単に金属に戻ってしまう。この現象が約 10^{-6} 秒で繰り返されるため、見かけ上の変化は認識されない。金属の中でも銀だけがこの特異的な性質を持っている。このように銀の表面は、常にイオン状態と金属状態の間を行き来することにより、電気的なエネルギーを有している。この電気的エネルギーが、真菌の細胞膜に影響することにより、抗真菌作用を発揮していると考えられる¹⁴⁾。

また、粒子をナノサイズにすると、電子の軌道間のエネルギーギャップが増大するため、その物質の熱力学的諸量が大きくなる現象を量子サイズ効果という。今回使用したナノ銀粒子は、その径を平均約5 nmと極限まで小さくすることにより、銀の電気的なエネルギーを最大限に高めたものであり、この効果により強い抗真菌活性を示していると考えられる。

GX-95は病原真菌に対して幅広く抗真菌活性を示した。特に、近年、臨床材料から分離されることが多く問題となっている*Can. glabrata*、*Can. tropicalis*やfluconazole、itraconazoleなどに耐性がある*Can. albicans*に対しても強い抗真菌活性を示した。このことより、短期的には、GX-95を病室もしくは一般家庭の壁紙、足拭きマットなどの素材表面に使用することにより環境からの病原真菌

の感染予防が可能となる。さらに、本物質の生体内での安全性が確認されれば、将来的には外用薬ばかりでなく、生体内に投与が可能な抗真菌薬として医薬品としての開発が期待される。

文 献

- 1) 大谷朝男: 無機系抗菌剤. 抗菌のすべて—ヘルスケアとメディカル・食品衛生・繊維・プラスチック・金属への展開—. (高麗寛紀 編), p129–134, 繊維社, 1997.
- 2) 高麗寛紀: 無機系抗菌剤の分類, 合成法, 特性および作用機構. 誰でもわかる抗菌の基礎知識. (西村民男 監修), p143–154, 株式会社テクノシステム, 1999.
- 3) 高麗寛紀: 殺菌剤の定量的構造活性相関法を用いた基礎的研究および実用化に関する研究. 防菌防黴誌 **33**: 273–285, 2005.
- 4) 高麗寛紀: 食品工場における環境汚染微生物制御のための抗菌剤の開発動向と抗菌特性. 日本食品微生物学会雑誌 **23**: 13–20, 2006.
- 5) 高麗寛紀: 無機系抗菌剤の開発の現状と将来. 無機マテリアル **6**: 428–436, 1999.
- 6) 高麗寛紀: 抗菌グッズのメカニズム. Medical Technology **28**: 1291–1295, 2000.
- 7) 高麗寛紀, 中河貴世, 山田幸生: 結晶中に銀イオンを担持したリン酸ジルコニウムセラミックスの抗菌特性. 防菌防黴誌 **21**: 77–84, 1993.
- 8) Kourai H, Manabe Y, Yamada Y: Mode of bactericidal action of zirconium phosphate ceramics containing silver ions in the crystal structure. J Antibact Antifung Agents **22**: 595–601, 1994.
- 9) 今井茂雄, 久野裕明, 前田拓也, 山田 剛, 高麗寛紀: 銀添加セラミックスの抗菌作用機構. 無機マテリアル **6**: 451–456, 1999.
- 10) Miyoshi H, Tanabe A, Maeda T, Kourai H: Visible light-induced bactericidal species generated from silver-loaded hydrogen zirconium phosphate active against *Escherichia coli* K12. Biocontrol Science **6**: 69–74, 2001.
- 11) 白井昭博, 佐久間貴子, 青木美保, 三好弘一, 前田拓也, 高麗寛紀: 銀担持アクリル繊維を含む抗菌紙の殺菌作用機構. 防菌防黴誌 **31**: 173–181, 2003.
- 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard. NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 1997.
- 13) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa, 2002.
- 14) 勝本 淳: バルスによるバクテリアの殺菌. J Plasma Fusion Res **79**: 20–25, 2003.

Antifungal Activity of the Novel Adduct, GX-95, of Silver with Nanometer-scale Particles to Peptidic Hydrolysates from Collagen

Takashi Yaguchi¹, Kayoko Takizawa¹, Hideaki Taguchi¹,
Reiko Tanaka¹, Tadashi Kubota², Yoshiaki Kubota²,
Masaaki Kubota², Kazutaka Fukushima¹

¹Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University,
1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan

²UFS Co., Ltd.

1-16-30 Higashimotomachi, Kokubunji, Tokyo 185-0022, Japan

Silver has long been known to have an antimicrobial activity against bacteria and other microorganisms, and has been used as eating utensils, as dental fillings and so on. We developed a novel adduct, GX-95, of silver with nanometer-scale particles to peptidic hydrolysates from collagen. Antifungal activity of the adduct against pathogenic yeasts and filamentous fungi was examined in terms of minimal inhibitory concentrations (MICs).

GX-95 was found to possess strong and broad antifungal activities against all fungi examined in the following MICs: 0.25 to 0.31 $\mu\text{g/ml}$ for *Candida albicans* including resistant strains to fluconazole, itraconazole and flucytosine, 0.05 to 0.2 $\mu\text{g/ml}$ for *Cryptococcus neoformans* strains, 0.025 to 0.4 $\mu\text{g/ml}$ for *Aspergillus fumigatus* strains, 0.4 $\mu\text{g/ml}$ for *Trichophyton rubrum*, and 0.05 $\mu\text{g/ml}$ for *Cladophialophora carrionii*.
