

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05632

研究課題名(和文) 光波長応答型殺菌性分子を応用した細胞・組織加工製品の無菌化技術の開発

研究課題名(英文) Development of sterilization technique based on the use of photo-sensitive bactericidal molecules for cell and tissue processed products

研究代表者

白井 昭博 (Shirai, Akihiro)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・講師

研究者番号：40380117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：光反応型化合物として天然物であるフェルラ酸(FA)を用い、紫外線-A(UV-A)との併用殺菌機構を調べた。UV-A照射下においてFAは、グラム陰性・陽性菌に対して高い殺菌力を示した。同条件で脂質過酸化レベルは有意に上昇し、細胞損傷を表すPI蛍光レベルも上昇した。CTC反応による呼吸活性は、FAと接触させることにより無処理の細胞と比較して減少した。従って、FAは細胞表面に吸着後、UV-A照射下で酸化的破壊を引き起こすことが示唆された。ポリヒドロキシメチルメタクリレートの主鎖とするFA分岐ポリマーを合成した。その分子量を約15000とする化合物10は、遊離FAに匹敵する抗微生物活性を示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated photobactericidal action of the combination of ferulic acid (FA) and ultraviolet-A (UV-A). The combination resulted in significant bactericidal activity against gram-negative and -positive bacteria. The lipid peroxidation level increased after the same treatment as described above. The PI fluorescence level, which represents the increase in permeability of cell membrane and its damage, also elevated. In the dark, the CTC fluorescence level on the basis of the respiratory activity of bacterial cells showed a 16% reduction after FA treatment, as compared with untreated cells. These results suggested that the photobactericidal action is due to adsorption of FA onto the bacterial membrane, followed by oxidative disruption. We synthesized three hydroxyl methacrylate polymers conjugated with FA at the side chain. Compound 10, possessing 15,000 as molecular weight, showed high bactericidal activity, which was comparable to free FA, corresponding to FA amount in the polymer.

研究分野：微生物学

キーワード：光殺菌 フェノール酸誘導体 活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞は、患者やドナーの細胞、組織を採取し、遺伝子導入によるリプログラミングにより作製される。その後、目的の細胞・組織加工製品を得るために細胞の樹立、維持、増幅、分化誘導という多くのステップを踏む。このように複雑な細胞加工・製造で危惧されることは、細胞・組織由来のウイルス、細菌、真菌による感染の伝播・拡大である。患者のヒト細胞・組織に由来する iPS 細胞は、既にウイルス、細菌、真菌に汚染されている可能性は高い。そしてその汚染に起因し、細胞培養の工程において感染の伝播の危険性がある。ヒトあるいは他の動物から調製・製造される血清、成長因子などの使用が、細胞の活性化や増殖のために避けられない場合、そのような製剤の使用を介し、ウイルスやマイコプラズマを含む微生物、異常プリオンなどに汚染される危険性がある。さらに、細胞の増殖や目的細胞に分化させるためのフィーダー細胞からのコンタミネーションの危険性も高い。従って、世界をリードする再生医療分野の産業化に向けては、適切な微生物の不活化法・除去法により、感染の伝播・拡大を未然に防ぎ、細胞・組織製品の滅菌安全性が保証される製造ラインの確立が大命題である。

2. 研究の目的

再生医療、細胞治療の産業化に向け、iPS 細胞を利用した細胞・組織加工製品の研究開発が日進月歩で進んでいる。しかし、細胞・組織の加工そして製造において最も危惧されることは、細胞・組織由来のウイルス、細菌、真菌による感染の伝播・拡大である。本研究は、一般的に放射線耐性を示すウイルスの不活化に焦点を当て、ウイルス感染細胞に特異的抗生物活性を示す光波長応答型殺菌性分子を応用した光線力学的滅菌技術の構築を目的とする研究である。

3. 研究の方法

(1) 近紫外光源となる LED の放射スペクトルと放射強度の測定

光反応型化合物を用いた微生物殺菌に使用する近紫外線は、LED 照射装置を用いた(図 1)。その放射スペクトルは、マルチチャンネル分光検出器(MCPD-370A、大塚電子株式会社)を用い、照度はレーザパワーメーター(NVA、OPPHIR)で測定した。

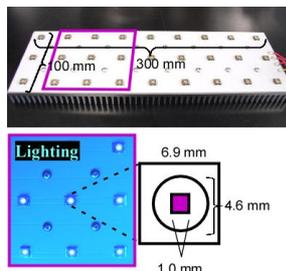


図 1 LED 照射装置の外観

(2) 試験菌株

全ての試験菌 (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Kocuria rhizophila*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Sporolactobacillus inulinus*) は、NBRC、ATCC 機関から購入した。

(3) UV-A を用いた抗微生物試験

S. inulinus は MRS 培地 (37 °C、微好気条件)、*A. acidoterrestris* は No.323 培地 (文献) それら以外の細菌は LB 培地 (37 °C) で前培養を行った。微生物を前培養後、 $6570 \times g(4 \times)$ で集菌および滅菌水で洗菌し、滅菌イオン交換水で再懸濁した。48 well plate に 2×10^6 CFU/ml の菌液 0.99 ml を分注し、化合物溶液を所定の濃度になるように添加した。試験プレートは 30 分の培養庫内に移動し、UV-A 照射はプレート下方から上方に向けて行い、プレート底面での照度は 8.58 mW/cm^2 であった (図 2)。残存生菌数は、試験溶液を 0.7% Tween 80 入り生理食塩水で 10 倍段階希釈し、各希釈液 100 μl を微生物の培養に適した寒天培地に塗布し、コロニーカウント法で決定した。殺菌力は下記式から求めた。

$$\text{Log survival ratio} = \log(N_t/N_0)$$

N_0 : 初発生菌数 (CFU/ml)、 N_t : 処理時間後の生菌数 (CFU/ml)

全ての実験は 3 回実施し、平均値 \pm SD で表す。

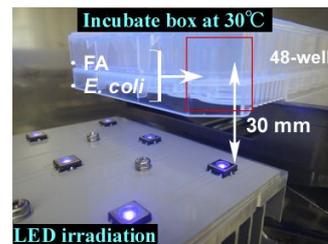


図 2 UV-A LED を使用した抗微生物試験

(4) UV-A 光反応物質フェルラ酸による殺菌機構の解明

脂質過酸化測定

脂質の過酸化は、TBARS アッセイ (TBARS Microplate Assay Kit, Oxford Biomedical Research) により測定した。前培養した大腸菌を PBS(-) で 3×10^9 cells/ml に 24 well plate に調製し、フェルラ酸 (FA) 100 mg/l と UV-A 1 J/cm^2 (1.9 min incubation) で処理後、測定キットに準じて試料調製した。脂質過酸化度は、 10^9 cells あたりの MDA equivalent で表した。

DAPI/PI 染色

前培養した大腸菌を PBS(-) で 3×10^8 cells/ml に 48 well plate に調製し、FA 1000 mg/l と UV-A (2 or 8 J/cm^2 (3.9 or 16 min

incubation) で処理した。PBS(-)で100倍希釈後、DAPI染色(5 min, 37 °C, 終濃度 1 mg/l, Bacstain DAPI solution)し、続けてPI染色(5 min, 37 °C, 終濃度 1 mg/l, Bacstain PI solution)した。染色細胞は、FC (BD FACSVerse) で解析した。

CTC 染色

前培養した大腸菌を PBS(-) で 3×10^8 cells/ml に 48 well plate に調製し、FA 1000 mg/l と UV-A (2 J/cm² (3.9 min incubation)) で処理した。6500 × g (3分, 20 °C) で集菌し、PBS(-) 0.2 ml に再懸濁した。CTC 染色は、Bacstain CTC rapid staining kit を使用し、所定の濃度になるように試薬を加え、37 °C で 30 分間反応させた。PBS(-) で 10 倍希釈後、CTC formazan 染色細胞を FC で解析した。

プラスミド DNA 破壊活性

プラスミド DNA (PUC19, 2.7 kb) で形質転換した *E. coli* XL1 Blue を使用した。UV-A と FA で細胞を処理後、loading buffer と PCI 溶液でプラスミド抽出を行い、10%アガロースゲルで泳動した。泳動後、エチジウムブロミドと反応させ泳動バンドの検出を行った。

(5)FA 分岐型ポリマーの合成

フェルラ酸を分岐させたメタクリル酸ポリマーの合成は、下記の経路で行い、最終化合物 Poly-HEMA-FA を得た (図3, 文献 [10])。ポリヒドロキシメチルメタクリレート (poly-HEMA; 4, 5, 6) は、AIBN を用いたラジカル重合反応により得た。また、AIBN の反応モル%は、1, 4, 8 mol% とし、分子量の異なるポリマーを得た。Poly-HEMA 分子量は、TSK-GEL カラム (Tosoh) を使用し、標準物質 PEG を基準物質として、Mp (分子量ピーク) を求めた。合成経路における未反応物からのポリマー(7, 8, 9)の精製は、Sephadex LH-20 (GE Healthcare) カラムで行った。

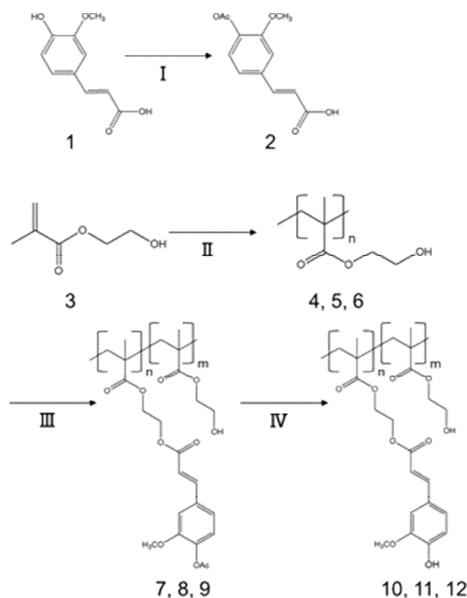


図3 Poly-HEMA-FA 合成経路

() ピペリジン (10%), CH₂Cl₂, r.t., 4 h;

() HEMA, AIBN, methanol, 60 °C, 20 h; () AcFA, poly-HEMA, WSCI, DMAP, AN (MS 乾燥済み), 20 h; () 35%ヒドラジン, methanol, r.t., 30 min

4. 研究成果

(1)光反応物質フェルラ酸の抗微生物特性

UV-A 併用殺菌力

図4は、FA 濃度 100 mg/l、UV-A 照射エネルギー量 1.0J/cm² とした殺菌活性を示している。FA の併用殺菌力は、グラム陰性菌 (*E. coli*, *S. enterica*) およびグラム陽性菌 (*S. aureus*, *B. cereus*, *K. rhizophila*, *S. inulinus*) に対し幅広く示すことが分かった。しかしながら、グラム陰性菌と比較してグラム陽性菌に対する併用殺菌力は少し低い傾向を示し、グラム陽性菌である *A. acidoterrestris* に対しては、その殺菌力は 2.20-log の減少に止まった。これは、グラム陽性菌への FA の低い吸着性に起因するのかもしれない文献 [11]。一方、無照射での FA 処理、および UV-A 処理のみにおける生菌数の減少は、*S. inulinus* を除いてほとんど認められなかった。以上の結果より、UV-A 照射下でフェルラ酸を添加することにより、相乗効果が得られることが分かり、その高い殺菌力は、低濃度の FA と短時間での UV-A 照射を併用することで生ずることが分かった。

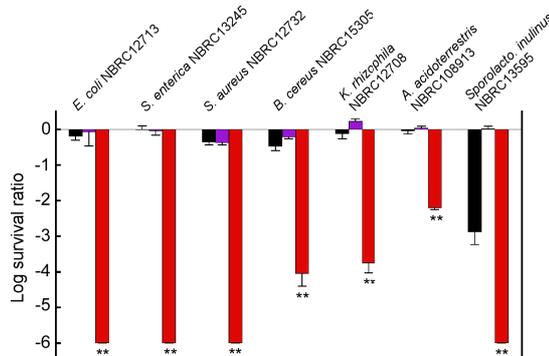


図4 細菌7菌株に対する UV-A と FA の併用殺菌力

Black, FA(無照射); purple, UV-A 処理; red, UV-A + FA 併用処理. Log S が 10 CFU/ml 未満 (検出限界以下) の場合、6-log reductions とした。**P<0.01 は、菌株ごとの UV-A 照射処理サンプルとの比較である。

脂質の過酸化

図5(A)のように、併用殺菌力が認められない条件 (FA 100 mg/l + UV-A 1 J/cm²) において、脂質過酸化度を測定した。その結果、併用条件においてのみ過酸化度の有意な上昇を認められた (図5(B))。従って、併用処理の初期段階で脂質の過酸化反応が生じていることが示唆され、その反応が併用殺菌における第一段階の反応であると考えられた。そして、さらに酸化反応が進行することにより、細胞損傷が生じると考えられた。

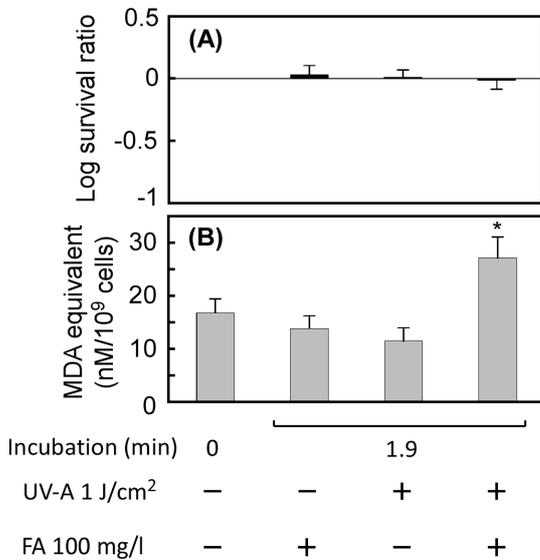


図5 *E. coli* に対する殺菌力 (A) と脂質過酸化度 (B) の関係
* $P < 0.05$ は、コントロールとの比較を表す。

細胞膜透過性

FA と UV-A で処理した大腸菌を DAPI/PI 染色後、FC で解析し、PI 相対蛍光量を図 6 (B) に示した。4.8- \log 殺菌を生じる併用殺菌条件 (FA 1000 mg/l + UV-A 8 J/cm², 図 6 (A)) における PI 相対蛍光量は、コントロールと比較して 2.5 倍上昇した。低殺菌力であった 2 J/cm² と比較すると、PI 相対蛍光量は著しく上昇し、殺菌の程度に依存して細胞膜の透過性が上昇、すなわち細胞膜の損傷が起こることが示唆された。UV-A 8 J/cm² のみの処理においても、PI 相対蛍光量は有意に上昇したが、併用時との差は明らかであった。

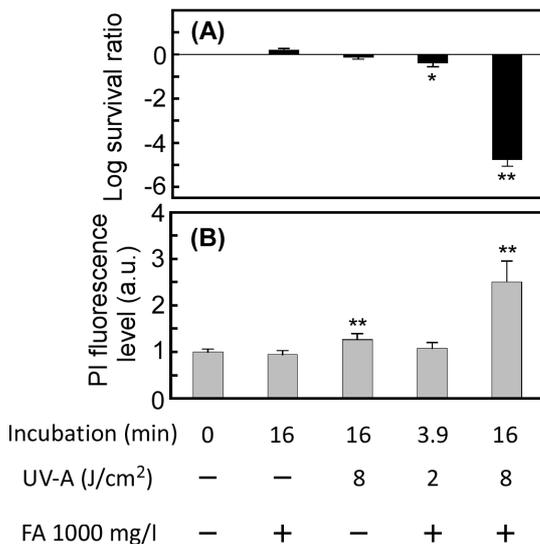


図6 *E. coli* に対する殺菌力 (A) と PI 相対蛍光量 (B) の関係
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ は、コントロールとの比較を表す。

CTC 呼吸活性

有効な併用殺菌力を示さない条件 (log S

< -0.4 , データ省略) において、FC 解析の結果、CTC formazan 蛍光がコントロールと比較して 16%減少し、無照射での FA 処理においても同様に 16%減少を示した (図 7)。従って、1000 mg/l での細胞処理により、呼吸活性または電子伝達系活性の低下が示唆された。

FA と同様、フェノール性 OH 基を有するレスベラトロールは、最小発育阻止濃度 (MIC) で細菌を処理することにより、CTC formazan 蛍光をコントロールと比較して 44%減少させ、そして MIC 以上の濃度ではそれ以上の有意な蛍光減少を示さなかった (文献)。本 CTC アッセイで用いた FA 濃度は 2×10^5 cells/ml に対する MIC である (文献)。従って、CTC アッセイでの試験細菌濃度において、増殖遅延効果を示すかもしれない。そしてその現象は、細胞の呼吸活性または電子伝達系活性に何らかの変化を生じるであろう。CTC は、呼吸活性または電子伝達系活性で生産される NADH により還元され脂溶性 CTC formazan となり、細胞膜表面や細胞膜内に沈着する。細菌においては、それら活性に関連する酵素群は細胞膜に局在しているので、CTC 反応は、細胞表面もしくは細胞膜内で生じると考えられる。従って、本試験結果における蛍光減少は、FA が細胞表面に吸着し、細胞内に取り込まれたことによる細胞の生理活性の変化を示していると考えられる。

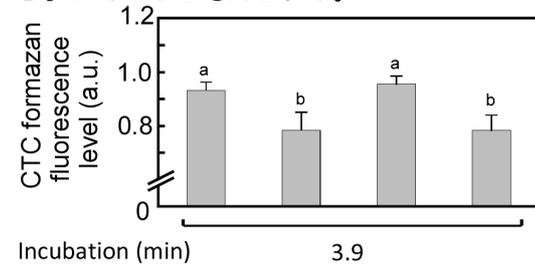


図7 FA と UV-A 処理による *E. coli* の CTC 反応の変化
異なるアルファベット間で $P < 0.05$ を表す。

DNA 構造破壊活性

FA と UV-A 処理による DNA 構造への影響を調べるために、PUC19 ベクターで形質転換した *E. coli* を用い、その構造変化を電気泳動によるバンド検出位置で確認した。図 8 (A) のように殺菌活性が照射エネルギー量に依存して上昇する条件における PUC19 由来バンドの検出強度を (B) に示し、泳動写真を (C) に示した。その結果、殺菌力の上昇に依存することなく、PUC19 ベクターのバンド検出強度は変化せず、そして検出サイズも変化はなかった。従って、FA と UV-A の併用殺菌は、DNA 構造を破壊することなく死に至らしめることが推測された。

これまでの結果をまとめて考察すると、この殺菌メカニズムは、CTC formazan 蛍光の減少と殺菌処理の初期段階で過酸化反応が顕

著に起こっていることから、第一段階は、FAの細胞膜への吸着そして取り込みによる細胞膜での過酸化反応であると考えられた。次に、細胞膜等の過酸化作用の進行により、細胞膜が損傷することが示唆され、細胞死に大きく寄与する現象であると考えられた。一方で、その酸化作用によりDNA破壊が起こっていないことから、細胞膜、細胞質での酸化的作用が細胞死の致命傷となっていることが推測された。

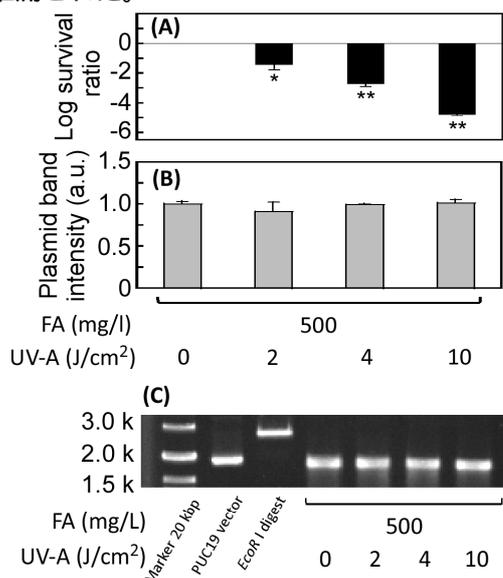


図8 形質転換 *E. coli* に対する殺菌力とプラスミド DNA 性状の関係 (A), 形質転換大腸菌に対する殺菌力; (B), PUC19 に由来する検出バンドの強度; (C), 電気泳動像 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ は、コントロールとの比較を表す。

(2) 光反応型 poly-HEMA-FA の物性および抗微生物活性

Poly-HEMA の分子量

合成した Poly-HEMA の Mp を表 1 に示した。この結果より、分子量ピークの異なる 3 種類のポリマーが合成できたことが分かった。

表 1 Poly-HEMA の AIBN 反応量と Mp の関係

化合物 No.	AIBN (mol%)	Mp
4	1	14,989
5	4	7,277
6	8	5,841

Poly-HEMA-FA の FA 含有量

poly-HEMA-FA をアルカリ加水分解することし、遊離した FA に由来する吸光度からその濃度を決定した。各 poly-HEMA-FA (10, 11, 12) の FA 含有率を表 2 に示した。化合物 11 は、10 と 12 に比較して少し FA 含有量が低いことが分かった。

表 2 Poly-HEMA-FA の FA 含有量

化合物 No.	FA 含有量 (wt%)
10	6.0
11	5.0
12	6.2

Poly-HEMA-FA の光応答抗微生物活性

Poly-HEMA-FA 濃度は 100 mg/l、UV-A 照射は 10.47 mW/cm² として 19 J/cm² 照射した。その結果 (図 9)、化合物 11、12 の *E. coli* に対する併用殺菌力は共に約 1.2-log 減少を示し、Mp の差による殺菌力の変化は認められなかった。また、11、12 の併用殺菌力は UV-A 照射のみの殺菌力とほぼ同じであり、ポリマーの FA 含有濃度と同程度の遊離 FA (6 mg/l) の併用殺菌力 (1.9-log 殺菌) よりも低いことが分かった。一方、化合物 10 は、11 と 12 よりも有意に殺菌力は高く、遊離 FA (6 mg/l) と有意差のない殺菌力を示した。さらに、化合物 10 と 12 の無照射条件での殺菌力に差があり、高分子量の 10 は低毒性であることが示唆された。

以上の結果より、FA の UV-A 光応答による抗微生物活性は、ポリマーに分歧させた構造においても有していることが分かり、その効果は高分子量ポリマーに分歧することにより顕著となることが示唆された。さらに、分子量の増加に伴う低毒性傾向は、分子設計において有用な知見であると考えられた。

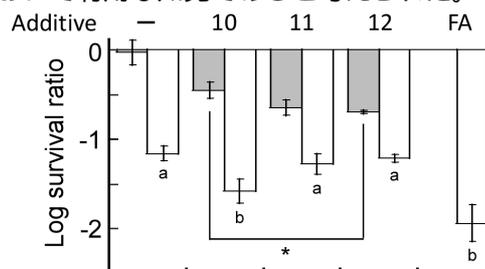


図 9 *E. coli* に対する UV-A と poly-HEMA-FA の併用殺菌力

Gray, 無照射; white, UV-A + poly-HEMA-FA 併用処理

* $P < 0.05$, 異なるアルファベット間で $P < 0.05$ を表す。

< 引用文献 >

NBRC, National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center. Medium detail information. Available at: <http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/NBRCMediumDetailServlet?NO=323>. Accessed on 26 May. 2018.

Jae-Sun K. et al., Synthesis and Characterization of methacrylate-based copolymers for integrated optical applications, Chem. Mater., 14, 5030-5036 (2002).

Etrych T. et al., N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide-based polymer conjugates with pH-controlled activation of doxorubicin. i. new synthesis, physicochemical characterization and preliminary biological evaluation, *J. Appl. Polym. Sci.*, 109, 3050-3061 (2008).

Chytil P. et al., New HEMA copolymer-based drug carriers with covalently bound hydrophobic substituents for solid tumour targeting, *J. Control. Release* 127, 121-130 (2008).

Etrych T. et al., Synthesis of HEMA copolymers containing doxorubicin bound via a hydrazone linkage. effect of spacer on drug release and in vitro cytotoxicity, *Biosci. Macromol.*, 2, 43-52 (2002).

Sundhoro M. et al., Poly(HEMA-co-HEMA-PEPA): Synthesis and preparation of stable micelles encapsulating imaging nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.*, 500, pp.1-8 (2017).

Nakamura, K. et al., Bactericidal activity and mechanism of photoradiated polyphenols against gram-positive and-negative bacteria, *J. Agric. Food Chem.* 63, 7707-7713 (2015).

Ferreira, S., et al., Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*: activity and effect on cellular functions, *Int. J. Food Microbiol.*, 180, 62-68 (2014).

Shirai A. et al., Inactivation of foodborne pathogenic and spoilage microorganisms using ultraviolet-A light in combination with ferulic acid, *Lett. Appl. Microbiol.*, 64, 96-102 (2017).

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)

Akihiro Shirai, Takashi Watanabe and Hitoshi Matsuki, Inactivation of foodborne pathogenic and spoilage microorganisms using ultraviolet-A light in combination with ferulic acid. *Lett. Appl. Microbiol.*, 査読有, Vol.64, No.2, 96-102, 2017.

DOI : org/10.1111/lam.12701

機関リポジトリ
<http://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/ja/list/t-authors/M/10775/item/111085>

Akihiro Shirai, Masato Kajiura and Takeshi Omasa, Synergistic photobactericidal activity based on ultraviolet-A irradiation and ferulic acid derivatives. *Photochem. Photobiol.*, 査読有, Vol.91, No.6, 1422-1428, 2015.

DOI : org/10.1111/php.12507 .

Akihiro Shirai, Masato Kajiura, Kyohei Matsumura and Takeshi Omasa, Improved photobactericidal activity of ultraviolet-A light in combination with isomerizable p-coumaric acid derivatives. *Biocontrol Sci.*, 査読有, Vol.20, No.4, 231-238, 2015.

DOI : org/10.4265/bio.20.231 .

[学会発表](計 12件)

白井 昭博, 國見 明加, 横田 優子, フェルラ酸と紫外線-A の併用殺菌機構, LED 総合フォーラム 2018 in 徳島 論文集, Vol.P-15, 113-117 頁, 2018 年 2 月(徳島県徳島市).

Akihiro Shirai, Yokota Yuko, Bactericidal action of UV-A light irradiated ferulic acid, 4th World Congress and Expo on Applied Microbiology, Vol.9, No.6, 114, Madrid (スペイン), Nov. 29, 2017.

白井 昭博, 國見 明加, 紫外線-A 照射におけるフェルラ酸の殺菌機構の解明, 日本防菌防黴学会第 44 回年次大会要旨集, 2017 年 9 月(大阪府豊中市).

坂東 陽介, 長宗 秀明, 白井 昭博, 紫外線-A 反応分子であるフェルラ酸を用いたフェノール酸誘導体の合成とその殺菌特性, 日本防菌防黴学会第 44 回年次大会要旨集, 2017 年 9 月(大阪府豊中市).

白井 昭博, 渡部 貴志, 松木 均, フェルラ酸と紫外線(UV-A)の併用による食品媒介病原性微生物および食品腐敗微生物の不活化, LED 総合フォーラム 2016 in 徳島 論文集, No.P-9, 145-150 頁, 2016 年 12 月(徳島県徳島市).

白井 昭博, 渡部 貴志, 松木 均, 紫外線(UV-A)殺菌におけるフェルラ酸の併用効果, 日本防菌防黴学会第 43 回年次大会, 2016 年 9 月(東京都品川区).

Akihiro Shirai, Takashi Watanabe and Hitoshi Matsuki, Effect of ferulic acid addition on the photobactericidal activity of ultraviolet-A light against food-borne pathogenic and spoilage microbes, IV International Conference on Antimicrobial Research (ICAR2016), p.149, Torremolinos-Malaga (スペイン), Jun. 2016.

白井 昭博, 梶浦 雅斗, 大政 健史, フェルラ酸とその誘導体を用いた近紫外光殺菌とその殺菌機構, LED 総合フォーラム 2015 in 徳島 論文集, No.P-7, 109-112 頁, 2015 年 12 月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 昭博 (SHIRAI, Akihiro)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部・
生物資源産業学域・講師

研究者番号 : 4 0 3 8 0 1 1 7