

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11877

研究課題名(和文)放電プラズマ法により新規合成された高純度過ギ酸における抗微生物活性の検証

研究課題名(英文)Antimicrobial activity in high-purity performic acid newly synthesized by discharge plasma

研究代表者

高橋 一也 (Takahashi, Kazuya)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10236268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：様々な医療現場のニーズに対処するため、安全かつ殺滅効果の高い新規消毒薬の開発が求められている。放電プラズマ(WS-DBD法)により作成された高純度過ギ酸は、そのpHが中性であることや化学合成過ギ酸に比べて安定に保存可能であることが報告されている。我々は、まず化学合成過ギ酸が唾液細菌に対して、既存の消毒薬に比べ非常に高い殺菌効果をもつことを明らかにした。また、高純度過ギ酸はミュータンスレンサ球菌などに高い殺菌効果をもつことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の遂行により、化学合成過ギ酸の唾液細菌に対する殺菌効果が明らかとなった。また、新規生成が可能となった高純度過ギ酸について、初めて細菌に対する殺滅効果を検証した。一方、薬剤の安定性や細菌毎にその効果が異なるなど問題点もあぶり出すことができた。今後の継続的な研究により、内視鏡や印象材の消毒(化学滅菌)、一般消毒薬、洗口剤などの研究開発シーズとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to meet medical needs, it is required to develop new safe and highly effective disinfectants. It has been reported that high-purity performic acid prepared by discharge plasma (WS-DBD method) has a neutral pH and can be stored more stably than chemically synthesized performic acid. We first demonstrated that chemically synthesized formic acid has a very high bactericidal effect against salivary bacteria compared with existing disinfectants. Moreover, it was shown that high-purity performic acid has a high bactericidal effect on *Streptococcus mutans*.

研究分野：高齢者歯科学

キーワード：歯学 消毒薬 細菌 口腔マイクロバイオーーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

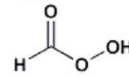
1. 研究開始当初の背景

歯科を含め医療現場では、様々な用途別に「その時点で最適とされる」消毒剤が選択され使用されている。どの用途においても殺微生物活性が最高の薬剤を使用するのが理想であるが、現実問題として、生体毒性、残留毒性、アレルギー、揮発性、腐食性、持続性から価格に至るまで、最適な消毒剤を選択するために様々な問題点を理解し、最良の決断を下す必要がある。また新たな問題点の出現やニーズが時々刻々と変化することから、常にそれに対処するための新規消毒薬の開発が求められ続けているのが現状である。

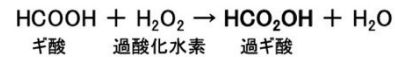
例えば、最近報道で問題視されている歯科診療チェア給水系のバイオフィルム汚染、アルジネート印象材の消毒に関して高水準消毒薬の適用が待たれている。内視鏡やその他医療器具の消毒には従来からグルタラル製剤が使用されてきたが、グルタラルの芽胞や抗酸菌に対する殺菌速度の遅さやアレルギー等の問題から、それに代わる薬剤の開発が望まれてきた。フタルールや過酢酸などがその有力候補として期待されているが、これらも残存毒性が強く、化学熱傷やショック症状が生じた例などが報告されている。またこれらから発せられる蒸気は粘膜を刺激し、取り扱いには換気に対する配慮が必要となる。

最近、放電プラズマ(WS-DBD法)を使用し高純度の過ギ酸(以下「高純度過ギ酸」と呼ぶ)を作成する方法が開発され(図1c)、2015年に論文発表された。化学合成ではない本法は、生成後の溶液が中性でギ酸が含まれず、加えて以前から知られていた化学合成過ギ酸の有用な特徴を多く残していることが明らかとなった。我々は、この高純度過ギ酸が医療の様々な用途で利用できる可能性があると考え、本研究を始めるに至った。

(a) 過ギ酸の構造式



(b) 化学合成



(c) プラズマ放電による合成(新規報告)

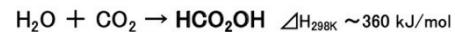


図1. 過ギ酸の構造式と合成法

2. 研究の目的

化学的に合成された過ギ酸は、強酸性で残留毒性の強いギ酸を含むため、高い殺菌活性を示すにも関わらず医療現場にあまり普及していない。放電プラズマ(WS-DBD法)によって新規に合成可能となった高純度過ギ酸は、溶液中にギ酸を含まず中性を示すが、最近作成法が開発されたことから、その殺菌特性についてはほとんど明らかになっていない。本研究では、化学合成過ギ酸と高純度過ギ酸の殺微生物活性を多面的に検証し、将来的な医療現場での使用の可能性を探った。

具体的には、(1) 殺芽胞、殺抗酸菌活性を検証することで、化学合成過ギ酸と高純度過ギ酸が高水準あるいは中水準消毒薬相当の殺菌力を示す条件を探索する。(2) 口腔細菌を含め種々の細菌、真菌、ウイルス、バイオフィルムに対する殺滅活性を解明することで、本薬剤の広範囲な殺微生物活性を明らかにする。(3) DNA解析手法を用いることにより本薬剤の抗菌スペクトラムを解析し、殺菌特性や低濃度洗口剤としての応用の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 化学合成過ギ酸の調製

1.1 mLのギ酸(85% [w/w])を0.1 mLの硫酸(95%)と混合し、この混合物0.63 mLに0.27 mLの脱イオン水と1.1 mLの過酸化水素(35% [w/w])を加え、20のピーズバスで10分間インキュベートすることで化学合成過ギ酸を調製した。得られた溶液は定量化の後、速やかに実験に使用した。

(2) 高純度過ギ酸の調製

最近、川崎らによって開発されたプラズマ誘起化学プロセス(WS-DBD; 水封誘電体バリア放電)(Kawasaki et al., Scientific Reports, 5, 14737, 2016)に従って大気圧下で二酸化炭素(CO₂)ガスと水から高純度過ギ酸を調整した。

(3) 過ギ酸の定量

過ギ酸の濃度は、Chhetriらによって記述された方法に従いABTS(2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid])を用いて算出した。Active-Cl Test(Wako)で調製した350 μLのABTS溶液(1 mg/mL)を350 μLの1 M酢酸(NaOHでpH 3.5に調整)と混合した。この混合物を350 μLのPFAサンプルに加え、20分間発色させ、吸光度(405 nm)を測定し、6.74 mg L⁻¹ Abs⁻¹にて再計算した。

(4) 細菌感受性アッセイ

健康な被験者から刺激なしで収集された唾液を使用してPFAの殺菌活性を検証した。このプロトコルは大阪歯科大学医の倫理委員会(承認番号 110864)によって承認され、被験者は同意書に署名した上で実験に参加した。被験者は唾液採取の前に少なくとも2時間は飲食を控え、2 mLの唾液を滅菌プラスチックチューブに収集し、ピペティングにより唾液を均質化した。唾液の段階希釈後、サンプル20 μLを80 μLのさまざまな濃度のPFA(8×10⁻⁴~8×10⁻⁶% [w/v])または過酸化水素(31.6~9×10⁻²% [w/v])と混合し、室温で1~5分間インキュベートした。殺菌反応液は、リン酸緩衝生理食塩水で100倍に希釈し、変法GAM嫌気性培地寒天(ニッスイ製薬)上に直ちに広げた。プレートを37で48時間好氣的に保存し、得られたコロニーをカウントし、

コロニー形成単位 (CFU) / mL として表した。細菌細胞の生存率は、BacTiter-Glo Microbial Cell Vi-ability Assay でも測定した。

4. 研究成果

(1) 合成過ギ酸の安定性評価

化学合成過ギ酸は不安定な化学物質であるため、保存条件によって分解する可能性があり各実験の直前に過酸化水素とギ酸を混合して調製する必要がある。過ギ酸のより安定した条件下での殺菌有効性を確認するために、オンサイト合成過ギ酸の濃度を60分間観察した。希釈されていない過ギ酸ストック溶液の場合、過ギ酸の濃度は60分で5.3から6.68 g/Lに1.26倍に徐々に増加した(図2)。対照的に、800倍に希釈された過ギ酸の濃度は、5.3から3.77 g/Lに徐々に減少した。1.1倍に希釈した過ギ酸は60分間にわたって有意な濃度の変化を示さなかったため、以下の実験の原液としてこの濃度を選択した。

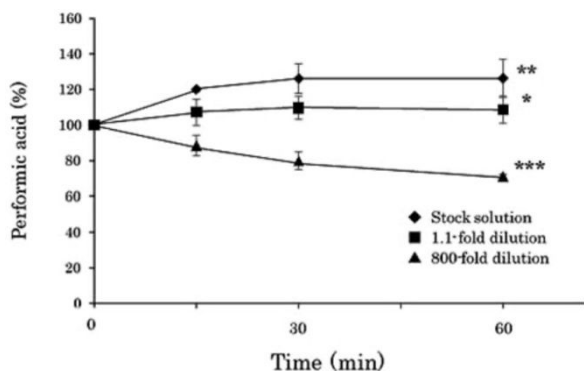


図2. 過ギ酸の安定性評価

(2) 化学合成過ギ酸による唾液細菌に対する殺菌効果

唾液細菌に対する化学合成過ギ酸による殺菌効果について、まずコロニー形成アッセイで評価した。採取した唾液サンプルをさまざまな濃度の過ギ酸と混合し、室温で1~5分間インキュベートし、変法 GAM 寒天に播種した。わずか1分の曝露後でも、PFAは唾液細菌に対して強い殺菌効果を示し、 $8 \times 10^{-4}\%$ および $8 \times 10^{-6}\%$ (w/v) の濃度でそれぞれ細菌コロニーの99.9%以上および67.1%が抑制された。 $8 \times 10^{-6}\%$ (w/v) 過ギ酸の場合、インキュベーションを5分間延長することにより、この効果は85%に向上した(図3)。コントロールの過酸化水素を用いて実験した場合、同等の殺菌活性を得るには比較的高濃度が必要であり、31.6% (w/v) 過酸化水素と $9 \times 10^{-2}\%$ (w/v) 過ギ酸で95%と27.5%の殺菌効果が観察された(図4)。殺菌活性は、細菌細胞によって生成されたATPの定量化によっても評価した。過ギ酸と過酸化水素は両方とも唾液中の細菌の濃度依存的な殺菌を示したが、殺菌活性を示す濃度は過ギ酸の方が低かった。

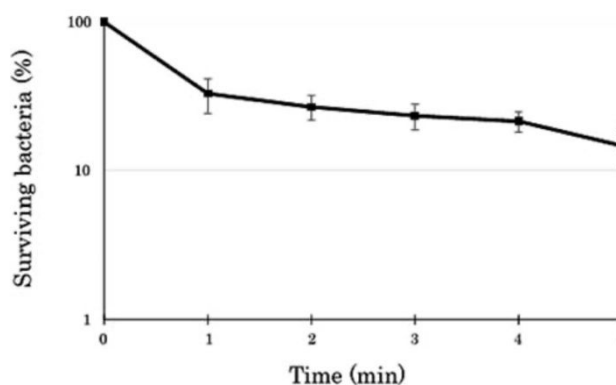


図3. 過ギ酸による時間依存的殺菌効果

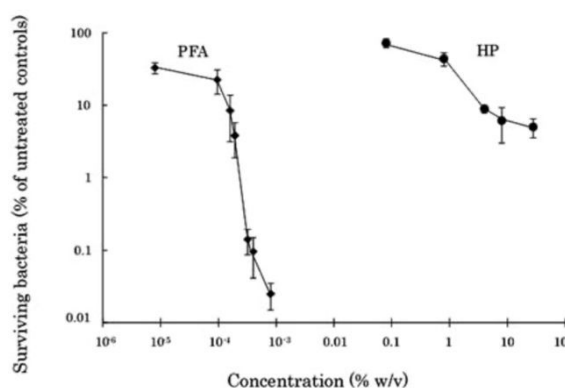


図4. 過ギ酸と過酸化水素による殺菌効果の比較

(3) 高純度過ギ酸による殺菌効果の検証

高純度過ギ酸の殺菌力に関する知見はほとんど得られていないことから、その特性を調べるために大腸菌を用いて殺菌活性の検証を行った。まずディスク法による実験の結果、同濃度の過酸化水素と同程度の殺菌効果を示すことを明らかにした(図5)。その一方、ミュータンスレンサ球菌に対する殺菌効果を確認

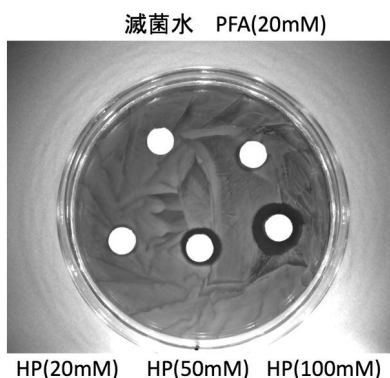


図5. 過ギ酸と過酸化水素の殺菌効果

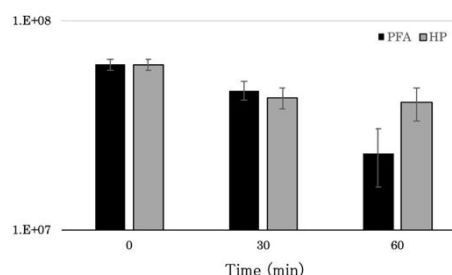


図6. ミュータンスに対する殺菌効果

その一方、ミュータンスレンサ球菌に対する殺菌効果を確認

したところ、大腸菌と異なり、過酸化水素と比較して著しく高い殺菌効果が確認できた(図6)。この様にターゲット細菌毎に感受性が異なる可能性が出てきたことから、口腔バイオフィルム *in vitro* 殺菌評価系を構築し、高純度過ギ酸が特異的に殺菌する口腔細菌群の網羅的同定を進めているところである。今後、結果がまとまり次第、学会発表と論文発表を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroki Morioka, Takayuki Nambu, Kazuya Takahashi	4. 巻 52
2. 論文標題 Bactericidal effect of performic acid on salivary bacteria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 11～15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mugita Naho, Nambu Takayuki, Takahashi Kazuya, Wang Pao-Li, Komasa Yutaka	4. 巻 82
2. 論文標題 Proteases, actinidin, papain and trypsin reduce oral biofilm on the tongue in elderly subjects and in vitro	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 233～240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2017.04.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuzukibashi Osamu, Uchibori Satoshi, Kobayashi Taira, Umezawa Koji, Mashimo Chiho, Nambu Takayuki, Saito Masanori, Hashizume-Takizawa Tomomi, Ochiai Tomoko	4. 巻 134
2. 論文標題 Isolation and identification methods of Rothia species in oral cavities	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 21～26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2017.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T Kobayashi, S Uchibori, O Tsuzukibashi, C Uezato, H Goto, C Mashimo, T Nambu, K Umezawa, M Ohta	4. 巻 4
2. 論文標題 Primer Design for the Identification of Ten Oral Actinomyces Species Using Multiplex PCR	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Dentistry and Oral Health	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） http://dx.doi.org/10.16966/2378-7090.249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masago A, Maruyama H, Nambu T, Mashimo C, Takahashi K
2. 発表標題 Influence of tongue brushing on oral microbiome diversity
3. 学会等名 日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南部隆之
2. 発表標題 口腔細菌パターンを“健康型”へと変える試み
3. 学会等名 日本歯科保存学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南部隆之，真下千穂，円山由郷，吉川一志，山本一世，沖永敏則
2. 発表標題 紫色LED 照射によるプラーク菌叢の変動
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nambu T, Mashimo C, Maruyama H, Okinaga T
2. 発表標題 Identification of nitric oxide-sensitive oral bacteria by culturing plaque-derived microbiota
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南部隆之, 森岡裕貴, 麥田菜穂, 真下千穂, 山根一芳, 円山由郷, 山中武志, 高橋一也, 小正裕, 王宝禮
2. 発表標題 Sporicidal activity of pure performic acid synthesized the DBD plasma
3. 学会等名 第89回日本細菌学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 森岡裕貴, 南部隆之, 王宝禮, 高橋一也
2. 発表標題 過干酸による唾液細菌に対する殺菌効果
3. 学会等名 第31回日本口腔リハビリテーション学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小正 裕 (Komasa Yutaka) (10131385)	大阪歯科大学・医療保健学部・教授 (34408)	
研究分担者	王 宝禮 (Wang Pao-Li) (20213613)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	
研究分担者	南部 隆之 (Nambu Takayuki) (80367903)	大阪歯科大学・歯学部・講師 (34408)	