

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10826

研究課題名(和文) スキンケアに害のない、皮膚及び粘膜への適応が可能な消毒薬の開発に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Studies on virucidal molecules, applicable on both skin and mucosal surfaces, to develop new skin-friendly disinfectants

研究代表者

池田 敬子 (Ikeda, Keiko)

和歌山県立医科大学・保健看護学部・准教授

研究者番号：60331807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：組織障害性が軽く、かつ、効果的な消毒薬の開発を目指し、食品由来の化合物の持つ微生物不活化活性に注目し解析している。本研究では、1)エンベロープおよび非エンベロープウイルスを不活化できる化合物の系統的な探索としてクマル酸異性体及びプロテオグリカンの消毒活性を明らかにし、タンパク質による妨害作用の克服条件への解析としてN-アセチルトリプトファンとスクロース誘導体の作用を発見し、また、2)実際の環境下での汚染微生物の挙動についての基礎データとして汚染マスク上でのウイルス感染性の消長について解明し、さらに、3)応用にむけた試みとしてうがい薬として用いた場合を考えて、現状の口腔洗浄効果を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染防御は現代社会における大きな課題である。消毒は感染対策に役割をもつが、一般的には効果的な消毒薬は組織障害性が強く、その用法には制限がある。我々は、組織障害性が軽く、かつ、効果的な消毒薬の開発を目指して、食品および食品由来の化合物の持つ微生物不活化活性に注目し、解析してきた。感染防御については医療現場だけのものではなく、人流の活発化、耐性株の出現等、感染が拡大する機会があるため消毒効果の探求は社会生活上にも必要とされる。

研究成果の概要(英文)：We have been developing effective but skin/mucosa-friendly disinfectants (virucidal agents) among food-derived compounds. However, in general, virucidal activities with mild cytotoxicity are markedly inhibited by the presence of proteins. In this study, we have characterized the virucidal activities of N-acetyltryptophan, umes phenolics, hydantoin and N-cocoyl-L-arginine ethylester (CAE) in the presence of protein, showing significant virucidal activities in these compounds. We also revealed the importance of nature of the solvent (pH, salt concentration and salt-types of buffer) for these virucidal activities. In addition, to provide the scientific information about sustainability of viral infectivity under hospital settings, we characterized the life-span of the viral infectivity on mask. We also preliminarily characterized the efficacy of washing techniques on mouth cleaning by examining residual numbers of oral bacteria before and after washing.

研究分野：感染看護

キーワード：スキンケア 低刺激 食品由来

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、アルギニン及びその誘導体が微酸性条件下で種々のウイルスを不活化(消毒)できることを見出し報告してきた。アルギニンはタンパク質構成アミノ酸であり生体に対する安全性は高いと期待されることから、体表への表在感染に対する予防・治療薬としての可能性を考え、動物実験の結果をもとにインフルエンザ感染や単純ヘルペスウイルス 2 型による表在感染症(性器ヘルペス)の予防・治療への可能性についても提案してきた。一方、アルギニンはウイルスのみならず細菌も殺し、ことに緑膿菌に対しては顕著な殺菌作用を示した。このように、アルギニンの有用性についてはかなり明らかに出来たが、反面、活性に 0.5 M 以上の高い濃度が必要であり非エンベロープウイルスには効果が弱いなど、実際の使用に向けては制限もある。

一方、我々はポリフェノールやビタミン C など種々の食品由来成分に抗ウイルス活性を発見し報告してきた。興味深いことに、アルギニンには水に難溶性物質を可溶化する作用もあり、この性質と関係すると考えているが、種々のポリフェノール類のウイルス不活化作用を顕著に増強した。そこで本研究では、アルギニンと同様に生体に安全であり協働作用を介して“より強力な消毒活性を持つ化合物を探索すること、並びに、塩濃度や pH など処理条件を定量的かつ網羅的に解析し、組織障害性のない消毒薬をつくることを目的としている。

また、接触感染の防御に向けての対策を考えるとときには、手指衛生の効果を示すための科学的根拠が必要であるが、現時点では根拠となるデータが不十分と考え、ウイルスが手指や院内環境を汚染したときのウイルス感染性の持続と伝播力についても評価してきた。実験的に汚染した手指上のウイルス感染力の時間変化やインフルエンザウイルスに暴露された衣服上での感染力の変化について、医療現場を想定したインフルエンザウイルスの感染性の消長について定量的に調べ報告してきた。これらの実験で得られる結果は、医療現場における汚染ウイルス伝播力の理解を通じて感染対策の面からも必要であり、消毒薬の実効性を評価するためにも必須である。

2. 研究の目的

手指衛生は、常に汚染しやすい環境下にある看護の現場での感染症対策において極めて重要であり恒常的な課題である。しかし消毒剤の使用が看護職者の手荒れを生じやすい点に問題がある。また、一般に生体に安全な消毒活性物質はタンパク質が共存することでその消毒活性(不活化活性)が顕著に妨害され、この妨害作用の克服が非常に重要な課題である。私達はアミノ酸の一種アルギニンが微酸性条件下で強いウイルス不活化作用(消毒作用)を示すことを報告してきた。アルギニンをはじめ組織障害性が低い食品由来の消毒活性成分を組合せることにより「人体に安全で不活化効果の高い消毒薬」が開発できると考え、本研究では、(1)夾雑タンパク質による消毒作用妨害の克服条件の解明、(2)より顕著な作用を示し安全性も高い消毒活性を求めた定量的探索、ならびに、実用化に向けた基礎データの収集のため(3)手指や病院環境での汚染微生物の感染性の消長、および、(4)うがい薬として用いた場合の口腔洗浄効果についての解析を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 用いたウイルスと細胞：ウイルスは単純ヘルペスウイルス 1 型 F 株(HSV-1)、A 型インフルエンザウイルス PR8 株(H1N1)と Aichi 株(H3N2)、B 型インフルエンザウイルス Tokyo

株、ポリオウイルス 1 型 Sabin ワクチン株 (PV-1)、コクサッキー B ウイルス 5 型 (CB5)、ネコカリシウイルス F4 株 (FCV)、ヒトライノウイルス 1B 株 (HRV) を用い、細胞もウイルス種に合わせて Vero 細胞、MDCK 細胞、CRFK 細胞、HeLa 細胞を使用した。ウイルスの感染価の定量は HRV 以外はブラック法で、HRV は TCID₅₀ 法で感染価を測定した。

(2) ウイルス不活化作用の測定には、各種試薬液にウイルス液を添加し、十分に混和したウイルス液および試料を指定温度で一定時間保温した後、直ちに冷ウイルス希釈液(被験ウイルス種によって FBS あるいは BSA を添加した)を添加し、各希釈中の感染性ウイルス量を測定した。不活化作用の程度は、対照にダルベリッコのリン酸緩衝溶液 (PBS) にウイルス液を混和し、同様に処理したサンプルでの残存感染性ウイルス量を 1 とし、各試料液での残存感染性ウイルス量に対する相対比を算出した。

(3) 汚染微生物の環境中の感染性の消長の解析においては、バイオセーフティレベル 1 相当の安全なウイルスを汚染ウイルスとして用い、試料を汚染したのち経時的に汚染部位から残存ウイルスを回収し、感染性を定量した。

(4) 口腔洗浄効果についての解析には、パナソニック社の口内細菌数測定装置(細菌カウンタ)を用い、付属マニュアルに従い、口腔洗浄操作前後に滅菌綿棒を用いて舌状細菌を回収し、細菌数を定量した。

4. 研究成果

本研究においては、具体的な研究課題として 4 つの課題を柱に計画を立てた。それぞれの課題について研究成果を、以下に報告する。

(1) 夾雑タンパク質による消毒作用妨害の克服条件の解明

注射用のアルブミン液中に安定剤として添加される N-アセチルトリプトファン (AcTrp) がタンパク質の存在下でインフルエンザウイルスを不活化することを見出し、AcTrp のウイルス不活化作用について解析した。AcTrp は注射薬の成分であることから、呼吸器などの粘膜表面でのウイルス不活化薬として利用が考えられる。

AcTrp の実用化に向けて、その作用様式についての解析を進めた結果、AcTrp が呼吸器感染ウイルスであるインフルエンザウイルス A 型 PR8 株 (H1N1) と Aichi 株 (H3N2) および B 型 Tokyo 株、ヒトライノウイルス、ネコカリシウイルスを 30 5 分間という温和な条件下でも顕著に不活化すること、不活化は溶媒 pH に依存しており、酸性側でより顕著であること、AcTrp は夾雑タンパク質の存在下においても、AcTrp の濃度を上げるにより検出限界まで不活化できること、ウイルスの不活化は溶媒の緩衝材の種類に依存し、リン酸緩衝液で最も顕著な不活化が見られクエン酸塩やリンゴ酸塩では不活化効率が低いこと、また、AcTrp はウイルス不活化作用に加えて、感染細胞に対しウイルス増殖作用を抑制する効果を持つこと、などを明らかにできた。

(2) より顕著な作用を示し安全性も高い消毒活性を求めた定量的解析

AcTrp は pH 依存性が強いので、AcTrp の解析と並行して AcTrp と同様に組織障害作用が弱く粘膜面への投与が可能な消毒物質を求め、食品由来物質とその誘導体のウイルス不活化作用を検討した。現在までにウメ由来フェノール性化合物、ヒダントイン、N-ヤシ油脂脂肪酸アシル-L-アルギニンエチル (CAE) に可能性を見出し、それらについて解析を進めてきた。

糖蜜にも含まれるヒダントイン (Hyd) は、高い濃度 (0.2M) を必要とするが単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) を不活化する。HSV-1 は pH 6.0 では NaCl で不活化されないが、Hyd で不活化された。インフルエンザウイルスは pH 5.5 では弱い酸不活化を受けるが、0.2M NaCl で不活化が抑制されるのに対し 0.2M Hyd では短時間に 10^{-3} 以下にまで不活化され、この不活化は 0.1% アルブミン存在下でも見られ、ヒダントイン誘導体も含めて、現在も解析中である。

ウメ由来フェノール性化合物 (UP) はウイルス感染初期過程 (吸着侵入) も顕著に阻害でき、この作用が呼吸器感染阻止に利用できると考えて、種々のウイルスでの UP の作用を解析した。HSV-1 は 0.0005% UP 存在下で感染効率を 10^{-2} まで下げた。A 型インフルエンザウイルス (IV-A) PR 8 株 (H1N1 亜型) では 0.005% で 10^{-1} まで B 型ウイルス (IV-B) では 0.9% で 10^{-1} まで下げたが、IV-A Aichi 株 (H3N2 亜型) では 0.01% でも 5^{-1} で、型や亜型に寄らず感染効率を下げるが HSV-1 に比べると阻害は弱かった。

COVID-19 に対する CAE の予防薬としての可能性をネココロナウイルス (FeCoV) をモデルウイルスとして検証した。CAE の細胞障害作用は限定的で、濃度 0.012% で死細胞出現率は 5% であった。CAE 存在下で FeCoV は、CAE 濃度に応じて細胞への感染効率を低下し、0.008% CAE 存在下では $1/25$ まで低下した。CAE は広範なウイルスの増殖阻害や不活化作用も示した。

これらの化合物は抗ウイルス薬のウイルス増殖阻止効果に較べると抗ウイルス効果が弱いですが、安価な上にウイルス不活化スペクトラムが広く薬剤耐性を生じにくいという利点があり、相互に組み合わせることにより、また溶剤の緩衝液を工夫することで、より効果的な感染阻止効果も可能と考えられ、解析を続けている。

(3) ベッドサイドの周辺環境物における汚染ウイルスの伝染力についての定量的な解析

新型コロナウイルス感染症の影響でマスクの需要が高まり、種々の素材のマスクが使用された。素材の違うマスクの表面に付着したウイルスがどのくらいの時間生存しマスクから伝播できるか明らかにするため、代表的な呼吸器感染症ウイルスであるインフルエンザウイルスを用いて解析した。不織布マスク、ポリエステルマスク、布マスクの試料片にインフルエンザウイルス液を滴下し、60 分後に調べると、不織布マスクとポリエステルマスクの両者とも感染性は減少せず変化は見られなかった。布マスクでは検出限界以下にまで感染性を喪失した。一方、3 種の試料片上に付着させたウイルス液の 60 分後の状態は、不織布マスクとポリエステルマスクでは水滴状態を維持していたが、布マスクではウイルス液が消失しており、水分の乾燥が感染性の喪失を招いた可能性を示唆した。この結果はマスク素材によって感染性の持続時間が異なることを示し、持続時間にはマスク上でのウイルス含有液滴の状態が関与する可能性を示唆した。

(4) 口腔ケアの評価ならびに洗口液の組成についての基礎研究

アルギニンを含む洗口液の組成が口腔ケアでの洗浄効果に与える影響についての予備調査として、口腔が汚染し易い ICU 患者を対象に標準洗口操作による口腔洗浄の効果と効果の持続性を解析した。4 名 (男性 1 名、女性 3 名) の患者に対して、細菌カウンターで洗浄前後での口腔粘膜上の細菌数の減少を調べたが、洗口術者により有意のばらつきを示した。特に洗浄に用いる使用器具タイプによる細菌数の相違があった。さらに症例数を増やし洗浄液を工夫した解析をする予定であったが、新型コロナウイルスが流行し ICU に入室してのサンプル採取が困難な状況となったため実施することができなかった。今後、健常者を対象にアルギニンを含む洗口液の組

成が洗淨効果に与える影響などを定量的に解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishide M, Ikeda K, Mimura H, Yoshida M, Mitani T, Koyama A.H	4. 巻 63
2. 論文標題 Antiviral and virucidal activities against herpes simplex viruses of umesu phenolics extracted from Japanese apricot.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 359-366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12729	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 Ikeda K, Nishide M, Tsujimoto K, Nagashima S, Tomomi Kuwahara, Mitani T, Koyama A.H	4. 巻 73
2. 論文標題 Antiviral and Virucidal Activities of Umesu Phenolics on Influenza Viruses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 8-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2018.522	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 3. 池田敬子、辻本和子、西出充徳、味村妃紗、長尾多美子、Tsutomu Arakawa、桑原知己、三谷隆彦、小山一。	4. 巻 49
2. 論文標題 梅酢ポリフェノールの抗ウイルス活性とその応用（呼吸器感染症予防）に向けた試み。	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本防菌防黴学会誌	6. 最初と最後の頁 307-315
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 無
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 池田敬子、辻本和子、小山一。	4. 巻 49(6)
2. 論文標題 スキンケアに害のない消毒薬の開発に向けた基礎研究。	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fragrance Journal	6. 最初と最後の頁 19-24
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 無
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 Nishinami Suguru, Ikeda Keiko, Nagao Tamiko, Koyama A. Hajime, Arakawa Tsutomu, Shiraki Kentaro	4. 巻 275
2. 論文標題 Aromatic interaction of hydantoin compounds leads to virucidal activities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysical Chemistry	6. 最初と最後の頁 106621 ~ 106621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpc.2021.106621	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 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 池田敬子, 小山一
2. 発表標題 梅酢ポリフェノールを含む「うがい液」による呼吸器感染への予防効果
3. 学会等名 第61回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田敬子, 長尾多美子, 長島早里, 西出充徳, 桑原知己, 小山一
2. 発表標題 タンパク質による妨害を受けにくいスクロースオクタ硫酸のウイルス不活化作用
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田敬子
2. 発表標題 梅酢フェノール化合物によるうがいをういたインフルエンザおよび普通感冒への予防効果について.
3. 学会等名 日本看護研究学会第45回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田敬子, 長尾多美子, 西出充徳, 桑原知己, 小山一
2. 発表標題 タンパク質存在下においてもインフルエンザウイルスを不活化できる化合物の探索
3. 学会等名 日本防菌防黴学会 第46回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田敬子, 長尾多美子, 西出充徳, 桑原知己, 小山一
2. 発表標題 梅酢ポリフェノールのウイルス不活化作用へのタンパク質による妨害の克服
3. 学会等名 日本防菌防黴学会 第46回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田敬子
2. 発表標題 梅酢ポリフェノールの抗ウイルス活性と医療現場での応用の試み
3. 学会等名 和歌山バイオサイエンス連絡協議会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田敬子, 長尾多美子, 西出充徳, 桑原知己, 小山一
2. 発表標題 ウメ酢ポリフェノールによる呼吸器感染ウイルスの不活化とその感染予防効果
3. 学会等名 第35回日本環境感染学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiko Ikeda, Tsutomu Arakawa, Tamiko Nagao and A. Hajime Koyama :
2. 発表標題 Virucidal Activity of Sucrose Octasulfate in the Presence of Proteins as a Mucosa Friendly Disinfectant.
3. 学会等名 World Microbe Forum 2021 (ASM & FEMS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田敬子、長尾多美子、桑原知己、小山 一：ウメ由来フェノール性化合物によるウイルス感染の阻害。
2. 発表標題 ウメ由来フェノール性化合物によるウイルス感染の阻害。
3. 学会等名 第36回日本環境感染学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長尾多美子、池田敬子、桑原知己、小山 一
2. 発表標題 N-ヤシ油脂脂肪酸アシル-L-アルギニンエチル (CAE) によるコロナウイルス感染効率の抑制。
3. 学会等名 第36回日本環境感染学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長尾多美子、池田敬子、西出充徳、桑原知己、小山 一
2. 発表標題 N-ココイル-L-アルギニンエチルエステル (CAE) によるウイルス感染の抑制。
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田敬子、西奈美卓、長尾多美子、西出充徳、白木賢太郎、荒川 力、小山 一
2. 発表標題 タンパク質による妨害を受けにくいヒダントインのウイルス不活化作用.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和佐春奈、服部友里花、松本萌子恵子、山下千遥、池田敬子
2. 発表標題 経口挿管患者に対する口腔ケアが口腔内細菌数に与える影響.
3. 学会等名 第12回和歌山保健看護学会
4. 発表年 2021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	長尾 多美子 (Nagao Tamiko) (40716049)	四国大学短期大学部・その他部局等・講師 (46101)	
研究 分担者	小山 一 (Koyama Hajime) (80109074)	和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員 (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------