

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590144

研究課題名(和文) 反応動態解析に基づくカタラーゼ阻害剤を併用したヒドロキシルラジカル殺菌技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of the disinfection technique with hydroxyl radicals and catalase inhibitor based on the reaction kinetic analysis

研究代表者

庭野 吉己 (Niwano, Yoshimi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40375184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：過酸化水素光分解殺菌法は、既存抗生物質の代替となる耐性出現のリスクがない有望な殺菌法であることを証明するとともに、ポリフェノールを含有する生薬や植物エキスを併用することで相乗的な抗菌効果が得られることを明らかとした。光照射を止めると水酸化ラジカルは速やかに消失することから、残留毒性も問題はなく、同時に照射後の局所組織の酸化的障害の進展があったとしても、併用している生薬や植物エキスの抗酸化作用により抑えられるという利点も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide could be a novel alternative to existing antibiotics because the risk of inducing bacterial resistance by the disinfection treatment was proven to be quite low. In addition, we revealed that bactericidal activity of photo-irradiated hydrogen peroxide was synergistically augmented in the presence of polyphenol containing-herbal medicines and plant extracts. The bactericidal activity of the disinfection treatment is due to hydroxyl radicals generated by photolysis of hydrogen peroxide which disappear immediately after the cessation of photo-irradiation. Therefore, there would be no problematic issues on residual toxicity, and there would be an advantage that antioxidant activity of the herbal medicines and plant extracts would alleviate the oxidative damage that might be caused by hydroxyl radicals during photo-irradiation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：過酸化水素光分解殺菌法 水酸化ラジカル カタラーゼ阻害 生薬 植物エキス ポリフェノール

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗生物質の多用は薬剤耐性菌の出現を招き、問題の深刻化につながる感染症に対するリスクは年齢とともに増加し、我が国における 60 歳以上の年齢層では感染症の一つである肺炎が死因の第 4 位となっている。感染症には、肺炎や敗血症といったように生命に関わる類のものから皮膚感染である白癬菌症(水虫)や歯科疾患である歯周病などに至るまで原因となる微生物あるいは感染部位などによって様々な病態が含まれる。いずれの感染症においても病原性微生物の除去が治療の第一目標であり、多くのケースで治療のために抗生物質などの薬剤の投与が行われる。しかしながら、抗生物質の多用は薬剤耐性菌の出現を招き、昨今問題となっている多剤耐性菌による院内感染の発生といったように問題の深刻化に繋がることがある。従って、抗生物質の投与に変わる殺菌療法の確立が望まれている。

(2) 活性酸素の一種であるヒドロキシルラジカルを利用した殺菌法が新しい殺菌療法となり得る

申請者らの研究グループでは皮膚感染や歯科疾患といった感染症に対して抗真菌薬や抗生物質の投与を伴わずに治療を行うために、活性酸素の一種であるヒドロキシルラジカル(HO \cdot)を利用した新しい殺菌技術を確立してきた。活性酸素の中でも最も酸化力が強いとされるヒドロキシルラジカルによる殺菌法は、口腔内病原細菌および白癬菌やカンジダといった真菌に対しても効果的であることを報告してきた。また、ヒドロキシルラジカルを人工的に発生させる方法としては、過酸化水素の光分解が有効な方法であることが分かっている。さらにヒドロキシルラジカルによる殺菌は一度に数カ所の細菌の構成要素を破壊するので、抗生物質とは異なり耐性菌を発生させないと考えられている。これは非常に大きな利点であり、本殺菌システムの臨床応用へ向けた研究開発を強く後押しするものである。従来、過酸化水素を光分解するためには紫外線を照射する方法が知られていたが、申請者らは紫外線の代わりに低波長可視光レーザー(405 nm)を用いてもヒドロキシルラジカルが生成できることを突き止め、生体安全性に配慮した殺菌システムを構築してきた。また、過酸化水素の濃度も消毒剤として一般的に使用されている濃度(3%)よりも低濃度で用いるので生体に対する為害作用は低い。

2. 研究の目的

ヒトの生命に大きな影響を与える感染症の治療には病原性微生物の殺菌が必須である。病原性微生物を殺菌する方法として、抗生物質の投与といった従来の方法に加えて、我々は過酸化水素を光分解することで活性酸素の一種であるヒドロキシルラジカルを生成

し、その強い酸化力によって殺菌を行う方法を確立してきた。しかしながら、多くの真菌、好気性あるいは通性嫌気性細菌は過酸化水素分解酵素であるカタラーゼを有しているため、過酸化水素光分解殺菌法の効果が減弱されてしまう。そこで、本研究では、カタラーゼ阻害作用を有する生薬を併用することでより効率的にカタラーゼ陽性微生物を殺菌する方法を構築する。

3. 研究の方法

(1) カタラーゼ阻害活性の測定

カタラーゼ活性を阻害すると報告されている生薬・植物抽出物であるオウゴン、リョクチャおよびレモンパームのカタラーゼ活性の阻害作用を電子スピン共鳴(ESR)オキシメトリー法で測定した。カタラーゼ、4-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethyl-piperidin-1-oxyl (TEMPOL)、各生薬水溶液および H $_2$ O $_2$ を混合して反応液を作成し、ESR 分析に供した。得られた TEMPOL の ESR スペクトルの線幅からカタラーゼ活性阻害活性を算出した。

(2) 過酸化水素光分解殺菌系のヒドロキシルラジカル生成に対するカタラーゼ陽性菌の影響

菌懸濁液、H $_2$ O $_2$ およびスピントラップ剤 5, 5-dimethyl-pyrroline-1-N-oxide (DMP0) の混液に波長 400 nm の光を 1 分間照射した。照射後ただちに DMP0-OH (DMP0 とヒドロキシルラジカルのスピンアダクト)の生成を ESR にて解析した。

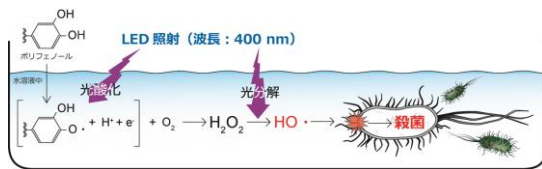
(3) 過酸化水素光分解殺菌法に対するオウゴンおよびリョクチャの影響

試験には、カタラーゼ陽性の細菌、真菌である *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* およびカタラーゼ陰性細菌である *Streptococcus mutans* を供した。生理食塩水で調製した菌懸濁液、H $_2$ O $_2$ および生薬の混液に波長 405 nm の光を 2 分間照射した。照射後ただちに試料にカタラーゼを加え、残存加過酸化水素を分解し、試料中の生菌数を培養試験により算出した。

(4) プロアントシアニジンと過酸化水素光分解殺菌法との併用効果

① 殺菌試験

オウゴンおよびリョクチャの 2 種の生薬のもう一つの特徴として、これら生薬に含まれるポリフェノールの存在があることから、ポリフェノールのフェノール性水酸基が光酸化されて放出されるプロトンと電子により、溶存酸素が還元されて過酸化水素が生成され、次にこの過酸化水素が光分解されてヒドロキシルラジカルが生成することが想定され(下図)、これら活性酸素による抗菌活性の増強が期待されたので、この点を確認した。



その結果、これら生薬に光を照射すると過酸化水素とヒドロキシルラジカルの生成が認められた (結果省略)。そこでフェノール性水酸基を分子内に多数保有するプロアントシアニジンと過酸化水素光分解殺菌法との相乗効果を検討した。*S. mutans* 菌液と H_2O_2 およびプロアントシアニジン溶液を混合した後、波長 405 nm の青色可視光を 3 分間照射した。照射後ただちに試料にカタラーゼを加え、残存 H_2O_2 を分解し、培養試験により試料中の生菌数を算出した。次に *Porphyromonas gingivalis* を試験菌とし、同様の試験を実施した。

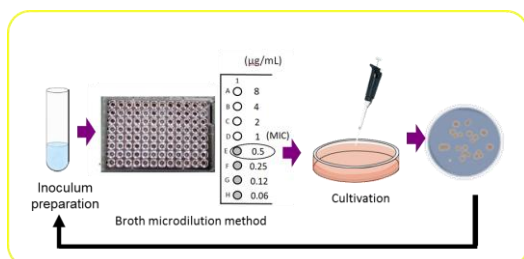
②過酸化水素生成量の検討

仮説のようにプロアントシアニジンに光照射することで H_2O_2 の生成が増加するかを確認した。各種濃度のプロアントシアニジン溶液に波長 405 nm の光を 3 分間照射した時の試料中の H_2O_2 濃度を測定した

(5) 過酸化水素光分解殺菌法の耐性誘導試験

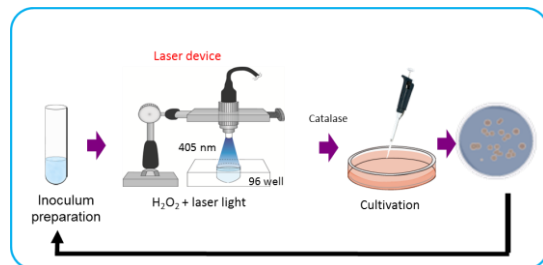
①既存抗生物質に対する耐性誘導試験

過酸化水素光分解殺菌法の耐性誘導試験に先立ち、供試菌が既存の抗生物質の繰り返し暴露により耐性が誘導されるか否かを確認した。供試菌として *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius* および *Escherichia coli* の 4 菌種を用いた。抗生物質には、アモキシシリン (AMX, ペニシリン系)、塩酸セフェピン (CFPN, セフェム系)、エリスロマイシン (EM, マクロライド系)、オフロキサシン (OFLX, キノロン系)、塩酸クリンダマイシン (CLDM, リンコマイシン系)、塩酸シプロフロキサシン (CPFEX, キノロン系)、および塩酸ミノサイクリン (MINO, テトラサイクリン系) を選定し、これら抗生物質がコートされた 96 穴マイクロプレートを用いた微量液体希釈法により、供試菌株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。初回 MIC 測定後、1/2 MIC のウエルの菌液に培地を加え、供試抗生物質のキャリーオーバーの影響を排除し、その混液を寒天培地上で培養した。発育したコロニーより接種菌液を調製し、初回と同様に MIC を測定した。この操作を 20 回繰り返した。方法の概略を下図に示す。



②過酸化水素光分解殺菌法に対する耐性誘導試験

供試菌として先の 4 菌種に *Pseudomonas aeruginosa*, *S. mutans*, および *Actinobacillus actinomycetemcomitans* を加えた 7 菌種を用いた。1 M H_2O_2 に $1 \times 10^7 \sim 10^8$ CFU/ml になるよう供試菌を懸濁し、405 nm の光を 30 秒あるいは 1.5 分照射した (本法に対して高感受性の菌種は 30 秒、比較的感受性の低い菌種は 1.5 分とした。) 照射後、カタラーゼを加え、 H_2O_2 を分解した後、寒天平板上で 37°C、1~2 日培養した。生菌数を記録するとともに、得られたコロニーから $1 \times 10^7 \sim 10^8$ CFU/ml になるよう 1 M H_2O_2 に菌液を調製、同じ操作を繰り返し、過酸化水素光分解法の抗菌活性を記録した。本操作を 40 回繰り返し、感受性の変化を判定した。方法の概略を下図に示す。



(6) ラット創傷感染モデルに対する過酸化水素光分解殺菌法の効果

免疫抑制を誘導するため、創作製 3 日前および作製直前にプレドニゾロンを 30 mg/kg の割合でラットに筋肉内投与した。背部左右肩甲骨の上側の背部皮膚 2 ヶ所に直径 1 cm の円状の全層皮膚欠損創を作製し、菌懸濁液 (*S. aureus*, 7×10^7 CFU/ml) を 20 µl/site の割合で接種した。その翌日および翌々日に麻酔下で 1 M H_2O_2 (流速 25 ml/min) と 400・465 nm LED を 2 分間創傷部に処理した。比較対照群には、LED 照射なしで純水を同様に処理した群 (H(-)L(-))、LED 照射ありで純水を同様に処理した群 (H(-)L(+))、および LED 照射なしで 1 M H_2O_2 を同様に処理した群 (H(+))L(-) を設けた。各処理の 2 日後、創傷・感染部位を摘出し、作製したホモジネート中の生菌数を培養法により求めた。

4. 研究成果

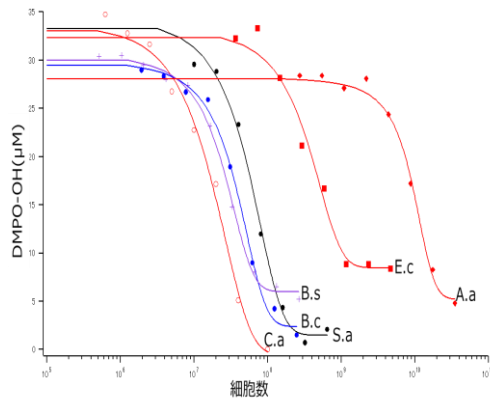
(1) カタラーゼ阻害活性の測定

オウゴンおよびリョクチャは、1 mg/ml の濃度で、無添加対照に対してカタラーゼ活性をそれぞれ 30% および 25% 阻害したが、レモンパームは対照とほぼ同じ値を示し、活性阻害は認められなかった。

(2) 過酸化水素光分解殺菌系のヒドロキシルラジカル生成に対するカタラーゼ陽性菌の影響

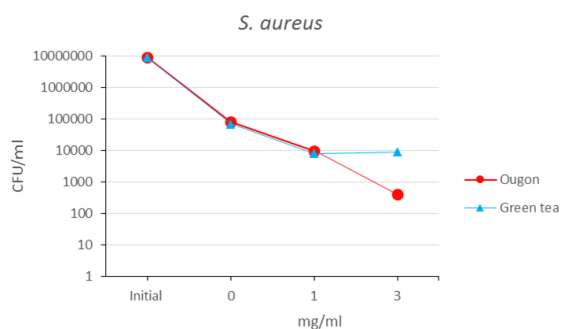
図に結果を示す。図中 A. a, B. c, B. s, E. c,

S.a, および C.a は、それぞれ *A. actinomycetemcomitans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *S. aureus* および *C. albicans* を示す。いずれの菌種も細胞数に依存して過酸化水素光分解殺菌法において生成するヒドロキシラジカル量を減少させることがわかった。



(3) 過酸化水素分解殺菌法に対するオウゴンおよびリョクチャの影響

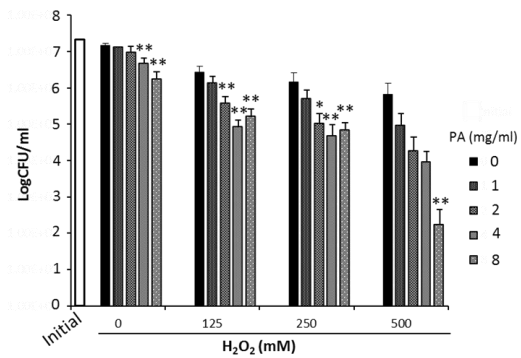
S. aureus を試験菌とした時の結果を下図に示す。オウゴンおよびリョクチャのいずれも過酸化水素光分解殺菌法の活性を増強した。*C. albicans* でも同様の結果が得られた。しかし、カタラーゼ陰性菌である *S. mutans* でも同様の増強効果が認められたため、この増強効果は、カタラーゼ活性阻害によるものではないことが示唆された。「研究の方法」の項目に記載したように、これら生薬に含まれるポリフェノールによるものである可能性が考えられたため、フェノール性水酸基を多数含むプロアントシアニジンを用いて、同様の検討を次に行った。



(4) プロアントシアニジンと過酸化水素光分解殺菌法との併用効果

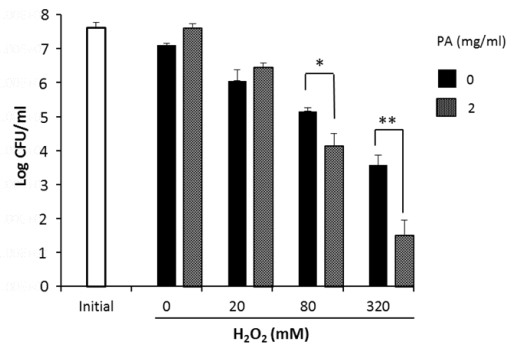
① 殺菌試験

S. mutans に対する殺菌効果を下図に示す。残存生菌数は、プロアントシアニジンのみならず過酸化水素の濃度に依存して減少した。特に 500 mM 過酸化水素とプロアントシアニジン 8 mg/ml の組合せでは初発菌数に対し約 5-log 生菌数は減少し、それぞれの単独効果に比し相乗的な殺菌効果が認められた。図中 PA は、プロアントシアニジンを示す。



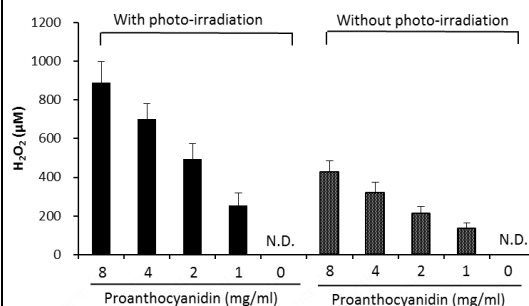
す。

この相乗効果を確認する目的で行った *P. gingivalis* に対する殺菌試験の結果を下図に示す。プロアントシアニジン 2 mg/ml の添加により 80 および 320 mM 過酸化水素のレーザー照射時の殺菌活性は、飛躍的に増強された。



② 過酸化水素生成量の検討

結果を下図に示すが、プロアントシアニジン PBS 溶液単独でも濃度に依存して H_2O_2 が生成していることを確認した。この生成は、照射することによってさらに増強された。従って、プロアントシアニジンによる過酸化水素光分解殺菌法の活性増強は、菌に吸着したプロアントシアニジンから局所で生成した H_2O_2 がさらに光分解されたヒドロキシラジカルによる可能性が強く示唆された。

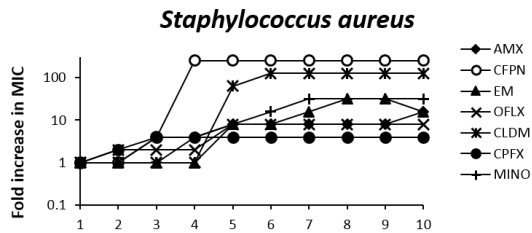


(5) 過酸化水素光分解殺菌法の耐性誘導試験

① 既存抗生物質に対する耐性誘導試験

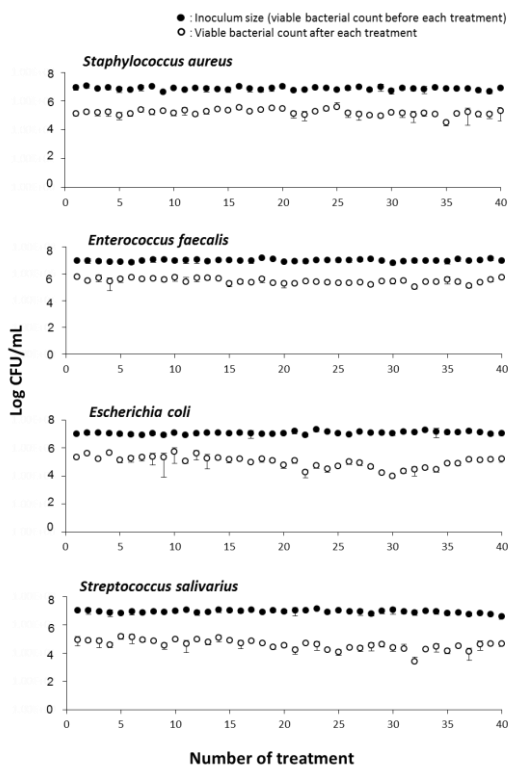
S. aureus での結果を下図に示す。4 菌種 (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* および *S. salivarius*) で行った抗生物質を用いた反復暴露試験において、10 回以内にすべての菌種で少なくとも一つ以上の抗生物質に対する

感受性の低下が認められた。



②過酸化水素光分解殺菌法に対する耐性誘導試験

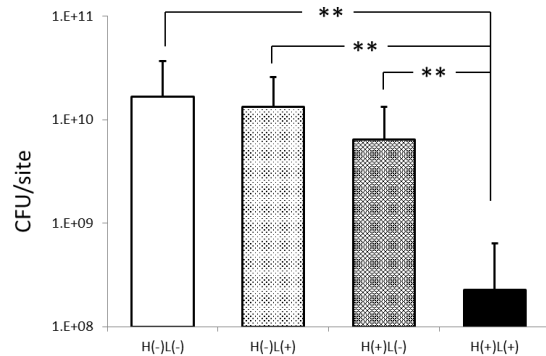
下図に既存抗生物質の試験に供試した4種の細菌 (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* および *S. salivarius*) に対して過酸化水素光分解殺菌処理を繰り返し行った場合の殺菌活性の推移を示す。1回目の過酸化水素光分解処理では、設定通り生菌数はほぼ2-log減少した。同処理40回繰り返し行ったが、いずれの細菌においても本殺菌法に対する細菌の感受性は低下することなく、細菌数の減少の幅は、40回の処理を通して2~3-logであった。



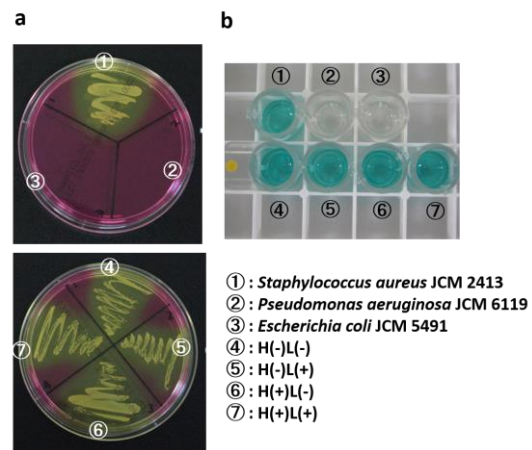
残りの3種の細菌、*P. aeruginosa*, *S. mutans*, および *A. actinomycetemcomitans* についても同様に過酸化水素光分解処理を40回繰り返し行い、40回の処理中に細菌の感受性の低下はないことを確認した(データ省略)。

(6) ラット創傷感染モデルに対する過酸化水素光分解殺菌法の効果
培養試験成績を下図に示す。1 M H₂O₂ + LED 照射群 (H(+))L(-)) では、水対照群

(H(-))L(-)) および水 + LED 照射群 (H(-))L(+)) に比し、検出生菌数は2 log オーダー低い値が得られた。1 M H₂O₂ + LED 照射群 (H(+))L(-)) においても非常に軽度ではあるが菌陰性化傾向が認められたが、その影響は有意ではなかった。



最後に培養試験で検出された菌体が接種菌である *S. aureus* かどうかを確認するためにマンニトール食塩培地での培養 (a: 生化学的同定) と菌種特異的リボゾーム RNA を検出する DNA プローベ法 (b: 遺伝学的同定) を行った (下図)。その結果、対照菌種として用いた *P. aeruginosa* および *E. coli* は、いずれの方法においても陰性で、接種菌である *S. aureus* JCM 2413 および培養試験菌体は、いずれの方法においても陽性であったことから、培養試験で検出された菌体は接種菌である *S. aureus* であることが確認された。



創傷感染モデルにおいて、過酸化水素光分解殺菌法の効果が確認できたので、今後、本モデルを用いてプロアントシアニジンあるいは他の生薬・植物エキス併用による相乗効果の確認を行う予定。

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5件)

① Ikai, H., Odashima, Y., Kanno, T., Nakamura, K., Shirato, M., Sasaki, K.,

- Niwano, Y.: In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide. PLoS ONE, 査読有 8(11):e81316, 2013
DOI: 10.1371/journal.pone.0081316
- ② Ikai, H., Nakamura, K., Kanno, T., Shirato, M., Meirelles, L., Sasaki, K., Niwano, Y.: Synergistic effect of proanthocyanidin on the bactericidal action of the photolysis of H₂O₂. Biocontrol Sci., 査読有 18(2):137-141, 2013
DOI:org/10.4265/bio.18.137
- ③ Oyamada, A., Ikai, H., Nakamura, K., Hayashi, E., Kanno, T., Sasaki, K., Niwano, Y.: In vitro bactericidal activity of photo-irradiated oxydol products via hydroxyl radical generation. Biocontrol Sci., 査読有 18(2):83-88, 2013
DOI:org/10.4265/bio.18.83
- ④ Hayashi, E., Mokudai, T., Yamada, Y., Nakamura, K., Kanno, T., Sasaki, K., Niwano, Y.: In vitro and in vivo anti-*Staphylococcus aureus* activities of a new disinfection system utilizing photolysis of hydrogen peroxide. J. Biosci. Bioeng., 査読有 114(2):193-197, 2012
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.03.020
- ⑤ Yamada, Y., Mokudai, T., Nakamura, K., Hayashi, E., Kawana, Y., Kanno, T., Sasaki, K., Niwano, Y.: Topical treatment of oral cavity and wounded skin with a new disinfection system utilizing photolysis of hydrogen peroxide in rats. J. Toxicol. Sci., 査読有 37(2):329-335, 2012
DOI:org/10.2131/jts.37.329

〔学会発表〕(計9件)

- ①猪飼絃代、中村圭祐、小田島優、白土翠、菅野太郎、庭野吉己: 過酸化水素光分解殺菌法の耐性誘導試験. 日本防菌防黴学会第40回年次大会、2013年9月10日、大阪
- ②Ikai, H., Odashima, Y., Nakamura, K., Shirato, M., Kanno, T., Sasaki, K., Niwano, Y.: Advantages of new disinfection treatment utilizing photolysis of hydrogen peroxide - Low risk of inducing bacterial resistance and postantibiotic effect -. Presented at the Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Summer Seminar 2013 in Sendai, 2013年8月29日
- ③小山田晃、猪飼絃代、中村圭祐、菅野太郎、佐々木啓一、庭野吉己: 市販オキシドールの光分解殺菌効果. 日本防菌防黴学会第

- 39回年次大会、2012年9月12日、東京
- ④猪飼絃代、白土翠、中村圭祐、菅野太郎、佐々木啓一、庭野吉己: カテキン類・生薬の添加による過酸化水素光分解殺菌の併用効果. 日本防菌防黴学会第39回年次大会、2012年9月12日、東京
- ⑤庭野吉己、林栄成、山田康友、目代貴之、中村圭祐、菅野太郎、佐々木啓一: 過酸化水素光分解を応用したラジカル殺菌技術のin vivo殺菌活性および安全性評価. 日本防菌防黴学会第39回年次大会、2012年9月11日、東京
- ⑥Niwano, Y., Hayashi, E., Yamada, Y., Mokudai, T., Nakamura, K., Ikai, H., Kanno, T., Sasaki, K.: In vivo evaluation of a new disinfection system utilizing photolysis of hydrogen peroxide. Presented at the Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Summer Seminar 2012 in Sendai, 2012年8月3日
- ⑦林 栄成、目代貴之、山田康友、中村圭祐、菅野太郎、佐々木啓一、庭野吉己: 過酸化水素光分解を応用した新しい殺菌システムの黄色ブドウ球菌に対するin vitroおよびin vivo抗菌活性. 第65回日本酸化ストレス学会学術集会、2012年6月8日、徳島
- ⑧山田康友、目代貴之、中村圭祐、林栄成、菅野太郎、佐々木啓一、庭野吉己: 過酸化水素光分解を利用した新規歯科治療器のラット口腔粘膜および創傷皮膚への局所応用における急性の毒性学的評価. 第65回日本酸化ストレス学会学術集会、2012年6月8日、徳島
- ⑨林栄成、中村圭祐、菅野太郎、目代貴之、岩沢篤朗、河野雅弘、庭野吉己: 過酸化水素光分解殺菌法における微生物の反応動態解析. 第64回日本酸化ストレス学会、2011年7月2日、北海道ルスツ

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.redokuwa.dent.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庭野 吉己 (NIWANO, YOSHIMI)
東北大学・大学院・歯学研究科・教授
研究者番号: 40375184