

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：24701
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011 年～2012 年
課題番号：23660017
研究課題名（和文） スキンケアに向けた組織障害のない新しいタイプの消毒薬の検討
研究課題名（英文） Search for new disinfectants with marginal tissue-toxicity at the skin care
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・講師
研究者番号：60331807

研究成果の概要（和文）：

皮膚に安全で不活化効果の高い消毒薬の開発を念頭に、アルギニン及びアミノ酸誘導体や食品由来天然物質のウイルスや細菌に対する作用を網羅的に調べ、ウイルス不活化作用や殺菌作用、抗ウイルス作用があることを見出した。インビトロでの解析に加えて、体表への表在性ヘルペスウイルス感染症に対してインビボでの効果についても検証した。同時に、医療者の衣服などを汚染したウイルスがもつ伝播力についても実験的な解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

To develop safe and effective disinfectants for the skin care by the use of arginine, amino acid derivatives and natural food-derived products, we have characterized the effect of these compounds on the infectivity of several pathogenic microbes quantitatively and searched for new candidate compounds with disinfectant activities. In addition to these *in vitro* studies, we performed some *in vivo* pilot studies to reveal the effectiveness of these compounds as therapeutic or preventive medicines against the superficial virus infection at the body surface (such as herpetic keratitis and genital herpes) in experimental animal models. We also examined the rate of virus inactivation on the surface of the hospital goods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,000,000	300,000	1,300,000

研究分野：成人看護学・ウイルス学

科研費の分科・細目：看護学・基礎看護学

キーワード：感染制御、消毒薬、アルギニン、アルギニン誘導体

1. 研究開始当初の背景

感染症対策は社会的な重要性を増しつつあるのみならず看護の現場でも恒常的な課題である。看護ケアにおける手洗いや手指の消毒の重要性は繰り返し強調されているが、洗浄剤や消毒剤の頻回の使用は必然的に看護職員の手荒れを生じてくる。私達はアミノ酸のひとつ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）を示すことを見出した。アルギニンは大腸菌への殺菌作用も示し、さらに、弱いレベルであるが抗ウイルス作用も見られた。*In vivo*でのアルギニンの抗微生物活性はこれまでも報告があるが、*in vitro*での直接的な不活化作用は私達の発見である。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考えられるので、*in vitro*の利用だけでなく、体表への表在性ウイルス感染に対する予防・治療薬としての可能性もインフルエンザウイルス感染を例として提案している。これらの研究成果に基づき、本研究課題では実現可能な新たな応用として、新しいタイプの組織障害のないスキンケアに向けた消毒薬としての可能性をアルギニンはじめ種々の食品由来の天然物質について検討した。

2. 研究の目的

アルギニン及びアミノ酸誘導体や食品由来天然物質を用いた皮膚に安全で不活化効果の高い消毒薬の開発を念頭に（1）ウイルス以外の細菌や真菌、原虫などの病原微生物に対する消毒効果の定量的解析、（2）より強力な不活化作用を持つアミノ酸誘導体や食品由来の天然物質の網羅的探索、（3）人工皮膚（ビトロスキン）上での抗ウイルス・抗菌作用を解析し実用化に向けての使用条件を検討すること、の3点を目的とし手研究費の申請を行った。交付金額が減額されたことを

受け、研究目的を上記の（1）と（2）に絞って研究を実施し、下記の成果を得た。

3. 研究の方法

ウイルスには単純ヘルペスウイルス1型 F株（HSV-1）と2型 186株（HSV-2）、インフルエンザウイルス A/Aichi 株、センダイウイルス Z株、ニューキャッスル病ウイルス（NDV）、ポリオウイルス1型セービンワクチン株を、細菌には大腸菌、黄色ブドウ球菌、セラチア、プロテウス、枯草菌を用いた。アルギニンほかの試薬類は10mMクエン酸緩衝液または20mM酢酸緩衝液に溶かしたものを塩酸またはNaOHでpHを正確に調整して用いた。

ウイルス不活化作用の測定には、各種試薬液にウイルスを加え、指示温度で一定時間保温したのちに残存感染性ウイルス量をブラック法で定量し、ダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（PBS）中で保温した対照処理での感染性ウイルス量を基準に比較した。抗ウイルス作用の定量には、試薬のない状態でウイルス吸着をおこなった感染細胞を種々の濃度の試薬を含む培養液中で培養し、得られた子孫ウイルス量をブラック法で定量し、試薬を含まない培養液中で培養した対照試料で得られた子孫ウイルス量を基準に比較した。

4. 研究成果

（1）ウイルス以外の病原微生物に対するアルギニン作用の解明

①0.7 M アルギニンはクエン酸ではウイルス不活化の見られない微酸性条件下（pH 4～4.5）でHSV、インフルエンザウイルス、センダイウイルスを不活化したが、ポリオウイルスやNDVは不活化しなかった。②細菌に対しては、大腸菌ではpH6.0以上と3.5以下でアルギニンによる不活化が見られた。対照に用

いたクエン酸は pH 3.0 以下で弱い不活化を示した。不活化は 4°Cでも見られた。③セラチアでも大腸菌と同様の傾向が見られたが大腸菌ほど顕著ではなく、一方、プロテウスではもともと酸感受性を示したがアルギニンに対しては大腸菌よりもはるかに高い感受性を示した。④黄色ブドウ球菌は酸感受性 (pH3) を全く示さず、アルギニンの効果も全く見られなかった。以上の結果から、ウイルスも細菌もアルギニンの消毒作用を受けるものと受けないものがあり、後者はもともと酸抵抗性が強いことが明らかとなった。

(2) より強い殺ウイルス活性をもつ化合物 (アルギニン誘導体) の系統的な探索

1. ココイルアルギニンエチルエステル (CAE) のウイルス不活化作用

CAE (N α -cocoyl-L-arginine ethylester) はアルギニンとヤシ油脂肪酸から作られた陽イオン性の界面活性剤である CAE は高濃度でも皮膚や眼粘膜に対する組織障害性が少ないことに注目し、塩化ベンザルコニウム (BKC) とドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を対照として、単純ヘルペスウイルスやインフルエンザウイルスポリオウイルスに対する作用を調べ、CAE が細胞毒性の無い濃度でも抗ウイルス作用やウイルス不活化作用を持つことを明らかにした。体表での表在性ウイルス感染症への治療薬として用いる可能性があることの示唆を得ることができた。

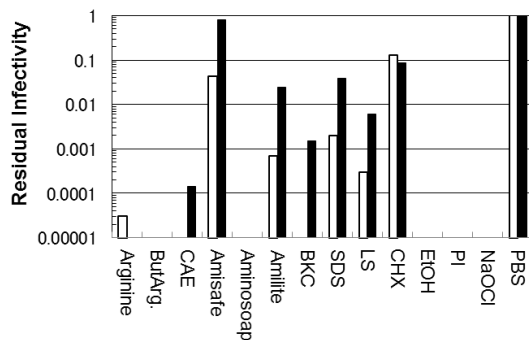


図 1 にタンパク質 (0.1%牛血清アルブミン) 存在下 (黒柱) と非存在下 (白柱) における CAE のインフルエンザウイルス不活化能を種々の消毒剤と比べた結果を示した。CAE は、arginine や butyroyl-L-arginine (ButArg), L-arginine cocoate (Aminosap), ethylalcohol (EtOH), povidone iodine (PI), 次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) と同様に強いウイルス不活化活性を示したが、CAE 同様に界面活性作用をもつアミノ酸誘導体の N-[3-alkyl(12,14)oxy-2-hydroxypropyl]-L-arginine hydrochloride (Amisafe) や potassium N α -Cocoyl-L-glycinate (Amilite)、また、陽イオン界面活性剤 benzalkonium chloride (BKC) や陰イオン界面活性剤の sodium dodecylsulfate (SDS), sodium N α -dodecanoylsarcosinate (LS) などは限定的な不活化作用を示した。Chlorhexidine gluconate (CHX) のインフルエンザウイルスに対する作用も弱かった。

2. カフェ酸の抗ウイルス作用

我々はコーヒーに顕著な抗ウイルス活性とウイルス不活化活性を見出し、カフェ酸、クロロゲン酸、キナ酸などコーヒー成分についてウイルスへの作用を調べてきた。カフェ酸は食品由来成分であり生体への安全性は高いと考えられる。

カフェ酸にウイルス不活性化作用はないがヘルペスウイルス増殖を阻害することを見出し、その阻害様式を解析した。増殖阻害は濃度依存的であり (図 3)、試薬存在下では潜伏期が遷延する。抗ウイルス作用の標的を同定する一助として感染後の試薬添加時期と阻害の効果を比較したところ、カフェ酸の第一義的な標的がウイルスゲノム DNA 複製の開始以前の感染初期過程にあることを明らかにした。

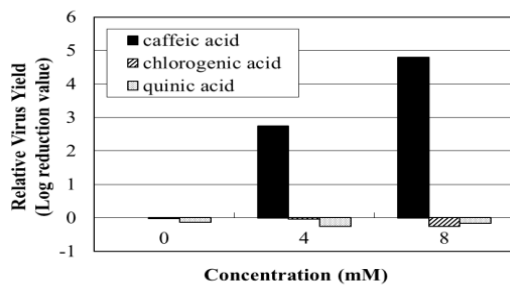


図 3. 各濃度の試薬存在下での HSV-1 収量

3. 種々の有機酸のウイルス不活化作用

ウイルスの酸不活化が用いる有機酸の種類によって影響されることに気付き、有機酸別の不活化効果について系統的に調べた。有機酸は医薬品製造の過程で緩衝液成分として常用されており、各有機酸のウイルスへの作用特性を網羅的に把握することは極めて重要である。そこで緩衝液成分として常用される無機酸、有機酸類、アミノ酸類（リン酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、グルタミン酸、ピロリドンカルボン酸、アスパラギン酸）についてウイルスの酸不活化作用に対する影響をインフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス、ポリオウイルスを用いて網羅的に明らかにした。

4. 性器ヘルペスや角膜ヘルペスに対する塩基性アミノ酸アルギニンの不活化効果

アルギニンはタンパク質構成アミノ酸であり生体への毒性が低いと期待されることから、性器ヘルペスや角膜ヘルペスなど体表への表在性ヘルペスウイルス感染症に対して予防剤または治療剤として使う可能性を示唆した。アルギニンは、ウイルス増殖抑制作用は弱いが、マウスを用いた実験的 HHV-2 性器感染系でのアルギニンの効果を調べたところ、*in vivo* における性器感染成立阻止効果が明瞭に示された。限定的な疾患に対してのみであっても消毒薬を微生物感染の予

防薬または治療薬として用いることができればその意義は大きい。看護の立場からも手指の消毒薬としての広範なニーズがあり、組織障害の少ない病原微生物不活薬の探索とその応用法については、今後も研究の必要性が続くと考えている。

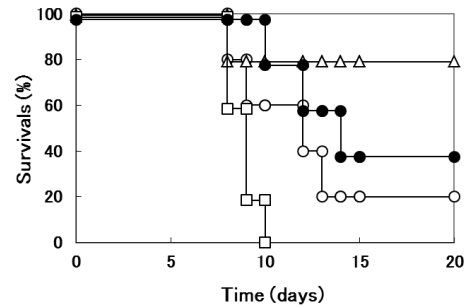


図 5. マウス性器経路からの HHV-2 感染成立に及ぼす作用

Five heads per group of six- to eight-week-old female BALB/c mice were infected with 105 PFU HHV-2 in 10 μ l by vaginal instillation. The infected mice were treated daily as described in Materials and methods by the vaginal instillation with 20 μ l of PBS (○), 1.0 M arginine at pH 3.8 (△), 0.1 M citrate (□) or 0.6 μ g acycloguanosine (●). Numbers of the dead and alive were scored daily.

5. アルギニンとタンパク変性剤とのウイルス不活化様式とを比較検討

アルギニンの作用機構を明らかにする目的で、アルギニンの作用様式とタンパク質変性剤として良く知られている尿素や塩酸グアニジンとのウイルス不活化様式とを比較検討した。アルギニンのウイルス不活化作用が尿素やグアニジンの変性作用とは少し異なっており（図 5）、何かアルギニン特有の相互作用が関与していることを示唆した。

6. アルギニンが天然物質と共存することによる相乗効果

アルギニンによる不活化はカフェ酸など天然物質を共存させることで顕著に増強されることがわかった。

(3) 衣服や医療者を汚染したウイルスがもつ伝播力についての解析

インフルエンザウイルスが、普段着用している衣服を介しての接触伝播の可能性について検討すべく、衣服上に付着させたウイルスの感染価の時間変化について検討した。9点の普段着から得た布片上にウイルス液 10 μ l を接種し、ウイルス感染性の時間変化について精査した。インフルエンザウイルスは、殆どの衣服において時間とともに感染性を失ったが、ウイルス感染価の時間経過は試料により違いがあることがわかった。

臨床関連研究としても多くのウイルスが接触伝播により感染を拡大することからその対策への基礎的データを得る必要がある。つまり体表に汚染した病原微生物は一体どれくらいの時間生存しているのか、ウイルスが持つ体表上の生存時間を知ることである。しかし交付金減額のため、人工皮膚（ビトロスキン）を用いた実用化に向けての条件検討ができなかったため、人体に塗布しても病原的な影響がないクラス I 相当のウイルスを使い、医療者を汚染したウイルスがもつ伝播力についてのビトロの解析を行った。エンベロープウイルスであるインフルエンザウイルス A₀PR8 株 (IAV) とエンベロープウイルスを持たないポリオウイルス I 型生ワクチン株 (PV)、用いて、実験的に手指、看護衣、実験衣、処置用手袋を汚染し感染価の時間変化を調べた IAV、看護衣の感染価減少時間の違いがあることがわかった。処置用手袋は 120 分でもおよそ 10^{-2} までしか減少せず、PV では、実験衣も看護衣も共に 40 分でも減少は少なく、手袋は感染価の減少は見られなかった。手指への IAV の汚染では 5 分で 10^{-3} まで急速な減少が見られたが PV の汚染では感染価の減少は徐々にしか進まず時間を要

することがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- (1) Ikeda K, Yamasaki Y, Minami S, Suzuki Y, Tsujimoto K, Sekino Y, Irie H, Arakawa T and Koyama AH: Arginine inactivates *human herpesvirus 2* and inhibits genital herpesvirus infection. *International Journal of Molecular Medicine*, 査読有,30, 1307-1312, 2012.
- (2) Nishide N, Tsujimoto K, Uozaki M, Ikeda K, Yamasaki H, Koyama AH and Arakawa A: Effects of electrolytes on Virus inactivation by acid solutions. *International Journal of Molecular Medicine*, 査読有,27, 803-809, 2011.
- (3) Ikeda K, Tsujimoto K, Uozaki M, Nishide M, Suzuki Y, Koyama AH and Yamasaki H: Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. *International Journal of Molecular Medicine*, 査読有,28, 595-598, 2011.
- (4) Yamasaki H, Tsujimoto K, Ikeda K, Suzuki Y, Arakawa T and Koyama AH: Antiviral and virucidal activities of cocoylarginine-ethylester. *Advances in Virology*, 査読有, Volume 2011, Article ID 572868, 6 pages, doi:10.1155/2011 572868.

[学会発表] (計 25 件)

- (1) 池田敬子, 辻本和子, 小山 一: 医療者を汚染したウイルスがもつ伝播力についてのビトロの解析. 第 28 日本環境感染学会総会. 2013. 3, 横浜市.
- (2) 辻本和子, 池田敬子, 小山 一: 生活環

- 境下で物品に付着したウイルスの経時的な感染性の変化の定量的解析. 第 28 日本環境感染学会総会. 2013. 3, 横浜市.
- (3) 西出充徳、辻本和子、池田敬子、山崎尚、入江宏、小山一：インフルエンザウイルス株間で見出されたアルギニン感受性差についての解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 2012. 9, 大阪.
- (4) 辻本和子、西出充徳、池田敬子、魚崎操、山崎尚、入江宏、小山一：ポリフェノールによる単純ヘルペスウイルス増殖の阻害. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 2012. 9, 大阪.
- (5) 池田敬子、辻本和子、山崎尚、魚崎操、西出充徳、小山一：微酸性アルギニンのウイルス不活化作用機構についての解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 2012. 9, 大阪.
- (6) Tsujimoto K, Ikeda K, Suzuki Y, Yamasaki H, Nishide M, Yoshida M, Arakawa T and Koyama AH: New, safe, effective and convenient virucidal agents using amino acid. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012. 9, San Francisco, San Francisco, USA.
- (7) Ikeda K, Tsujimoto K, Yamasaki H, Suzuki Y, Naito T, Irie H, Arakawa T and Koyama AH: Acidic arginine as a new antiviral strategy against body surface herpetic infection. The 115th American Society for Microbiology, 2012. 6, San Francisco, USA.
- (8) 辻本和子, 池田敬子, 小山一：A 型インフルエンザウイルス株間に見られた酸感受性の差異. 第 27 日本環境感染学会. 2012. 2, 福岡市.
- (9) 池田敬子, 辻本和子, 小山一：衣服についたインフルエンザウイルスのもつ感染性の時間変化. 第 27 日本環境感染学会. 2012. 2, 福岡市.
- (10) 辻本和子, 池田敬子, 山崎尚, 小山一：界面活性作用のあるアミノ酸誘導体のウイルス不活化作用についての解析. 第 26 回ヘルペスウイルス研究会. 2011. 6, 大阪市
- (11) 池田敬子, 辻本和子, 西出充徳, 鈴木幸子, 山崎尚, 荒川 勉, 小山一：Effects of organic acids on the infectivity of viruses. 第 34 回日本分子生物学会年会. 2011. 12, 横浜市.
- (12) 辻本和子, 池田敬子, 山崎尚, 小山一：組織障害作用の少ない界面活性剤のウイルス不活化活性の解析. 臨床ウイルス学会, 2011. 6, 津市.
- (13) 辻本和子, 池田敬子, 山崎 尚, 荒川 勉, 小山一：組織障害の少ないウイルス不活化薬としてのアミノ酸誘導体についての解析. 第 21 回抗ウイルス療法研究会, 2011. 5, 金沢市.
- (14) 池田敬子, 辻本和子, 山崎 尚, 鈴木幸子, 小山一：微酸性アルギニンを用いた表在性ウイルス感染症の予防・治療の可能性. 第 21 回抗ウイルス療法研究会, 2011. 5, 金沢市.
- (15) Tsujimoto K, Ikeda K, Yamasaki H, Uozaki M, Nishide M, Irie H and Koyama AH：Virus inactivation by non-cytotoxic arginine-derivatives with detergent activity. The 15th International Congress of Virology, 2011. 9, Sapporo.
- (16) Yamasaki H, Ikeda K, Tsujimoto K, Uozaki M, Irie H and Koyama AH：

Inhibition of a multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. The 15th International Congress of Virology, 2011. 9, Sapporo.

(17) Nishide M, Tsujimoto K, Ikeda K, Yamasaki H and Koyama AH : Antiviral and virucidal activities of common vegetables and fruits in Wakayama. The 15th International Congress of Virology, 2011. 9, Sapporo.

(18) Ikeda K, Tsujimoto K, Yamasaki H, Suzuki Y, Naito T, Irie T and Koyama AH : Antiviral use of acidic arginine against the infection on body surface. The 15th International Congress of Virology, 2011. 9, Sapporo.

(19) Ikeda K, Tsujimoto K, Yamasaki H, Suzuki Y, Naito T, Irie H and Koyama AH : New method to access preventive effects of agents on herpetic keratitis. The 36th International Herpesvirus Workshop, 2011. 7, Dudansuk, Poland.

(20) Yamasaki H, Tsujimoto K, Ikeda K, Nishide M, Irie H, Koyama AH : Characterization as antiviral agents of arginine-derivatives with detergent activity. The 36th International Herpesvirus Workshop, 2011. 7, Dudansuk, Poland.

[図書] (計 1 件)

(1) Ikeda K, Yamasaki H, Minami S, Naito T, Irie H, Arakawa T and Koyama AH : Virucidal ability of arginine and its possible application as an antiherpetic agent. *From the Hallowed Halls of Herpesvirology*. Imperial College Press, London(UK), 2011. p435-449.

[その他]

(1) 池田敬子, 小山 一 : 平成 24 年 1 月 28 日朝日新聞 (和歌山版) 掲載.

(2) 池田敬子 : 平成 24 年 2 月 21 日テレビ和歌山放送.

6. 研究組織

(1) 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・講師
研究者番号 : 60331807

(2) 研究分担者

① 小山 一 (KOYAMA HAJIME)
和歌山信愛女子短期大学・学長 (教授)
研究者番号 : 80109074

② 鈴木 幸子 (SUZUKI YUKIKO)
和歌山県立医科大学保健看護学部・教授
研究者番号 : 60285319