

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870476

研究課題名(和文)再生医療の実用化に資する殺菌性光異性化分子を応用した滅菌技術の構築

研究課題名(英文)Construction of sterilization technique based on the use of bactericidal isomerizable derivatives for practical application of regenerative medicine

研究代表者

白井 昭博 (SHIRAI, Akihiro)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号：40380117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：紫外線-A(UV-A)照射による殺菌活性は、光異性化性のp-クマル酸とフェルラ酸の誘導体を併用することにより向上した。合成した誘導体は、メチル基、ブチル基、フェニル基、L-チロシン塩酸tert-ブチルエステルをフェノール酸のカルボキシル基に結合させた。合成した化合物(4a-c、8、14)の中で化合物14が、大腸菌に対する光殺菌性試験において最も高い相乗殺菌活性を示した。そして、その殺菌力は、ラジカルスカベンジャーの添加により著しく低下したため、併用殺菌機構に活性酸素種(ROS)が関与していることが示唆された。さらに、フローサイトメトリー法により細胞内ROSの過剰生成を証明した。

研究成果の概要(英文)：Ultraviolet-A (UV-A)-mediated bactericidal activity was enhanced by combined treatment with isomerizable derivatives of p-coumaric acid and trans-ferulic acid. Synthesized derivatives contain methyl, butyl or phenyl group or an L-tyrosine HCl tert-butyl ester, respectively, linked to the carboxyl group of phenolic acid. Of the synthesized compounds, 14 exhibited the highest synergistic activity in a photobactericidal assay based on treating *Escherichia coli* with a derivative compound and UV-A irradiation (wavelength 350-385 nm). Addition of antioxidants significantly suppressed photosynergistic bactericidal activity, suggesting that reactive oxygen species (ROS) are involved in the combined bactericidal mechanism. Flow cytometry revealed that combined treatment with UV-A and compound 14, which showed the highest photobactericidal activity, generates an excess of oxidative radicals in bacterial cells.

研究分野：化学

キーワード：光殺菌 光異性化化合物 活性酸素種 近紫外線

1. 研究開始当初の背景

ヒトあるいは他の動物から調製・製造される血液、血清、成長因子、免疫グロブリンなどのタンパク質様材料製品から、細菌、真菌、ウイルス、マイコプラズマ、異常プリオンなどによるコンタミネーションを除去することは極めて重要である。この問題は、ノーベル賞受賞を契機に今後実用化に向けた研究の進展が更に期待される、山中教授により開発されたiPS細胞を用いた再生医療分野においても重要な懸案事項である。再生医療は、自分自身の細胞やドナーの細胞の体性幹細胞を人工培養後、体に戻し機能回復させる治療法、そして分化万能性を持つiPS細胞を利用する治療法、すなわち細胞治療による医療であり、難治性疾患の治療や、早期段階での変性疾患の予防治療が可能となる医療として期待を集めている。しかし、再生医療は、患者やドナーの細胞を採取し用いるため、細胞が細菌、真菌やウイルスに汚染されている可能性は高い。さらに、細胞採取から最終細胞加工製品を得るまでに細胞の樹立、維持、増幅、分化誘導という多くのステップを踏まなければならないために、微生物汚染リスクは非常に高い。従って、再生医療の実用化には、品質・安全性が確保された最終細胞加工製品を提供するために、採取した細胞の細菌、真菌、ウイルスによるコンタミネーションの除去、そして培養・加工工程における微生物の除去を如何にして達成するのか、つまり細胞の微生物滅菌法の確立が大命題である。

2. 研究の目的

iPS細胞の開発は、受精卵やES細胞を使用せず分化万能細胞を単離・培養することを可能とし、難治性疾患や変性疾患に対する再生医療を飛躍的に進歩させるであろう。しかし、この夢のような技術を用い作製した細胞、組織、器官の移植・投与までの過程の中で最も危惧されることがある。それは、細胞採取から培養過程における生細胞の微生物(細菌、真菌およびウイルスなど)によるコンタミネーションである。本研究は、ウイルス感染細胞の不活性化に着眼し、感染細胞における細胞内応答性と光異性化分子の細胞不活性化を利用した滅菌技術を構築することを目的とし、再生医療における最終細胞加工製品の品質および安全性を確保するための研究である。

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

光異性化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、積算UVメーター(UIT-250、ウシオ電気株式会社)を用い、測定時間は瞬時とし、LED素子と測定部との距離は65mmとした。

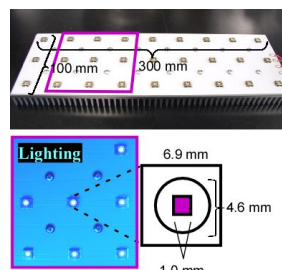


図1 LED照射装置の外観

(2)光異性化特性を有するp-クマル酸とフェルラ酸誘導体の合成

近紫外線で光異性化を示す3-(4-ヒドロキシフェニル)-2-プロペン酸を基本骨格とする誘導体の合成法は、文献¹を参考にを行った(図2)。

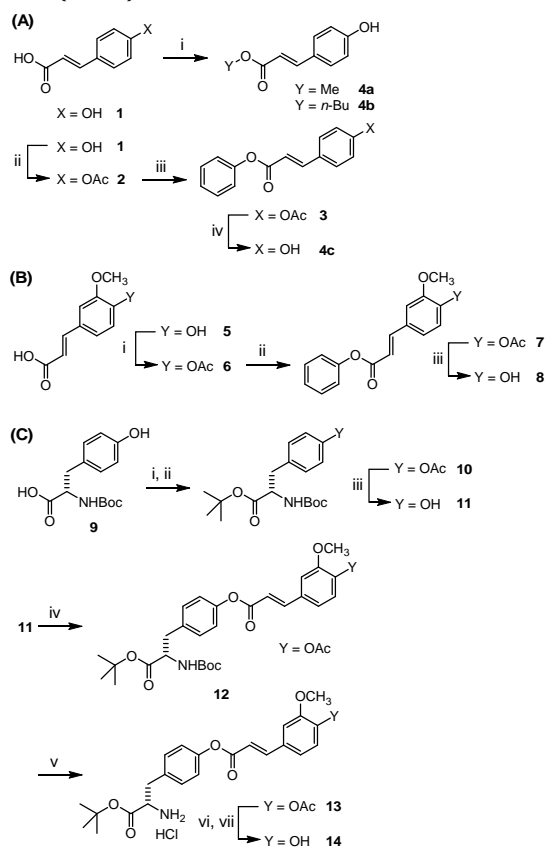


図2 p-クマル酸とフェルラ酸誘導体の合成経路

(A): (i) conc. H_2SO_4 , MeOH, reflux, 6 h, 79% (4a) or conc. H_2SO_4 , n-BuOH, reflux, 6 h, 76% (4b); (ii) acetic anhydride, pyridine, 4 to rt, 3 h, 88% (2); (iii) oxalyl dichloride, phenol crystal, TEA, DMF, DCM, rt, 2 h, 86% (3); (iv) 35% hydrazine hydrate, AN, rt, 30 min, 80% (4c).

(B): (i) acetic anhydride, pyridine, 4 to rt, 5 h, 93% (6); (ii) oxalyl dichloride, phenol crystal, TEA, DMF, DCM, rt, 2 h, 88% (7); (iii) 35% hydrazine hydrate, THF, rt, 30 min, quant. (8).

(C): (i) acetic anhydride, pyridine, 4 to rt, 4 h; (ii) acetylated-9, tert-BuOH, DCC,

DMAP, DCM, 4 to rt, 18 h, 79% (10); (iii) 35% hydrazine hydrate, AN, rt, 30 min, 63% (11); (iv) 6, WSCI, DMAP, AN, rt, 22 h, 65% (12); (v) 10% TFA in DCM, 4 to rt, 11 h, 70% (13); (vi) 35% hydrazine hydrate, AN, 4 to rt, 50 min; (vii) sat. NH_4Cl aq., 75% (14).

(3) 合成化合物と近紫外線の併用による大腸菌に対する光殺菌力評価

試験菌は *Escherichia coli* NBRC 12713 (大腸菌) を使用した。菌株の培養は、LB 培地で 17 時間培養し、 $6570 \times g, 4$ で集菌および生理食塩水で洗菌し、滅菌イオン交換水で再懸濁した。48 well plate に化合物濃度を 100 μM 、細菌濃度を 10^6 CFUs/ml に調製した (全量 500 μl)。UV-A 照射は、溶液界面から 65 mm 離れた上部から 30 で行った (図 3)。生菌数は、SCDLP 培地、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 SCDLP 寒天培地に塗布し、48 時間培養後、コロニーカウントし、殺菌力を下記式で求めた。

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

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

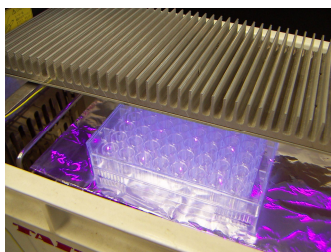


図 3 LED 照射装置による殺菌試験の様子 (照射距離 65 mm)

(4) 光殺菌性能における活性酸素種 (ROS) の影響

ROS 消去剤は、ウシ肝臓由来カタラーゼ (H_2O_2 阻害剤; Wako)、N-アセチルシステイン (NAC) を使用し、殺菌処理温度は 37 とした。非酵素基質として、アルブミン (from bovine serum, Cohn fraction V, pH 7.0; Wako) をカタラーゼと同じ重量濃度となるように加えた。

(5) 細胞内 ROS 生成のフローサイトメトリー解析

蛍光プローブは、Hydroxyphenyl fluorescein (Sekisui Medical) を用いた。プローブを取り込ませた大腸菌を UV-A 照射 (7.4 J/cm^2) もしくは無照射 (30 分間) 条件下、化合物 100 μM で処理した。その後、フローサイトメトリー法 (FACSVerseTM, BD Biosciences) による細胞解析を行った。

4. 研究成果

(1) 近紫外 LED 装置の放射スペクトルと強度

当研究室の LED 照射装置の放射スペクトルおよび瞬時にける強度測定を行った。その結果、図 4 のようにピーク波長は 365 nm であり、近紫外領域での積算強度は 4.09 mW/cm^2 であった。

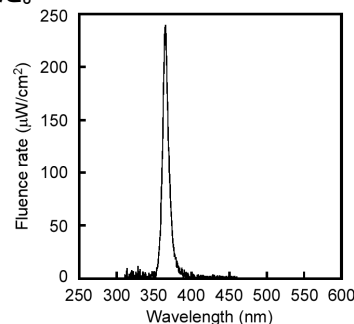
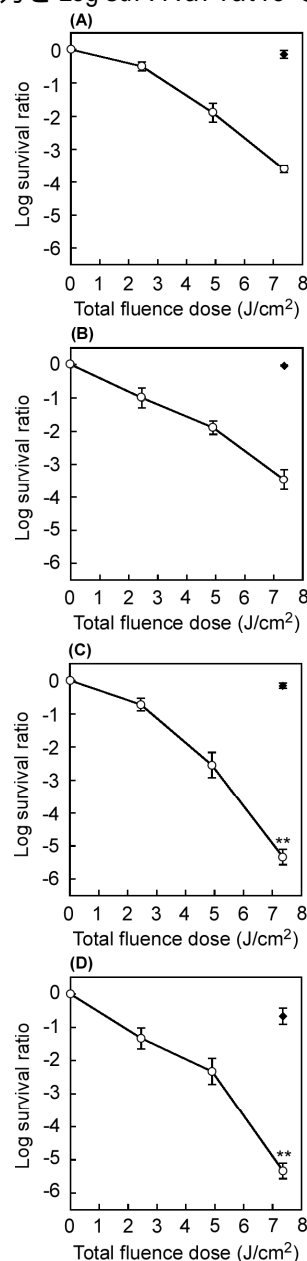


図 4 LED 放射スペクトル

(2) 近紫外線と化合物 (1, 4a-c, 5, 8, 14) の併用殺菌効果

図 5 に化合物 1、4a-c と UV-A 併用した場合の殺菌力を Log survival ratio で示した。



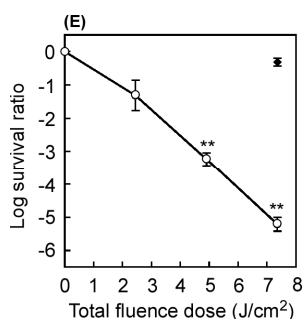


図 5 p-クマル酸誘導体(100 µM)と UV-A 併用時の殺菌効果

○, UV-A 照射あり; □, 無照射(30分接触)
(A), 化合物なし; (B), 1; (C), 4a; (D), 4b; (E), 4c. ** $P < 0.01$

UV-A 照射のみで 30 分処理 (7.4 J/cm^2) した場合、 3.60 log の生菌数を減少させた。化合物 1 を併用した場合は、UV-A の殺菌力を有意に上昇させなかった。一方、化合物 4a-c を併用した場合は、 7.4 J/cm^2 で 5.0 log 以上の生菌数を減少させた。無照射条件では化合物添加による殺菌性がほとんどないことから、UV-A と化合物を併用することにより相乗的殺菌効果が得られることが分かった。中でも、p-クマル酸フェニルエステル 4c は、 4.9 J/cm^2 で 3.2 log 減少させ、最も高い相乗効果を示すことが分かった。このことは、フェニル基を導入したことにより、化合物の紫外吸収スペクトルが赤外にシフトしたことに起因すると考えられた。

そこで、4c の紫外吸収スペクトルと同様のスペクトルを示すフェルラ酸をリード化合物として、化合物 8 と 14 を合成し、光殺菌性を評価した (図 6)。

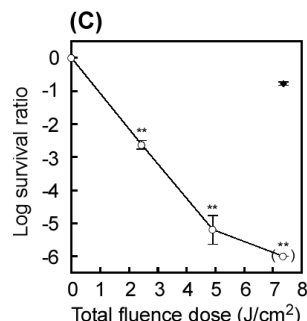
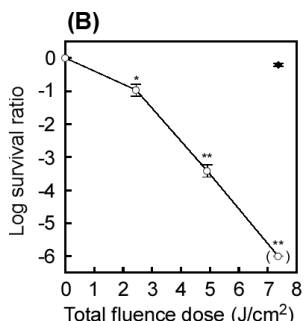
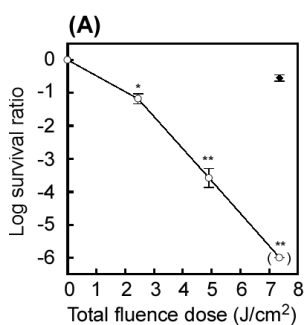


図 6 フェルラ酸誘導体(100 µM)と UV-A 併用時の殺菌効果

○, UV-A 照射あり; □, 無照射(30分接触)
(A), 5; (B), 8; (C), 14. ** $P < 0.01$

図 5(A)の殺菌力と比較すると、化合物 5、8、14 と UV-A を併用した場合、 2.5 J/cm^2 以上の照射量で有意な殺菌力の向上を示した。 7.4 J/cm^2 では、生菌数を 10 CFUs/ml 未満に減少させた。これら化合物を無照射条件で用いた場合、殺菌性がほとんどないことから、UV-A と化合物を併用することにより相乗的殺菌効果が得られることが分かった。中でも、14 は、 4.9 J/cm^2 で 5.19 log 減少させ、最も高い相乗効果を示すことが分かった。

以上の結果より、光異性化特性を有する p-クマル酸やフェルラ酸をリード化合物とする誘導体は、UV-A の光殺菌性を高めることが分かった。そして、カチオン性部位を有する L-チロシンで修飾した化合物 14 は、最も高い相乗殺菌力を示した。このことは、一般的に細胞膜はアニオン性であることから、静電的相互作用による化合物の吸着が高い殺菌力に影響したのではないかと考えた。

次に、化合物 14 の詳細な光殺菌力を調べるため、 7.4 J/cm^2 光量における添加濃度の影響を調べた (図 7)。

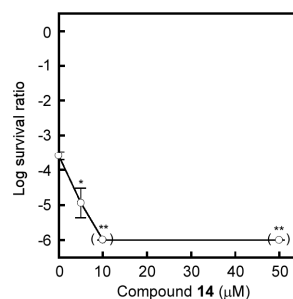


図 7 化合物 14 と UV-A (7.4 J/cm^2) 併用時の殺菌効果 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

化合物 14 を 10 µM 以上で添加した場合、生菌数を 10 CFUs/ml 未満まで減少させることが分かった。また、 5 µM においても 4.95 log 減少させ、強い光相乗殺菌力を有することが分かった。

(3) 光殺菌性能における活性酸素種 (ROS) の影響

p-クマル酸をリード化合物とする誘導体である化合物 4c について、光殺菌における ROS の影響を調べた (図 8)。

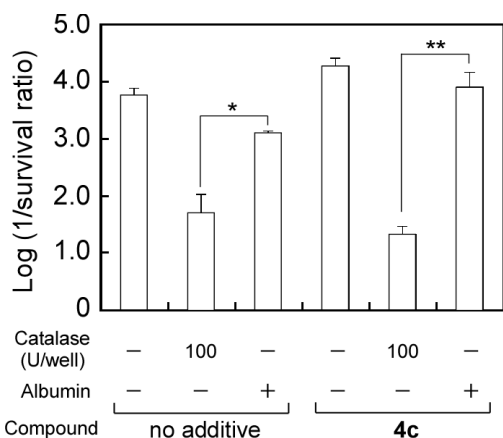


図8 大腸菌の光不活化活性における ROS の影響. 化合物濃度は 100 μ M、光照射量は 7.4 J/cm² (**P*<0.05、***P*<0.01)

UV-A 照射のみの処理および化合物 **4c** を併用した殺菌処理においてカタラーゼを加えた結果、殺菌力を有意に低下させることが分かった。そして、添加したカタラーゼと同じ重量濃度のアルブミンを加えた場合、殺菌力は有意に回復することが分かった。以上の結果より、UV-A 光殺菌は、ROS が寄与していることが示唆された。

次に、フェルラ酸 **5** とその誘導体である化合物 (**8**、**14**) についても同様に ROS の影響を調べた (図 9)。

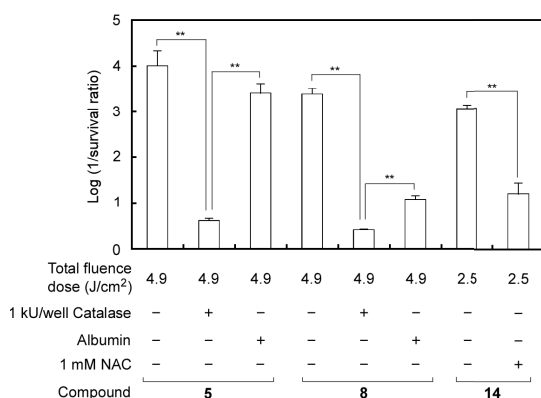


図9 大腸菌の光不活化活性における ROS の影響. 化合物濃度は 100 μ M (**P*<0.05、***P*<0.01)

化合物 **5** と **8** は、カタラーゼを添加した条件で光殺菌力が著しく低下し、同じ重量濃度のアルブミンを添加すると殺菌力は回復した。従って、光殺菌機構において ROS の酸化的作用が関与していることが示唆された。一方、化合物 **14** は、カタラーゼでは殺菌力の有意な低下を示さなかった (データ示さず)。そこで、細胞透過性のラジカルスカベンジャーである NAC 存在下での光殺菌力を調べた。その結果、殺菌力の有意な低下を示した。以上の結果より、フェルラ酸をリード化合物とする誘導体を併用した UV-A 光殺菌は、ROS が寄与していることが示唆された。また、化合物 **14** は、カタラーゼの作用による殺菌阻害

を示さなかったことから、合成化合物の中でカチオン部位を唯一有するその化合物は、異なる殺菌作用機構を有するのではないかと考えた。そこで、細胞内での ROS 生成をフローサイトメトリー法により検討した。

(4) UV-A 照射による細胞内 ROS 生成

化合物 **14** と UV-A を併用した殺菌において、細胞透過性の NAC の添加が併用殺菌効果を著しく低下させたことから、細胞内 ROS 生成に影響を及ぼしていることが考えられた。そこで、ヒドロキシラジカルのような強い酸化性物質に特異的に反応する蛍光プローブを用い、細胞内 ROS 蛍光強度レベルを評価した (図 10)。

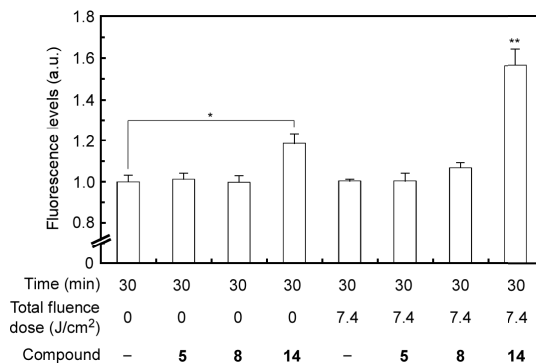


図10 細胞内蛍光レベルの変化 (**P*<0.05、***P*<0.01)

化合物 **14** と UV-A 照射を併用した場合、化合物なし (無照射) の蛍光強度と比較して、1.56 倍の蛍光増加を認めた。また、化合物 **14** (無照射) で処理した場合、1.19 倍の有意な増加を認めた。化合物 **14** は、合成化合物の中でカチオン部位を有する唯一の化合物であり、その特性が細胞膜との静電的相互作用を引き起こし、そして光照射により、細胞内にヒドロキシラジカルのような高い酸化性 ROS を過剰生成させることが分かった。このような機構が、化合物 **14** の強い光相乗殺菌力を誘導していることが示唆された。

p-クマル酸およびフェルラ酸のような光異性化部位を有する誘導体は、UV-A 光殺菌性能を著しく高め、その殺菌機構には ROS が関与していることが分かった。そして、分子設計において、その誘導体がカチオン特性を有する場合、細胞膜との静電的相互作用も加わり、光相乗殺菌性能は極めて高くなることが分かった。

<引用文献>

- Nakamura, K., E. Nomura and H. Taniguchi (2001) Chemical properties of acyl groups on phenolic hydroxyl group of tyrosine. *Peptide Sci.* 38, 43-46.
 Narasimhan, B., D. Belsare, D. Pharande, V. Mourya and A. Dhake (2004) Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations, *Eur.*

J. Med. Chem. 39, 827-834.
Ergün, B.Ç., T. Çoban, F. K. Onurdag and E. Banoglu (2011) Synthesis, antioxidant and antimicrobial evaluation of simple aromatic esters of ferulic acid, Arch. Pharm. Res. 34, 1251-1261.
Fan, Q., H. Jiang, E.-d. Yuan, J.-X. Zhang, Z.-X. Ning, S.-J. Qi and Q.-Y. Wei (2012) Tyrosinase inhibitory effects and antioxidative activities of novel cinnamoyl amides with amino acid ester moiety, Food Chemistry. 134, 1081-1087.
Nakamura, K., T. Nakajima, T. Aoyama, S. Okitsu and M. Koyama (2014) One-pot esterification and amidation of phenolic acids. Tetrahedron. 70, 8097-8107.

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 6 件)

Akihiro Shirai, Masayoshi Onitsuka, Hideaki Maseda and Takeshi Omasa, Effect of polyphenols on reactive oxygen species production and cell growth of human dermal fibroblasts after irradiation with ultraviolet-A light, Biocontrol Sci., 査読有, Vol.20, No.1, 27-33, 2015, doi.org/10.4265/bio.20.27.

Akihiro Shirai, Mutsumi Aihara, Akira Takahashi, Hideaki Maseda and Takeshi Omasa, Synergistic antimicrobial activity based on the combined use of a gemini-quaternary ammonium compound and ultraviolet A light, J. Photochem. Photobiol. B, 査読有, Vol.130, 226-233, 2014, doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.11.027.

Akihiro Shirai, Toshiyuki Endo, Hideaki Maseda and Takeshi Omasa, Synthesis of thiazole derivatives and evaluation of their antiamebic activity and cytotoxicity, Biocontrol Sci., 査読有, Vol.18, No.4, 183-191, 2013, doi.org/10.4265/bio.18.183.

Akihiro Shirai, Yasuko Fumoto, Tomoaki Shouno, Hideaki Maseda and Takeshi Omasa, Synthesis and biological properties of thiazolyl-acetic acid derivatives as possible antimicrobial agents, Biocontrol Sci., 査読有, Vol.18, No.2, 59-73, 2013, doi.org/10.4265/bio.18.59.

[学会発表](計 23 件)

白井 昭博, 松村 恭平, 梶浦 雅斗, 間世田 英明, 大政 健史, フォトクロミック分子を応用した光応答型殺菌剤の開発, LED 総合

フォーラム 2014-2015 in 徳島 論文集, No.P-8, 121-122 頁, 2015 年 1 月 10 日, 徳島大学工学部(徳島県徳島市).

白井 昭博, 光反応と有機系化合物による微生物制御, 第 4 回次世代ものづくり基盤技術産業展 TECH Biz EXPO 2014, 研究シーズ発表会, 2014 年 10 月 22 日, ポートメッセなごや(愛知県名古屋市).

Akihiro Shirai, Kyohei Matsumura, Masayoshi Onitsuka, Hideaki Maseda and Takeshi Omasa, Application of photochromism to the molecular design of antimicrobial agents: synthesis of phenolic derivatives and their bactericidal activity based on a photo-reaction with ultraviolet-A light, III International Conference on Antimicrobial Research (ICAR2014), p.289, Madrid, Oct. 1st, 2014, Complutense University of Madrid, マドリード(スペイン)

白井 昭博, 松村 恭平, 鬼塚 正義, 間世田 英明, 大政 健史, 新規抗菌剤の分子設計におけるフォトクロミック特性の応用, 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会, 55 頁, 2014 年 9 月 24 日, きゅりあん(東京都品川区)

白井 昭博, 有害微生物の制御とその殺菌機構の解明, 第 3 回次世代ものづくり基盤技術産業展 TECH Biz EXPO 2013, 学術研究技術シーズ発表会, 2013 年 10 月 9 日, ポートメッセなごや(愛知県名古屋市).

白井 昭博, 間世田 英明, 大政 健史, ジェミニ型抗菌剤ハイジェニアと UVA 波長光を併用することによる相乗殺菌効果とその殺菌機構の解明, 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会要旨集, No.10Pp-44, 81 頁, 2013 年 9 月 10 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市).

白井 昭博, 間世田 英明, 大政 健史, ジェミニ型抗菌剤ハイジェニアと LED 近紫外光の併用による相乗殺菌効果とその殺菌機構の解明, LED 総合フォーラム 2013 in 徳島 論文集, No.P-8, 73-74 頁, 2013 年 4 月 27 日, あわぎんホール(徳島県徳島市).

6. 研究組織

(1)研究代表者

白井 昭博(SHIRAI Akihiro)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号: 40380117