

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893019

研究課題名(和文)ポリフェノールへの光照射により発揮される新しい感染創傷治療法の提案

研究課題名(英文)Development of a novel treatment for infected wound based on photo-irradiation of polyphenols

研究代表者

白土 翠 (SHIRATO, Midori)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：60708501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ポリフェノール的一种であるプロアントシアニジン(PA)が有する細胞増殖促進効果の検証を行った。試験にはヒト歯肉線維芽細胞を使用した。試験の結果、PAは濃度依存的に細胞増殖促進効果を発揮することが分かった。更に、純水・滅菌生理食塩水・血清無添加培地に暴露させストレスを負荷する条件では、PAにて短時間処理を行うことで細胞保護効果を発揮し、生存細胞減少の抑制および細胞内で生成される活性酸素の上昇抑制が確認された。以上の結果から、細胞増殖促進効果による創傷の治癒促進だけでなく、細胞保護効果により生体へのダメージを軽減できる可能性が示され、感染創傷治療におけるPAの有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, an effect of proanthocyanidin (PA), one of polyphenols, on proliferation of human gingival fibroblast was investigated. It was found that PA accelerated the cell proliferation depending on the concentration. Under the harsh conditions, such as exposure to osmotic stress, starvation stress and serum deprivation stress, the short-time pretreatment with polyphenols exerted cytoprotective effect by means of suppression of yield of reactive oxygen species produced in the cells. These findings suggest that PA which exerts not only facilitatory effect of cell proliferation but also cytoprotective effect may be applied to treatment for infected wound.

研究分野：歯科補綴

キーワード：ポリフェノール 過酸化水素光分解殺菌 ヒドロキシルラジカル プロアントシアニジン

1. 研究開始当初の背景

これまで当分野では、過酸化水素を光分解する際に生成するヒドロキシルラジカルや光感受性物質を光励起する際に生成する一重項酸素などの活性酸素を殺菌に応用する研究を行ってきた。そのような中、没食子酸やプロアントシアニジンのようなポリフェノールへの光照射によりフェノール性水酸基が酸化され、放出したプロトンと電子が溶解酸素を還元することにより過酸化水素が生成し、さらに過酸化水素が光分解することで生成するヒドロキシルラジカルが短時間で殺菌作用を発揮することを見出した(Nakamura et al. PLoS ONE. 2013; 8(3): e60053)。図1に想定殺菌作用機序を示す。

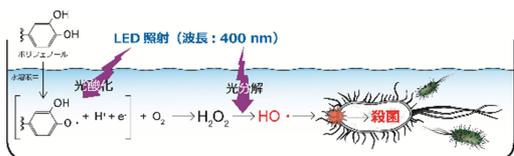


図1. ヒドロキシルラジカルの作用機序

本成果は「ポリフェノールへの青色可視光照射により生成される活性酸素を応用した新規殺菌技術」として第39回防菌防黴学会にて発表し、ポスター賞を受賞(2012)した。さらに、過酸化水素光分解殺菌技術の安全性評価をラット全層皮膚欠損モデルで行った試験において、創傷治癒が促進される傾向にあったことから(Yamada et al. J Toxicol Sci. 2012; 37: 329-335)、活性酸素の短期暴露で肉芽組織を形成する線維芽細胞の増殖が促進されるのではないかと仮説を立て、ポリフェノールへの光照射が線維芽細胞におよぼす影響を検討した。図2に、プロアントシアニジンでマウス線維芽細胞を1分間処理した後の細胞増殖を検討した結果を示す。

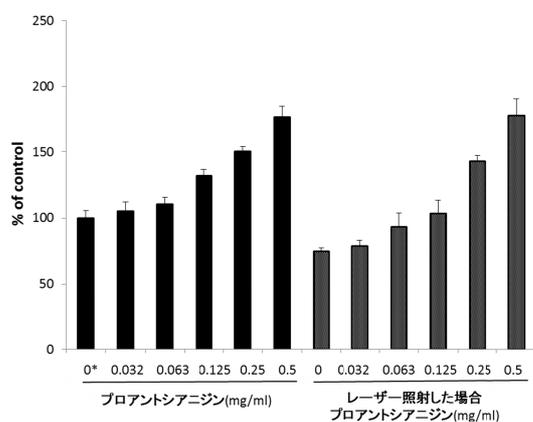


図2. プロアントシアニジン1分処理における細胞増殖

驚くべきことに、レーザー光を同時に照射した場合のみならず、照射しない条件でも1分間という短時間処理でプロアントシアニジンの濃度に依存して線維芽細胞の増殖が促進されることを見出した。本発見は、プロアントシアニジンのようなポリフェノールを短時間処理しただけで創傷治癒が促進され

ることを強く示唆しており、医学的有用性が非常に高いと考えられる。

2. 研究の目的

これまでの研究でポリフェノールは光分解により過酸化水素を生成し、更にその過酸化水素の光分解によりヒドロキシルラジカルが生成し短時間で殺菌作用を発揮すること。ラット全層皮膚欠損モデルを用いて行った安全性評価試験にて、創傷治癒の促進傾向が認められ、活性酸素の短期暴露により肉芽組織を形成する線維芽細胞の増殖が促進される可能性があることが分かってきた。食品由来の成分で安全性が担保されているポリフェノールが、光の照射で抗菌活性を発揮し、光の停止で創傷治癒効果を発現するのであれば様々な分野への応用が期待される。特に医療の分野においては、例えば感染創傷部位にポリフェノールを塗布し一定時間光を照射することにより、殺菌と創部の治癒促進を同時に行うというこれまでにないアプローチが可能になると考えられ、非常に有益である。そこで本研究では、ヒト歯肉線維芽細胞を中心にその他いくつかの異なる細胞を用い、ポリフェノールを用いた創傷治癒促進効果の検証を行うこと、ラット局所創傷感染モデルを用いてポリフェノールへの光照射による殺菌効果と創傷治癒促進効果の検証を行い、最終的にはポリフェノールへの光照射による殺菌と、創傷治癒との両面を併せ持った新しい技術を開発するための基礎的検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、マウス歯肉線維芽細胞およびヒト歯肉線維芽細胞(HGF)による予備試験において細胞増殖促進効果が高かったプロアントシアニジン(PA)についてヒト歯肉線維芽細胞におけるより詳細な検証を行う。

ヒト歯肉線維芽細胞は、 2×10^4 cells/mlで96穴プレートに100 μ l播種し、37、5% CO₂条件下のインキュベーター内で培養したものを使用した。また、プロアントシアニジンは生理食塩水に溶解して使用した。

(1) プロアントシアニジンにて1分間前処理を行った場合の細胞増殖促進作用の検証

24時間培養したヒト歯肉線維芽細胞が20~40%コンフルエントになっていることを確認し、プロアントシアニジンにて1分間処理を行った。プロアントシアニジンの処理濃度は0.063、0.125、0.25、0.5、1.0(mg/ml)とした。処理後、更に24時間培養し、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)法にて生存細胞を観察し、細胞増殖の程度を確認した。

(2) 各ストレス負荷条件における細胞保護

効果の検証

プロアントシアニジンの細胞保護効果が示唆される結果が認められたため、ヒト歯肉線維芽細胞にストレスを負荷し、細胞保護効果の検証を行う。各ストレス条件（純水：Osmotic stress、滅菌生理食塩水：Starvation stress、血清無添加培地：Serum deprivation stress）下でのプロアントシアニン(1mg/ml)処理の効果を以下の3つの設定で検証した。

純水または滅菌生理食塩水に暴露する際のプロアントシアニン同時処理の効果

20～40%コンフルエントの状態になった細胞の培地を純水またはプロアントシアニンを加えた純水に置き換え、室温で一定時間留置する（1, 4, 16分）、洗浄後、新しい培地に置き換え、24時間培養する。滅菌生理食塩水も同様に（1, 2, 3時間）暴露させ、新しい培地に置き換えた後、培養する。培養後、生存細胞をMTT法にて確認する。

純水または滅菌生理食塩水に暴露する際のプロアントシアニン前処理の効果

20～40%コンフルエントの状態になった細胞を、滅菌生理食塩水またはプロアントシアニンを加えた滅菌生理食塩水にて1分間処理する。洗浄後、純水に1分間暴露あるいは、滅菌生理食塩水に1時間暴露させる。暴露後、新しい培地に置き換え、24時間培養し、生存細胞をMTT法にて確認する。

血清無添加培地で24～72時間培養する際のプロアントシアニン前処理の効果

20～40%コンフルエントの状態になった細胞を、滅菌生理食塩水またはプロアントシアニンを加えた滅菌生理食塩水にて1分間処理する。1分後、洗浄し血清無添加培地を加えて24, 48, 72時間培養し、生存細胞をMTT法にて確認する。また、コントロールグループとして、プロアントシアニン処理した細胞および未処理の細胞を血清含有培地（10% FBS含有培地）にて同様に培養を行った。

（3）細胞内活性酸素（ROS）に対するプロアントシアニン前処理の効果検証

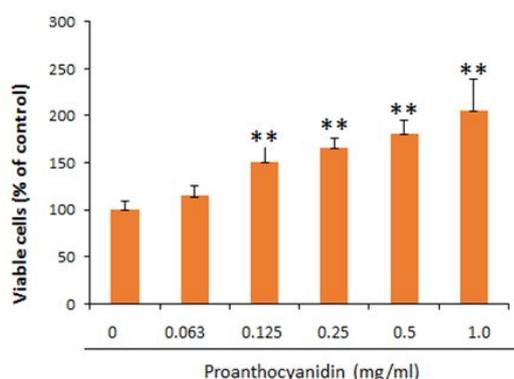
Serum deprivation stress負荷を与えたヒト歯肉線維芽細胞における活性酸素発生と、プロアントシアニンによる前処理の効果を検証した。100%コンフルエントの状態になったヒト歯肉線維芽細胞を滅菌生理食塩水またはプロアントシアニン（1 mg/ml）を含有した滅菌生理食塩水で1分間処理した後、洗浄し血清無添加培地を加えた。24時間培養し、細胞内ROS量を専用のキット（Oxiselect Intracellular ROS Assay Kit.）を使用し測定した。また、生存細胞についてはニュートラルレッド（NR）法にて確認した。

4. 研究成果

（1）プロアントシアニンにて1分間前処

理を行った場合の細胞増殖促進作用の検証

図3に20～40%コンフルエントの細胞にプ



ロアントシアニンで1分間前処理を行い、24時間培養した結果を示す。

プロアントシアニンによる前処理には、濃度依存的に明らかな細胞増殖促進効果が認められた。また、過酷な環境下での細胞保護効果も示唆された。

（2）各ストレス負荷条件における細胞保護効果の検証

純水または滅菌生理食塩水に暴露する際のプロアントシアニン同時処理の効果

図4、図5に純水および滅菌生理食塩水暴露におけるプロアントシアニン同時処理の結果を示す。

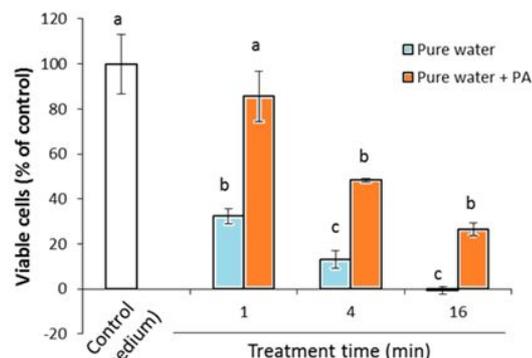


図4. PA同時処理の効果（純水）

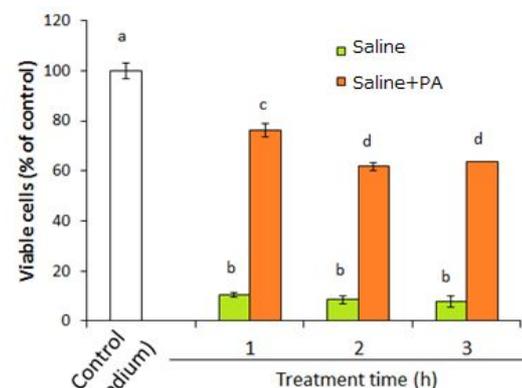


図5. PA同時処理の効果（滅菌生理食塩水）

純水に1分~16分暴露させた結果、プロアントシアニジンで処理しなかった群では、生存細胞は暴露させた時間に依存的に減少していた。一方、プロアントシアニジン処理した群は明らかに生存細胞の値が高かった。滅菌生理食塩水に1~3時間暴露させた群も同様に、プロアントシアニジン同時処理の群は、未処理の群よりも圧倒的に生存細胞の値が高い結果となった。

純水または滅菌生理食塩水に暴露する際のプロアントシアニジン前処理の効果

図6に純水および滅菌生理食塩水暴露におけるプロアントシアニジン前処理の結果を示す。

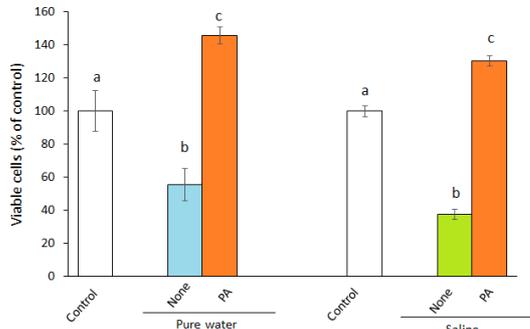


図6. PA前処理の効果(純水・滅菌生理食塩水)

示す。

1分純水に暴露した場合も、1時間滅菌生理食塩水に暴露した場合も暴露前に1分間プロアントシアニジンにて前処理した群が圧倒的に生存細胞の値が高い結果となった。

血清無添加培地で24~72時間培養する際のプロアントシアニジン前処理の効果

図7に1分間プロアントシアニジン処理を行った後に血清無添加培地にて細胞を培養した結果を示す。10% FBS含有培地にて培養したグループでは、サブコンフルの状態であった細胞が時間とともに増殖し、特にプロアントシアニジンにて前処理を行った群には

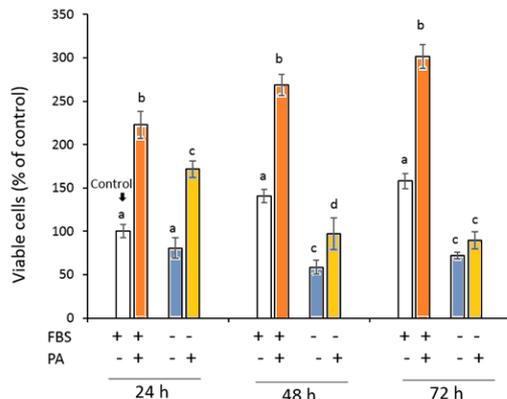


図7. 血清無添加培地におけるPAの効果

高い細胞増殖促進効果が認められた。

一方、血清無添加培地で培養した群は、時間の経過に従って生存細胞の低下が認められた。プロアントシアニジンで前処理した細胞は、24時間および48時間培養では生存細胞の減少抑制が認められるが、72時間培養後には未処理の細胞とほぼ同程度まで生存細胞が減少しており、プロアントシアニジン処置の有無における差は認められなくなった。

(3) 細胞内活性酸素(ROS)に対するプロアントシアニジン前処理の効果検証

100%コンフルエントの状態になったヒト歯肉線維芽細胞にプロアントシアニジン処理を施し、血清無添加培地にて24時間培養

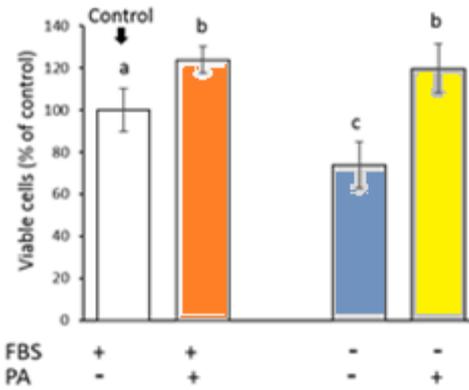


図8. 生存細胞数

した結果を示す。

図8はニュートラルレッド(NR)法にて測定した生存細胞の値である。これまでの試験同様、24時間培養では血清無添加培地においても、プロアントシアニジンで前処理するこ

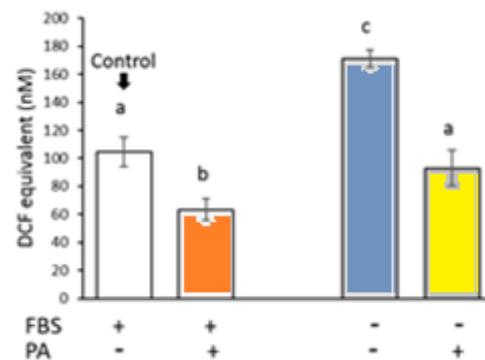


図9. 細胞ごとのROS発生量

とにより細胞はストレス負荷から保護され、増殖の促進が認められた。図9には細胞ごとの活性酸素(ROS)発生量を示す。血清無添加培地では、活性酸素(ROS)の発生量は上昇したが、プロアントシアニジンで1分間前処理を行った群では細胞内ROSの上昇が抑制された。しかしながら、wellごとの活性酸素(ROS)発生に関しては、血清無添加培地を用いた試験群において、プロアントシアニ

ジンによる1分間前処理の有無に関わらず有意差は認められなかった。(図10)

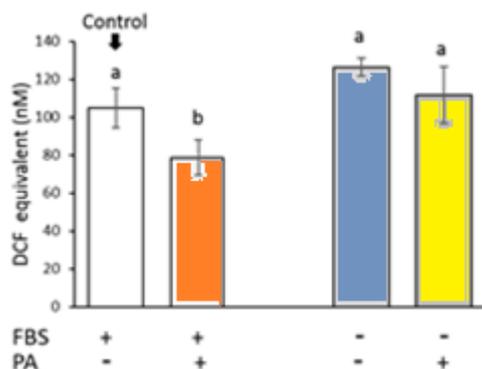


図10. WellごとのROS発生量

本研究は、事前に行った予備試験にて効果が高かったプロアントシアニジンについて、ヒト歯肉線維芽細胞を用いて詳細な検証を行った。プロアントシアニジンにて前処理を行うことにより濃度依存的に細胞増殖促進効果を発揮することが分かった。また、純水および滅菌生理食塩水に暴露させストレス負荷を与えた場合に、プロアントシアニジンにて同時処理を行うことにより生存細胞減少を抑制する細胞保護効果が認められた。さらに、血清無添加培地での培養における過酷環境下でも生存細胞減少の抑制および細胞内で生成される活性酸素(ROS)の上昇抑制が認められた。これまでの研究で、マウス線維芽細胞において低分子プロアントシアニジンが細胞内に取り込まれることは確認されており、本試験の結果は細胞内活性酸素(ROS)の上昇抑制が細胞内に取り込まれたプロアントシアニジンによって直接的抗酸化作用や酸化防御メカニズムに關与する遺伝子発現が起こる可能性を示すものである。また、プロアントシアニジンが発揮した細胞保護効果については高分子プロアントシアニジンが細胞膜に局在することが予測され、プロアントシアニジンの赤血球保護作用にみられる細胞膜への吸着による直接的細胞膜保護作用およびエピガロカテキンガレートのリニン受容体結合による神経細胞保護作用にみられる細胞膜受容体を介した細胞保護作用が作用機序として示唆された。本研究の結果は、プロアントシアニジンを応用した過酸化水素光分解殺菌技術による創傷殺菌後に、治癒促進が期待できるものであり、更にプロアントシアニジンで前処理を行うことで得られる高い細胞保護作用は、より侵襲的な処置への応用の可能性も示した。

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3件)

- (1) Kurauchi M, Niwano Y, Shirato M, Kanno T, Nakamura K, Egusa H, Sasaki K. Cytoprotective effect of short-term pretreatment with proanthocyanidin on human gingival fibroblasts exposed to harsh environmental conditions. *PLoS One* 2014;9(11):e113403. (査読あり) doi: 10.1371/journal.pon.0113403.
- (2) 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*, 8(11):e81316,2013. (査読あり) doi.org/10.1021/jf303177pl.
- (3) 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 Science*, 18(2):137-141, 2013. (査読あり) doi.org/10.1021/jf303177pl

[学会発表](計3件)

- (1) 倉内美智子、中村圭祐、菅野太郎、白土翠、佐々木啓一、庭野吉巳. プロアントシアニジンの短時間処理によるヒト線維芽細胞に対する細胞保護作用 新規素材探索研究会第13回セミナー 平成26年6月6日 新横浜フジビューホテル(横浜市)
- (2) Kurauchi M, Nakamura K, Kanno T, Shirato M, Sasaki K, Niwano Y. Acceleration of proliferative response of 3T3-L1 mouse fibroblasts and human gingival fibroblasts by short-term exposure to proanthocyanidin. 5th International Symposium for Interface Oral Health Science 平成26年1月20日~21日 東北大学片平さくらキャンパス(仙台市)
- (3) Kurauchi M, Nakamura K, Kanno T, Shirato M, Sasaki K, Niwano Y. Cytoprotective effect of short-time treatment with proanthocyanidin on human gingival fibroblasts. 第27回国際ポリフェノール会議・第8回タンニン会議 平成25年9月2日~6日 名古屋大学(名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

白土 翠 (SHIRATO, Midori)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号: 60708501