

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460116

研究課題名(和文) 構造活性相関解析に基づく創傷治癒作用を併用したポリフェノール光殺菌技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of the disinfection technique applying photo-irradiation of polyphenols combined with polyphenol-induced wound healing effect based on structure-activity relationship analysis

研究代表者

庭野 吉己 (NIWANO, YOSHIMI)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：40375184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポリフェノール素材の中には、短時間前処理で線維芽細胞の増殖を促進するとともに、カテキンモノマーおよびオリゴマーを含有するブドウ種子エキスのように各種ストレスに暴露された細胞に対して保護効果を発揮する素材があることを見出した。これらの効果のある程度予見しうる指標としてオクタノール/水分配係数logPを想定したが、相関性は見いだせなかった。これらポリフェノール素材については、照射による酸化を介して生成する水酸化ラジカルによる殺菌活性を示すものが存在した。以上、照射下での殺菌とともに細胞増殖・保護作用を示すポリフェノール素材は、殺菌と創傷治癒促進作用を同時に発揮しうることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Short-term treatment with some polyphenols accelerated proliferation of fibroblasts. In addition, grape seed extract with a high content of catechin monomers and oligomers showed cytoprotective effect on fibroblasts exposed to various oxidative stressors. As octanol-water partition coefficient logP was thought to be a good indicator to predict such activity through affinity to cells, but no clear relationship between logP values and such biological activity was found. Of the polyphenols tested, some also showed bactericidal effect upon photoirradiation due to hydroxyl radicals generated possibly via photooxidation of their phenolic moieties. From these, it would be expected that some polyphenols could be agents possessing both disinfection and wound healing potentials.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ポリフェノール 照射殺菌 創傷治癒

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

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。我々が確立してきた過酸化水素の光分解により生成する水酸化ラジカル($\cdot\text{OH}$)を利用した殺菌法では耐性菌は出現しないことを確認しており、水酸化ラジカルの殺菌分野へのさらなる応用が期待できる。

(2) 活性酸素の一種である水酸化ラジカルを利用した新しい殺菌療法を開発する

申請者らは、活性酸素の一種である水酸化ラジカルを利用した新しい殺菌技術を開発してきた。さらに植物性食品に含まれるポリフェノールに光照射することでフェノール性水酸基から放出される電子とプロトンにより酸素が還元されて水酸化ラジカルが生成すること、および生成する水酸化ラジカルは各種病原性細菌に対して殺菌効果を発揮することを報告してきた。これらポリフェノールは、食経験があり、サプリメントや化粧品にも配合されていることから、安全性は担保されており、非常に大きな利点として、本殺菌療法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。

(3) ポリフェノールの短時間処理は線維芽細胞の増殖を促進する

申請者らは、マウス由来線維芽細胞にフラボノイド系のプロアントシアニジン(EGC)を0.5-1分間暴露させただけで増殖が促進されること、およびこの増殖促進は、光照射を併用しても大きな影響を受けなかったことを見出した。すなわち、ポリフェノール処理により創傷治癒促進効果と殺菌を同時に行え、かつポリフェノールが持つ抗酸化能によって好中球などの炎症性細胞に起因する酸化的組織障害をも軽減するという三重の効果をも有する感染症の新規な治療法になりうる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

殺菌活性、創傷治癒促進効果、抗酸化活性の3つの機能を効果的に発揮できるポリフェノールを探索する

上述の活性を発揮するためには、ポリフェノールは、細胞に吸着あるいは取り込まれる必要があり、物性の指標であるlogP(オクタノール/水分配係数)が重要なファクターであると推察している。そこで、フェノール酸系およびフラボノイド系ポリフェノールのlogPと光照射殺菌・線維芽細胞増殖の間の定量的構造活性相関を調べ、殺菌活性と細胞増殖促進活性の両者に効果的なポリフェノール

を複数選抜する。選抜ポリフェノールについては、酸素ラジカル消去を指標にした抗酸化活性についても評価する。

3. 研究の方法

(1) 各種ポリフェノールのlogPと各種ポリフェノール短時間処理による線維芽細胞に対する増殖促進効果および光照下での殺菌効果

各種ポリフェノールのlogPは、フラスコ振とう法あるいはHPLC法で測定したがバラキがあったため、汎用されている文献値を採用した。供試ポリフェノールの構造式およびlogPを図1に示す。

マウス線維芽細胞の増殖に対するポリフェノールの影響は図2に示すように行った。Subconfluentの3T3-L1マウス線維芽細胞にポリフェノール生理食塩水溶液を1分間処理した。洗浄後、増殖培地を加え細胞を24時間培養し、増殖の程度をMethyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT)法にて測定した。

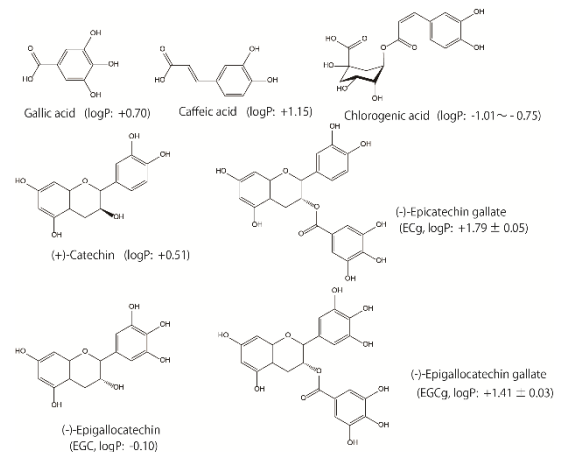


図1 供試ポリフェノールの構造式

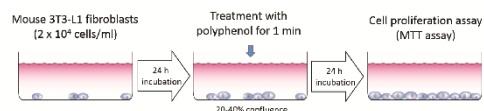


図2 マウス線維芽細胞の増殖に対するポリフェノール1分間処理の影響

殺菌効果は、グラム陽性の黄色ブドウ球菌およびう蝕の原因菌である *Streptococcus mutans*, 並びにグラム陰性の大腸菌および緑膿菌を用いて行った。サンプルと細菌懸濁液を混和後、400 nmのLED光を放射照度260 mW/cm²で10分間照射した。照射後に培養法により試料中の残存生菌数を評価した。ポリフェノールは、図1の(+)-catechin およびEGCを除く5化合物とカテキンモノマーおよびカテキンオリゴマーを含有するブドウ種子エキス(grape seed extract, GSE)を供試した。

(2) GSEの成分分析、抗酸化活性、および各種酸化ストレス負荷ヒト歯肉線維芽細胞(human

gingival fibroblast, hGF) に対する細胞保護作用

カテキン類は、立体異性体、モノマー、オリゴマー、ガレート型などの多数の化合物が知られているが、その化学構造により生理活性や高次構造が異なることがクロマトグラフィーの溶出挙動や logP などの物性の面からも明らかにされつつある。抗酸化作用に着目すれば、フェノール性水酸基の多いオリゴマーやガレート型の化学構造に抗酸化能が高いことが示唆される。また、カテキンモノマーとそのオリゴマーの比較では、重合度の増加に伴い logP が大きく減少することが報告されており(東海林ら、BUNSEKI KAGAKU 53, 953-958, 2004)、logP を指標とすれば重合度の増加により親水性はより強まることになる。これは重合度が増すと極性のフェノール性水酸基の数も増えることに起因していると考えられる。一方で、この報告では、カテキンオリゴマーは logP が低いにもかかわらず、重合度の増加に伴い、分子表面の親水性を高めると同時に、逆相 HPLC 固定相の ODS 鎖と立体的に強く相互作用することができる疎水性領域を分子内に有することを示している。このことから、カテキンオリゴマーの logP が低い値を示すのは、あくまで化合物の表面の親水性が増していることを表し、分子内部は疎水性が高まり、脂質二重層からなる細胞膜と相互作用する可能性を示唆している。この点に着目し、カテキンオリゴマーであるプロアントシアニジンを含む GSE に着目し、研究を進めることとした。

最初に GSE の成分分析を LC/MS で行った。

次に GSE の各種抗酸化活性 (スーパーオキシドアニオン: $O_2^{\cdot-}$, 水酸化ラジカル: $\cdot OH$ および一重項酸素: 1O_2 に対する消去・消光活性) を電子スピン共鳴 (ESR) 法により測定し、水溶性ビタミン E である Trolox (以下 Tx と略す) と比較した。 $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ および 1O_2 の生成系は、それぞれヒポキサンチン/キサンチンオキシダーゼ反応系、水へのプラズマジェット照射系、および光感受性物質ローズベンガルへの照射系を用いた。

最後に GSE の各種酸化ストレス負荷 hGF に対する細胞保護作用を検証し、Tx と比較した。試験設定を図 3 に示す。Confluent の hGF に GSE あるいは Tx を 1 分間処理・洗浄後、酸化ストレスとして H_2O_2 あるいは酸性電解水 (aced electrolyzed water, AEW) を負荷し、細胞内活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) を CM-H2DCFDA 法にて測定するとともに 24 時間培養後の細胞生存性を MTT 法にて測定

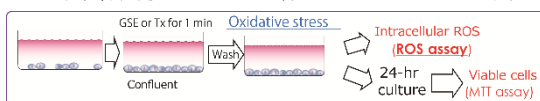


図 3 各種酸化ストレス負荷 hGF に対する GSE 1 分間処理による細胞保護作用

した。なお酸化ストレスとして 1O_2 を負荷した試験では、GSE と Tx は 1O_2 負荷と同時に処理した。

(3) ブドウ圧搾残渣抽出液 (grape pomace extract, GPE) での各種検討

(2) および (3) でカテキンモノマーおよびカテキンオリゴマーからなる GSE が非常に強力な抗酸化活性および細胞保護効果を発揮したことから、現在有効利用が渴望されているワイン製造過程で排出される産業廃棄物であるブドウ圧搾残渣 (grape pomace) に着目した。北海道で収穫された白ワイン用ブドウ品種ナイアガラの圧搾残渣を凍結乾燥後、純水を加え一晩攪拌して得られた総ポリフェノール濃度 0.5 mg/ml の抽出液 (grape pomace extract, GPE) をサンプルとした。GSE および (+)-catechin を比較対照として光照射による水酸化ラジカル生成と殺菌活性を検討した。殺菌試験では、サンプルと菌懸濁液を混和後、400 nm の LED 光を放射照度 260 mW/cm² で 20 分間照射した。照射後に培養法により試料中の残存生菌数を評価した。光を照射後の水酸化ラジカルの分析は、ESR 法により行った。また Fenton 反応で生成する水酸化ラジカルに対する消去活性も ESR 法で検討した。

4. 研究成果

(1) 各種ポリフェノールの logP と各種ポリフェノール短時間処理による線維芽細胞に対する増殖促進効果および光照射下での殺菌効果

供試ポリフェノールの logP は図 4 を参照のこと。ポリフェノール 1 分間処理の細胞増殖におよぼす影響を図 4 に示す。濃度に依存した増殖促進効果を示したのは caffeic acid, chlorogenic acid, (+)-catechin であり、gallic acid, ECg, EGC, EGCg は今回の供試濃度では増殖促進効果は認められなかった。logP との関連で細胞増殖促進活性を考察すると値が高い ECg と EGCg は、極性が低くなり細胞との親和性が高くなると考えたが、増殖促進効果を発揮しなかった。Gallic acid および EGC の logP は、活性を示したポリフェノールのそれと大きな差はないが、構造中にカテコールではなくピロガロールを有しており、活性が認められなかった要因である可能性が考えられた。活性が認められなかった EGCg に関しても、構造中にピロガロールを有していることが一因であると考えている。光照射下での殺菌活性の結果を表 1 に示す。光照射下での殺菌活性に関しては、線維芽細胞増殖の結果とは必ずしも一致しなかったが、caffeic acid および chlorogenic acid は供試したグラム陽性および陰性細菌すべてに高い殺菌活性を発揮した。

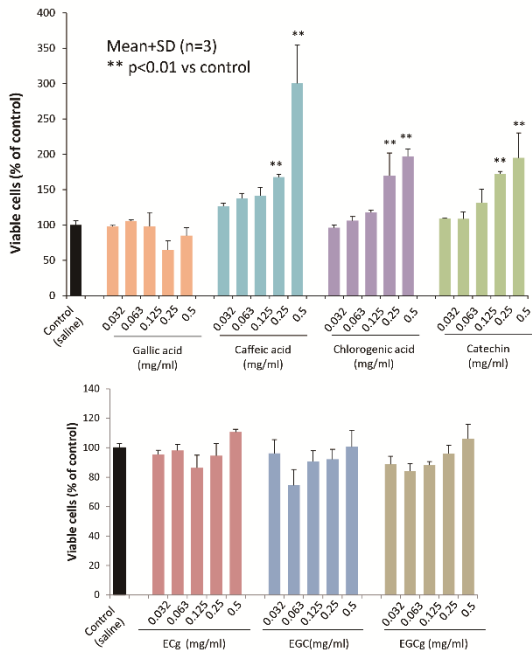


図4 各種ポリフェノール1分間処理がマウス線維芽細胞の増殖におよぼす影響

表1 ポリフェノールへの照射による殺菌活性

	Pure water	Gallic acid	Caffeic acid	Chlorogenic acid	EGC	EGCg	GSE
logp		0.7	1.15	-1.01~-0.75	-0.1	1.41	
G(+)	黄色ブドウ球菌	-	++	+++	+++	±	++
	スリフトロカス・シュータス	+	+++	+++	+++	±	+++
G(-)	大腸菌	±	+++	+++	+++	±	+
	緑膿菌	++	+++	+++	+++	++	+++

初発菌数: 10^7 CFU/ml, ポリフェノール濃度: 1 mg/ml
 - : 活性なし, ± : 軽微な活性, + : 弱い活性, ++ : 中等度の活性, +++ : 強い活性

(2) GSE の成分分析と各種酸化ストレス負荷 hGF に対する細胞保護作用

GSE の LC/MS 分析の結果、少なくともカテキンモノマー ($C_{15}H_{15}O_6$)、カテキンダイマー ($C_{30}H_{27}O_{12}$) およびカテキントリマー ($C_{45}H_{39}O_{18}$) が含まれ、カテキンモノマーは、(+)-catechin および(-)-epicatechin であることを確認した。カテキンダイマーおよびオリゴマーについては、logP は -0.79~-1.08 に入ることが報告されている。

GSE の in vitro 抗酸化活性プロファイル (O_2^- , $\cdot OH$ および 1O_2 に対する消去・消光活性) は Tx と同様であることを確認した(結果省略)。

H_2O_2 および AEW 負荷 hGF に対する GSE および Tx 1 分間前処理の影響を検討した結果をそれぞれ図 5 および 6 に示す。GSE および Tx のいずれも細胞内 ROS の上昇を抑制したが、細胞生存性を改善したのは GSE のみであった。

1O_2 負荷 hGF に対する GSE および Tx 同時処理の影響を検討した結果を図 7 に示す。GSE は濃度依存的な細胞保護効果を発揮したが、Tx にはそのような効果は認められなかった。

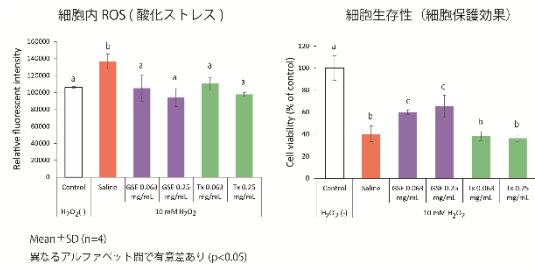


図5 H_2O_2 負荷 hGF に対する GSE 1 分間前処理による細胞保護作用

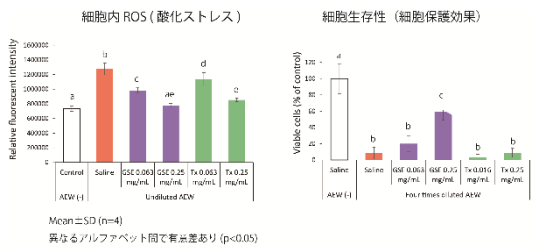


図6 AEW 負荷 hGF に対する GSE 1 分間処理による細胞保護作用

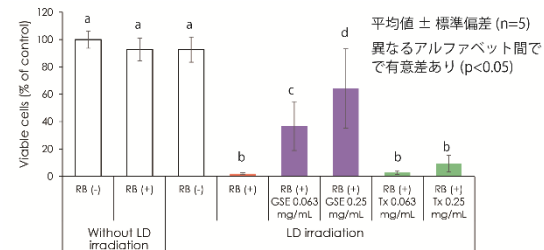


図7 1O_2 負荷 hGF に対する GSE 同時処理による細胞保護作用

以上の結果を表 2 にまとめた。GSE の in vitro 抗酸化活性プロファイルは Tx と同様であることを確認しており、各種酸化ストレス負荷 hGF に対しても Tx と同等の酸化ストレス低減効果を発揮した。しかし、各種酸化ストレス負荷 hGF に対する細胞保護効果は、GSE のみ認められた。これらの結果は、GSE の各種酸化ストレス負荷 hGF に対する細胞保護効果は、GSE の直接的な抗酸化活性に依存しないことを示唆している。

表2 各種酸化ストレス負荷試験における GSE と Tx の効果比較

	H_2O_2		AEW		1O_2	
	酸化ストレス	細胞保護	酸化ストレス	細胞保護	酸化ストレス	細胞保護
GSE	○	○	○	○	-	○
Tx	○	×	○	×	-	×

(3) ブドウ圧搾残渣抽出液(GPE)での各種検討

GPE の LC/MS による解析結果を図 8 に示すが、カテキンモノマー、ダイマー等のポリフェノールの存在は確認している。

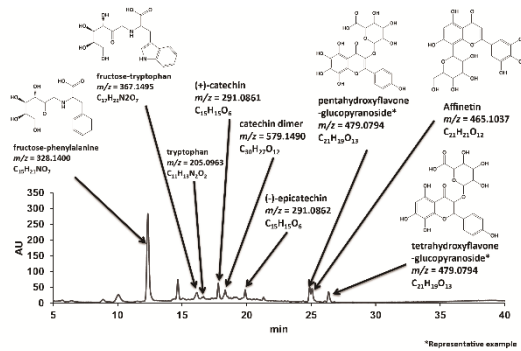


図 8 GPE の LC/MS 解析結果

GPE, GSE および (+)-catechin に LED 光を 1 分間照射した時に生成する水酸化ラジカル (DMPO-OH として表示) を図 9 に示す。いずれのサンプルも低濃度域では濃度に依存して水酸化ラジカルの生成を認めた。高濃度では各サンプルの水酸化ラジカル消去活性が上回り、見かけ上水酸化ラジカルの増加はみられなかったと推察される。水酸化ラジカル生成の強さは、GPE > GSE > (+)-catechin であった。

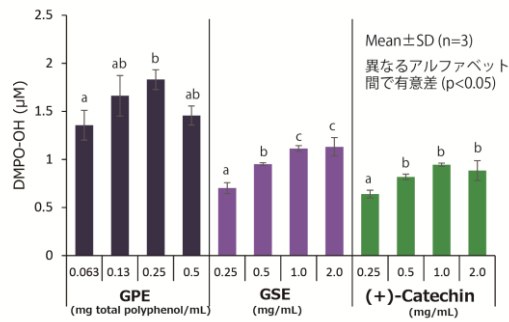


図 9 GPE, GSE および (+)-Catechin に 1 分間照射した時に生成する ·OH 量

次に GPE, GSE および (+)-catechin に LED 光を 20 分間照射した時のグラム陽性黄色ブドウ球菌に対する殺菌活性の結果を図 10 に示す。いずれのサンプルも濃度に依存して殺菌活性を発揮したが、その強さは、水酸化ラジカル生成と同様に GPE > GSE > (+)-catechin であった。グラム陰性の緑膿菌に対しても同様の殺菌効果を確認している (図省)

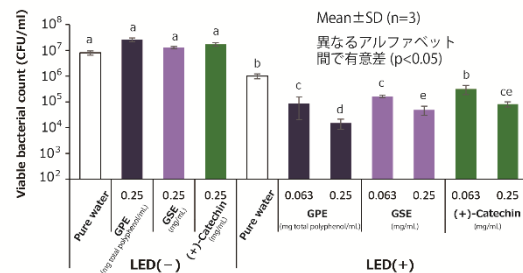


図 10 GPE, GSE および (+)-Catechin に 20 分間照射した時の黄色ブドウ球菌に対する殺菌活性

略)。最後に Fenton 反応で生成する水酸化ラジカルに対する消去活性の結果を図 11 に示す。いずれも濃度依存的に水酸化ラジカルを消去したが、その強さは GPE > GSE > (+)-catechin であった。

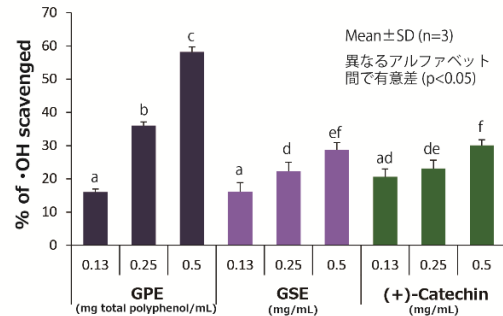


図 11 GPE, GSE および (+)-Catechin の Fenton 反応で生成する ·OH に対する消去活性

(4) まとめ

ポリフェノール単体としては、細胞膜との親和を介した logP と細胞に対する作用の相関性を想定したが、結果として明確な相関は見いだせなかった。カテキンオリゴマーを豊富に含む GSE の場合には、表面の親水性を増しながら分子内部は疎水性が高まり、細胞とうまく相互作用することを示唆するデータを得た。またワイン製造での産業廃棄物である GPE は、光照射下では GSE および (+)-catechin 以上の酸化促進活性 (水酸化ラジカル生成) と殺菌活性を示し、光照射なしでも GSE および (+)-catechin 以上の抗酸化活性を発揮したことから、複数のポリフェノールの混在した天然素材は、非常に高い潜在能力を有していることを示唆する成果を得ることができた。

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 10 件)
- ① Sato H, Niwano Y, Nakamura K, Mokudai T, Ikai H, Kanno T, Egusa H: Efficacy and safety of a therapeutic apparatus using hydrogen peroxide photolysis to treat dental and periodontal infectious diseases. *J. Toxicol. Sci.*, 41:793-799, 2016, doi:10.2121/jts.41.793, 査読有
 - ② Tsukada M, Sheng H, Kamachi T, Niwano Y: Microbicidal action of photoirradiated aqueous extracts from wine lees. *J. Food Sci. Technol.*, 53(7):3020-3027, 2016, doi:10.1007/s13197-016-2273-1, 査読有
 - ③ Tsukada M, Nakashima T, Kamachi T, Niwano Y: Prooxidative potential of photo-irradiated aqueous extracts of

- grape pomace, a recyclable resource from winemaking process. PLoS ONE, 11(6):e0158197, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0158197, 査読有
- ④ 庭野吉己: 活性酸素による微生物制御. 日本防菌防黴学会誌 44(3):119-124, 2016, 査読無
 - ⑤ Tsukada M, Sheng H, Tada M, Mokudai T, Oizumi S, Kamachi T, Niwano Y: Bactericidal action of photo-irradiated aqueous extract from residue of crushed grape for wine preparation. Biocontrol Sci., 21:113-121, 2016, doi:10.4265/bio.21.113, 査読有
 - ⑥ Katsuda Y, Niwano Y, Nakashima T, Mokudai T, Nakamura K, Oizumi S, Kanno T, Kanetaka H, Egusa H: Cytoprotective effects of grape seed extract on human gingival fibroblasts in relation to its antioxidant potential. PLoS ONE, 10: e0134704, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0134704, 査読有
 - ⑦ Nakamura K, Ishiyama K, Sheng H, Ikai H, Kanno T, Niwano Y: Bactericidal activity and mechanism of photo-irradiated polyphenols against Gram-positive and -negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63:7707-7713, 2015, doi: 10.1021/jf5058588, 査読有
 - ⑧ Mokudai T, Kanno T, Niwano Y: Involvement of reactive oxygen species in the cytotoxic effect of acid-electrolyzed water. J. Toxicol. Sci., 40:13-19, 2015, doi:10.2131/jts.40.13, 査読有
 - ⑨ 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, 9:e113403, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0113403, 査読有
 - ⑩ Tsuruya M, Niwano Y, Nakamura K, Kanno T, Egusa H, Sasaki K: Acceleration of proliferative response of mouse fibroblasts by short-time pretreatment with polyphenols. Appl. Biochem. Biotechnol., 174:2223-2235, 2014, doi: 10.1007/s12010-014-1124-7, 査読有

[著書] (計 1 件)

- ① 庭野吉己: 活性酸素生成系を応用した殺菌技術. P. 59-66, In 活性酸素・フリーラジカルの化学 (日本化学会編), 2016, 査読無

[学会発表] (計 9 件)

- ① 塚田愛、中島琢自、蒲池利章、庭野吉己: ワイン圧搾残渣への光照射による殺菌活性と活性酸素生成 —既存ポリフェノールとの比較—. 日本防菌防黴学会 第 43 回年次大会. 2016 年 9 月 東京
- ② 庭野吉己、塚田愛、中島琢自、蒲池利章: ワイン圧搾残渣ポリフェノールの LC/MS 解析および光照射による殺菌活性と活性酸素生成. 日本防菌防黴学会 第 43 回年次大会. 2016 年 9 月 東京
- ③ 塚田愛, 蒲池利章, 庭野吉己: ブドウ圧搾残渣への光照射による抗微生物制御. 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム. 2016 年 9 月 金沢
- ④ 多田美香、塚田愛、蒲池利章、庭野吉己: ワイン製造残渣水抽出液への光照射による殺菌活性と活性酸素生成. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会. 2016 年 8 月 仙台
- ⑤ 庭野吉己: 活性酸素・フリーラジカルによる微生物の制御. 日本化学会 第 96 回春季年会. 2016 年 3 月 京田辺
- ⑥ 塚田愛、Hong Sheng、目代貴之、菅野太郎、蒲池利章、庭野吉己: ワイン製造残渣・澱水抽出物への光照射による殺菌活性. 日本防菌防黴学会 第 42 回年次大会 2015 年 9 月 豊中
- ⑦ 庭野吉己、目代貴之、追泉里実、菅野太郎: 酸性電解水の細胞毒性における活性酸素の関与 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会 2014 年 9 月 東京
- ⑧ Nakamura K, Ishiyama K, Ikai H, Kanno T, Niwano Y: Comparison of bactericidal activity of photo-irradiated polyphenols. Presented at the XXVIIth International Conference on Polyphenols & 8th Tannin Conference in Nagoya, Sep. 2014
- ⑨ Kurauchi M, Nakamura K, Kanno T, Shirato M, Sasaki K, Niwano Y: Cytoprotective effect of short-time treatment with proanthocyanidin on human gingival fibroblasts exposed to harsh environmental conditions. Presented at the XXVIIth International Conference on Polyphenols & 8th Tannin Conference in Nagoya, Sep. 2014

[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