

令和元年6月24日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11924

研究課題名(和文) 組織障害性が小さくスキンケアに害のない消毒薬の開発とその応用に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Studies for the development of skin/mucosa-friendly disinfectant and on the conditions for their application.

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・准教授

研究者番号：60331807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：組織障害性が軽く、かつ、効果的な消毒薬の開発を目指し、食品由来の化合物の持つ微生物不活化活性に注目し解析している。本研究では、1) エンベロープおよび非エンベロープウイルスを不活化できる化合物の系統的な探索としてクマル酸異性体及びプロテオグリカンの消毒活性を明らかにし、タンパク質による妨害作用の克服条件への解析としてN-アセチルトリプトファンとスクロース誘導体の作用を発見し、また、2) 実際の環境下での汚染微生物の挙動についての基礎データとして汚染衣服上でのウイルス感染性の消長について解明し、さらに、3) 応用にむけた試みとしてうがい薬として用いた場合の口腔洗浄効果について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染対策は現代社会において増大し続ける大きな課題である。感染症予防のための消毒は感染対策として基本的な役割をもつが、効果的な消毒薬は組織障害性が強く使用法には制限があり、体表面や粘膜表面に使えるものは消毒効果が弱い。我々は、組織障害性が軽く、かつ、効果的な消毒薬の開発を目指し食品由来の化合物の持つ微生物不活化活性に注目し解析してきた。幾つか効果的な候補化合物を発見するとともに、実際の使用にあたって大きな障害であったタンパク質による妨害作用を克服できる条件をも見出しつつある。加えて、実際の使用に向けた評価の基礎となる環境下でのウイルス感染性について定量的な解析によるエビデンスを蓄積してきている。

研究成果の概要(英文)：To develop effective but skin/mucosa-friendly disinfectants, we have examined and characterized the microbicidal activities of food-derived compounds. In this study, we have revealed the virucidal activities of coumaric acid stereoisomers and proteoglycans, through systematic investigations of compounds with virucidal activities against enveloped and non-enveloped viruses. However, the activities of most disinfectants, found by us and others, were often observed to be inhibited by contaminating proteins. To overcome this inhibition, we found unique abilities of N-acetyltryptophan and certain sucrose-derivatives which can abolish such inhibitory effects of proteins. In addition, to provide the scientific evidences for the nursing care against viral transmission through contaminated clothes, we characterized the life-span of the viral infectivity on clothes made from different materials under different conditions. We also showed the efficacy of the disinfectants on mouth cleaning.

研究分野：急性期看護 感染看護

キーワード：スキンケア 手指衛生 消毒薬 アルギニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、アルギニン及びその誘導体が微酸性条件下で種々のウイルスを不活化(消毒)できることを見出し、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期待されることから、体表への表在感染に対する予防・治療薬としての可能性を考え、インフルエンザ感染を例として感染対策としての応用を提案してきた。アルギニンの有用性についてはかなり明らかに出来たが、反面、活性に 0.5 M 以上の高い濃度が必要であり非エンベロープウイルスには無効など、実際の使用に向けて制限のあることも分かってきた。一方、我々はポリフェノールやビタミン C など種々の食品由来成分に抗ウイルス活性を発見し報告してきた。興味深いことに、アルギニンには水に難溶性物質を可溶化する作用もあり、この性質と関係していると考えられているが、種々のポリフェノール類のウイルス不活化作用を顕著に増強した。そこで、アルギニンと協働作用を持つ化合物を探索すると同時に、塩濃度や pH など処理条件を定量的かつ網羅的に調べ、組織障害性のない消毒薬を検討するため研究に取り組んだ。

また、接触感染の防御に向けての対策を考えるときには、手指衛生の効果を示すための科学的根拠が必要であるが、ウイルス感染症に対しては現時点で根拠となるデータが不十分である。医療現場における汚染ウイルスの伝播力の理解のため、また、消毒薬の実効性を客観的に評価するために、ウイルスが環境を汚染したときの感染性の持続ならびに伝播力について定量的な実験で評価してきた。

2. 研究の目的

本研究では、1) “より広範囲の病原微生物” に対して有効な不活化化合物(消毒薬)の探索とその組合せについての定量的な解析として、エンベロープおよび非エンベロープウイルスを不活化できる化合物の系統的な探索とその処理条件について網羅的な解析を行い、また、2) 実用化に向けた基礎データの収集のため手指や病院環境での汚染微生物の感染源としての役割を明らかとするため環境を汚染した微生物の感染性の消長など基礎データの収集・整理を行い、さらに、3) 組織障害作用の小さな消毒薬の応用にむけた試みの一例として、うがい薬として用いた場合の口腔洗浄効果についての解析の3点について研究を実施し、下記成果を得た。

3. 研究の方法

1) 用いたウイルスと細胞：ウイルスは単純ヘルペスウイルス 1 型 F 株 (HSV-1) \ A 型インフルエンザウイルス PR8 株 (H1N1) と Aichi 株 (H3N2) \ B 型インフルエンザウイルス Tokyo 株、ポリオウイルス 1 型 Sabin ワクチン株 (PV-1) \ コクサッキー B ウイルス 5 型 (CB5)、ネコカリシウイルス F4 株 (FCV) \ ヒトライノウイルス 1B 株 (HRV) を用い、細胞もウイルス種に合わせて Vero 細胞、MDCK 細胞、CRFK 細胞、HeLa 細胞を使用した。ウイルスの感染価の定量は HRV 以外はブラック法で、HRV は TCID₅₀ 法で感染価を測定した。

2) ウイルス不活化作用の測定には、各種試薬液にウイルス液を添加し、十分に混和したウイルス液および試料を指定温度で一定時間保温した後、直ちに冷ウイルス希釈液(被験ウイルス種によって FBS あるいは BSA を添加した)し、各希釈中の感染性ウイルス量を測定した。不活化作用の程度は、対照としてダルベッコのリン酸緩衝溶液 (PBS) にウイルス液を添加・処理したサンプルでの残存感染性ウイルス量を 1 とし、相対比を算出した。

4. 研究成果

[組織障害のない、看護領域で有用な消毒薬開発に向けた取り組み]

1. 食品由来成分のウイルス不活化作用物質を探索

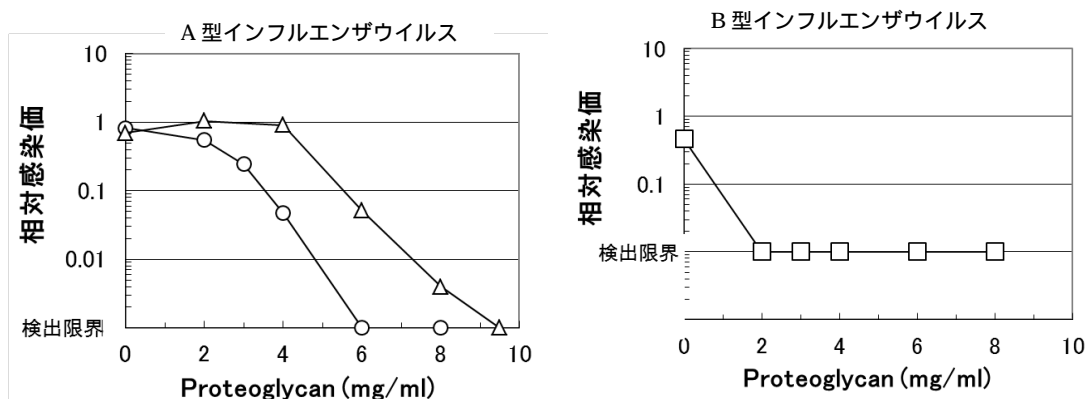
1) クマル酸のウイルス不活化作用

多くの食用植物に含まれ生理活性成分として注目されているポリフェノール類の構成成分のひとつ、クマル酸の構造とウイルス不活化活性との関連を分析し、ウイルスはA型インフルエンザウイルスPR8(H1N1)、Aichi(H3N2)、単純ヘルペスウイルス 型またはF株(HSV-1)、ポリオウイルス 型生ワクチン株(PV-1)、ネコカリシウイルスF4型を用いた。インフルエンザウイルスAichi株を種々濃度のクマル酸液中で保温すると、シス型とトランス型のいずれのクマル酸においても、濃度に依存したウイルス不活化がみられた。ウイルス不活化は酸性側で顕著であり、pH 7.0ではいずれの異性体でも見られなかった。シス型とトランス型との比較では、シス型の方でより強い不活化が見られた。pH 依存的なウイルス不活化作用はシス型で顕著であり、トランス型でのpH依存性はシス型に及ばなかった。基本的に同様の結果が、A型インフルエンザウイルスPR8株でもHSV-2でもFCVでも見られ、シス型とトランス型との比較では、シス型の方でより強い不活化が見られたが、シス-トランスの立体構造の差はウイルス不活化活性にそれほど影響が大きいことが示唆された。

2) プロテオグリカン (PG と略) 不活化効果

スキンケア用などに利用が進んでいるPGにおける不活化作用について調べた。PGは動物の細胞外マトリックスを構成する高分子で、その構成成分のひとつ、ヘパラン粒硫酸は単純ヘルペスウイルスのレセプター活性を担っている。梅酢を用いて調製したPGを用いてインフルエンザウイルスの不活化能について調べた。種々の濃度のPGを含む10mMクエン酸緩衝液(pH 5.9)でウイルスを保温するとPGは濃度依存的にA型インフルエンザウイルスPR8(H1N1)株及びAichi(H3N2)株を不活化した。同様の不活化はB型Tokyo株でも見られ、PGがインフルエンザウイルスに対し、型や亜型の区別を超えて不活化できることを示唆する。呼吸器感染ウイルスであるが非エンベロープウイルスであるネコカリシウイルスに対しては不活化活性を示さず、同様にポリオウイルスに対しても不活化能を示さなかった。

抽出に用いる梅酢を変えても、また、梅酢に代えて酢酸を用いて調製しても不活化活性が見られ、不活化は梅酢由来の成分によるのではない。



A型インフルエンザウイルス H1N1 亜型 (A/PR8 株;) 及び H3N2 亜型 (A/Aichi 株;) または B型インフルエンザウイルス (B/Tokyo 株;) を横軸に示す濃度のプロテオグリカン標品を pH の 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.9) 中で 37 20 分間保温したときの残存ウイルス感染価を測定し、PBS 中で感染価を対照として相対感染価を算出した。

3) N - Acetyltrypthophan (AcTrp) によるエンベロープウイルスおよび非エンベロープウ

ウイルスの抗ウイルス作用

トリプトファン誘導体である N - Acetyltryptophan (AcTrp) に注目し、ウイルスへの作用について検討した。AcTrp は注射用アルブミン液に安定化剤として添加されるほど安全性が高い化合物である。そこで AcTrp の殺ウイルス効果を確認出来れば組織への影響がなく消毒薬開発につながると考え検討した。エンペロープウイルスのインフルエンザウイルス A 型 PR8 (H1N1) 及び Aichi (H3N2)、B 型 Tokyo 株、単純ヘルペスウイルス 型 F 株について調べたところ、全てのウイルス種において顕著な不活化効果がみられた。また不活化にはタンパク存在が阻害因子となり得るためウイルス液にウシ血清アルブミン (BSA) あるいはヒト免疫グロブリンを加えタンパク共存下でのウイルス不活化効果についても調べた。AcTrp による不活化は、タンパク存在していると大きく阻害されるが、AcTrp の濃度を高めると単純ヘルペスウイルス 型 F 株では検出限界以下まで不活化され、タンパクを加えた状態でも不活化の妨害を受けにくい可能性が示唆された。非エンペロープウイルスであるネコカリシウイルスとヒトライノウイルスに対する AcTrp の不活化においては、エンペロープウイルスの方が顕著ではあったが、温度条件および濃度を高くすることにより対照液と比較すると 10^{-2} まで減少し、AcTrp の消毒活性が非エンペロープウイルスにも及ぶことがみられた。

2 . 口腔細菌群に対する天然物質の不活化作用

食品由来成分であるアルギニンは水に難溶性化合物への可溶化作用を持つことから、新たな含嗽ケア用洗口薬として利用できる可能性に気付き、臨床関連研究として、口腔ケアへの応用を念頭にアルギニン溶液の口腔洗浄効果について解析した。口腔内の細菌は、口腔内で常在性細菌叢を形成しており汚染状態が恒常的である。口腔ケアが不十分な状況では口腔内局所の汚染 (感染) に留まらず誤嚥性肺炎など他臓器での疾患を引き起こす可能性があるため、口腔ケアの重要性は広く認知されている。

被験者にアルギニン溶液による洗口液で洗口してもらい、洗口前後に存在する舌上細菌数および生菌数を定量的に評価した。舌上の細菌数を誘電泳電法により測定し、洗浄係数を算出し比較した結果、アルギニンと薬用リステリンとの比較では、薬用リステリンの方が、洗浄効果が顕著にみられた。生菌数についても含嗽後の回収した洗口液を標準寒天平板法により菌数を測定し、洗浄係数を算出した場合、クエン酸、生食 (コントロール) に対し、アルギニンではより多くの口腔内細菌が除去された。これは、アルギニンのもつ難溶性タンパク質への可溶化作用による結果と考えられた。薬用リステリンの洗浄係数は低値であったが、これは本剤に含まれるアルコールによる強い殺菌性由来と考えられた。アルギニンは口腔細菌に対する殺菌作用を示さないが、舌や口腔粘膜に付着した細菌に対して優れた除去作用を示していること明らかになった。

含嗽の使用量について、倍量を含嗽した洗浄効果について検討したが、著名な細菌数の減少には至らなかった。

3 . 接触感染の防御に向けた対策

環境物に対するウイルスがもつ感染力の持続性の評価について、衣服に着目し、ウイルスがもつ感染性についての検討を行った。ジャージに付着したウイルスは接種後 40 分経過時点でウイルス感染価が 10^{-2} 程度にまで減少した。一方で、セーターは 60 分を経過してもほとんど減少しておらず、セーター上ではジャージ上に比べ、ウイルスが不活化していないことがわかった。各布片における異なる生地の繊維、材質の種類がウイルスの不活化に影響し

ていた。屋内および屋外という異なる環境下での衣服上のウイルス感染価の経時変化では、屋外では、ジャージおよびセーターともに気温が低い環境でウイルス感染価がほとんど変化せず、感染性が維持されていた。低温がウイルスの残存に影響する要因であることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- (1) Ikeda K., Ejima D., Arakawa T., Koyama A.H. (2018) : Protein aggregation suppressor arginine as an effective mouth cleaning agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 224-227.
- (2) Mitani T., Mimura H., Ikeda K., Nishide M., Yamaguchi M., Koyama A.H., Hayashi Y., and Sakamoto H. (2018): Process for the purification of *cis-p*-coumaric acid by cellulose column chromatography after the treatment of the *trans* isomer with ultraviolet irradiation. *Analytical Sciences*, 34, 1195-1199.
- (3) Goda H., Ikeda K., Nishide M., Nagao T., Koyama A.H., (2018): Characterization of virucidal activities of chlorous acid. *Japanese Journal of Infection Diseases*, 71, 333-337.

〔学会発表〕(計22件)

- (1) Ikeda K., Nishide M., Nagao T., Kuwahara T., Koyama A.H. : Anti-herpetic activity of N-acetyltryptophan against herpes simplex virus type 1. The 43th Annual International Herpes Virus Workshop, 2018. 7, Vancouver, Canada.
- (2) Nishide M., Ikeda K., Nagashima S., Kuwahara T., Koyama A.H. : Recovery of virucidal activity of umezu phenolics from the inhibition by proteins. The 43th Annual International Herpes Virus Workshop, 2018. 7, Vancouver, Canada.
- (3) 池田敬子, 土永知子, 辻本和子, 西出充徳, 長尾多美子, 魚崎 操, 三谷隆彦, 小山 一 : コウヤマキ *Sciadopitys verticillata* 抽出液に見出された抗ウイルス活性 .第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 2018 . 10, 京都市 .
- (4) 池田敬子, 長尾多美子, 桑原知巳, 小山 一 : 低濃度エタノールでの非エンベロープウイルスの不活化条件についての検討 .第 34 回日本環境感染学会総会・学術集会, 2019 .2, 神戸市 .
- (5) 池田敬子, 小山 一, 桑原知巳 : インフルエンザウイルスのインビトロでの増殖に対するクラリスロマイシンの効果 .第 59 回日本臨床ウイルス学会, 2018 . 6, さいたま市 .
- (6) 池田敬子, 長尾多美子, 桑原知巳, 小山 一 : オクタアセチルスクロースによるウイルスの不活化 .第 45 回日本防菌防黴学会, 2018 . 11, 東京 .
- (7) 高橋知子, 中島知沙, 池田敬子 : 血液透析患者の体重増加改善に向けた EASE プログラムの活用 .第 10 回和歌山保健看護学会学術集会, 2018 . 8, 和歌山市 .
- (8) Ikeda K., Yamaguchi M., Nagao T., Nishide M., Yamaguchi M., Koyama A.H. and Kuwahara T.: Virucidal activities of proteoglycans prepared with umezu, a salt-extract of Japanese apricot. IUM 2017 (International Union of Microbiological Societies), 2017. 7, Singapore, Singapore.
- (9) 山口真範, 山口実紗子, 嵐莉加, 池田敬子, 小山 一 : プリテオグリカンの新規簡易抽出法の開発と医療応用 .第 36 回日本糖質学会年会, 2017 . 7, 旭川市
- (10) 池田敬子, 小山 一, 西出充徳, 桑原知巳 : トリプトファン誘導体によるウイルスの不活化 .第 44 回日本防菌防黴学会, 2017 . 9, 豊中市 .
- (11) 池田敬子, 長島早友里, 長尾多美子, 西出充徳, 山崎尚, 桑原知巳, 小山 一 : アセチルトリプトファンの抗インフルエンザウイルス作用 .第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 2017 . 12, 大阪市 .
- (12) 西出充徳, 池田敬子, 魚崎操, 長尾多美子, 長島早友里, 桑原知巳, 小山 一 : アセチルトリプトファンによる非エンベロープウイルスの不活化 .第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 2017 . 10, 大阪市 .
- (13) 池田敬子, 長島早友里, 長尾多美子, 西出充徳, 山崎尚, 桑原知巳, 小山 一 : アセチルトリプトファンの抗ウイルス作用 .第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 . 10, 神戸市 .
- (14) 池田敬子, 長尾多美子, 桑原知巳, 小山 一 : 呼吸器感染症ウイルスに対するアセチルトリプトファンの消毒作用 .第 33 回日本環境感染学会総会・学術集会, 2018 . 2, 東京都 .

- (15) 石原沙季, 小出実奈, 谷春香, 辻彩恵子, 池田敬子: 口腔ケアに向けた新規洗口液の試み. 第9回和歌山県立医科大学保健看護学会, 2017. 8, 和歌山市
- (16) Ikeda K., Nishide M, Nagao T, Yamasaki H, Yamada M, Koyama A.H. Virucidal mechanism of arginine against herpes simplex virus type 1. The 41th International Herpes Virus Workshop, 2016. 7, Madison, WN, USA.
- (17) 池田敬子, 小山一, 西出充徳, 堀江大輔, 吉田 穰: 医療者を汚染したウイルスがもつ伝播能力についての解析. 第43回日本防菌防黴学会, 2016. 9, 大阪市.
- (18) 池田敬子, 長島早有里, 長尾多美子, 西出充徳, 吉田 穰, 山崎尚, 山口昌範, 小山一: 梅酢を用いて調整したプリテオグリカンによるウイルス不活化. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016. 10, 札幌市.
- (19) 西出充徳, 池田敬子, 長尾多美子, 魚崎操, 吉田穰, 味村妃紗, 三谷隆彦, 小山一: クマル酸の抗ウイルス活性に及ぼす立体構造についての解析. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016. 10, 札幌市.
- (20) 池田敬子, 山口実紗子, 長尾多美子, 桑原知己, 山口昌範, 小山一: 呼吸器感染ウイルスに対するプリテオグリカン標品の作用. 第39回日本分子生物学会年会, 2016. 11, 神戸市.
- (21) 池田敬子, 長尾多美子, 桑原知己, 小山一: 食品由来成分を用いた口腔ケアのための洗口剤の試みと評価. 第32回日本環境感染学会, 2017. 2, 神戸市.
- (22) 池田敬子, 長尾多美子, 山岡 徹, 桑原知己, 小山一: 呼吸器感染症ウイルスに対する亜塩素酸水の消毒作用. 第32回日本環境感染学会, 2017. 2, 神戸市.

〔産業財産権〕

出願状況(計 3件)

- (1)名称: 桂皮酸類幾何性体の分離精製法
 発明者: 三谷隆彦、味村妃紗、坂本英文、小山一、池田敬子、他
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 2016-171458
 出願年: 2016年
 国内外の別: 国内
- (2)名称: N-アセチルトリプトファンを用いた微生物の消毒
 発明者: 小山一、池田敬子
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 2017-118476
 出願年: 2016年
 国内外の別: 国内
- (3)名称: 軟体動物や棘皮動物から得られたプリテオグリカンを用いたウイルスの不活化
 発明者: 山口真範、小山一、池田敬子
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 2017-139145
 出願年: 2016年
 国内外の別: 国内

6. 研究組織

- (1)研究分担者
 研究分担者氏名: 小山一
 ローマ字氏名: KOYAMA A. HAJIME
 所属研究機関名: 和歌山県立医科大学
 部局名: 医学部
 職名: 博士研究員
 研究者番号: 80109074
- (2)研究協力者
 研究協力者氏名: 長尾多美子
 ローマ字氏名: NAGAO TAMIKO
 所属研究機関名: 四国大学
 部局名: 看護学部
 職名: 助教
 研究者番号: 40716049