

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K17108

研究課題名(和文)ポリフェノール光酸化反応を応用した殺菌消毒法の確立：より安全な補綴治療を目指して

研究課題名(英文) Establishment of a Disinfection Method Applying Polyphenol Photooxidation Reaction: Toward Safer Prosthetic Treatment

研究代表者

倉内 美智子 (Kurauchi, Michiko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00757263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではポリフェノール光照射殺菌法の作用機序の主体である過酸化水素光分解殺菌法(3%過酸化水素に波長365nmLEDを照射して生成する水酸化ラジカルを用いた殺菌法)の、多剤耐性菌及び細菌芽胞への殺菌効果を検証した。E.coli及びP.aeruginosaで作製した多剤耐性菌に対しては、耐性の有無に関わらず殺菌効果を示した。B.cereusから得た細菌芽胞に対しては、LEDの波長と照射時間の調整によって効率的な殺菌の可能性が示された。また、殺菌処理後の細菌芽胞の細胞膜破壊像が走査型電子顕微鏡で確認できた。これは、水酸化ラジカルが細菌芽胞の細胞膜を破壊し、殺菌作用を発揮する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、過酸化水素光分解殺菌法による多剤耐性菌及び細菌芽胞への殺菌効果及びその作用機序の一部を解明した。これは、本殺菌法が高水準消毒薬に匹敵する可能性があることを示している。すなわち、現在の高水準消毒薬に該当するグルタラル等といった、使用者にも刺激性が非常に強い消毒薬の代替になりうることを示している。本殺菌法の確立は医療従事者側にとって、より効率的かつ安全性の高い消毒・殺菌方法の実現を可能とし、ポリフェノール溶液においても同等の殺菌効果が示されれば、さらに安全性の高い消毒・殺菌方法として医療現場だけでなく、介護施設等も含めて幅広く利用することを可能とし、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the bactericidal effect of the hydrogen peroxide photolysis bactericidal method (a method using hydroxyl radicals produced by irradiating 3% hydrogen peroxide with a 365-nm wavelength LED), which is the principal mechanism of action of the polyphenol photolysis bactericidal method, on multidrug-resistant bacteria and bacterial spores. Regardless of whether the bacteria were resistant, it was effective against multidrug-resistant bacteria produced by Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. Against bacterial spores obtained from Bacillus cereus, the method showed the possibility of efficient sterilization by adjusting the wavelength of the LED and the irradiation time. The disruption of the bacterial spore membrane was confirmed by scanning electron microscopy. It suggests that the hydroxyl radicals generated by this sterilization method may destroy the cell membrane of the bacterial spores and exert a bactericidal effect.

研究分野：歯科補綴

キーワード：ポリフェノール 水酸化ラジカル 細菌芽胞 多剤耐性菌 殺菌消毒

1. 研究開始当初の背景

現在の歯科臨床ではスタンダードプリコーションの概念に基づき、患者に対しては積極的な感染予防対策が実施されているが、補綴装置や印象体に対する感染予防対策は未だ不十分であり、その必要性を日々の歯科臨床を通じて感じている。患者の口腔粘膜と直接接触し、唾液や体液に触れる補綴装置や印象体は「セミクリティカル器具」に相当し、歯科医師や歯科技工士等の歯科医療従事者にとっては「感染源」になりうる。CDC (米国疾病予防管理センター) のガイドラインでは、これらに対しては「高水準消毒」が必要とされている。しかし、これら補綴装置や印象体は、汚染が視覚的に分かりにくく、たとえ汚染が多少あったとしても水洗で表面的な汚染は流れてしまうため、殺菌・消毒の必要性が実感しにくい。また、大学病院の様に設備や資材を十分に有し、ガイドラインに準じた感染対策を講じることが可能な施設がある一方で、それが難しい小規模のクリニックが非常に多いことも歯科特有の状況である。このような状況であっても、患者に直接触れる器具等に関しては、小規模クリニックでも滅菌器具の使用を実現できている。これは、患者に対する感染予防対策の意識の向上の他に、患者に用いる器具の多くが金属製であり、高圧蒸気滅菌が可能であるため、滅菌作業工程が洗浄、専用パックへの封入そして専用機器による滅菌、と一連の作業が比較的容易であることと小型の滅菌機器が普及していることが一因として考えられる。これに対し、補綴装置や印象体の殺菌・消毒には消毒薬への浸漬処置が推奨されているものの、比較的長い処理時間 (~60分)、作業者の安全性の確保、被消毒体への材料学的影響、薬液の調整・すすぎ作業・処分等の後処理を要するといった、作業の煩雑さと効率性に欠けるとい背景があり、人的制限もあるクリニックでは十分な殺菌消毒処理の実施が困難であるのが現状である。したがって、患者に対してだけでなく、歯科医療従事者側の感染予防対策のために、より安全性の高い消毒液を用いた簡便かつ低侵襲・低コストで被消毒体にも材料学的影響が小さい効果的な殺菌消毒方法の確立が求められている。

我々の研究グループでは、ポリフェノールへの照射により生成される水酸化ラジカルを応用した殺菌技術の研究開発を行ってきた (Nakamura et al. J Agric Food Chem, 2015, 63, 7707-7713)。ポリフェノールとは、フェノール性水酸基を複数持つ物質の総称であり、その抗酸化機能が健康増進に役立つとされ、機能性食品の成分として注目されている。このポリフェノールを利用したポリフェノール照射殺菌法は我々の研究グループが独自に開発した新技術であり、国内外に類を見ない。したがって、本殺菌消毒方法の確立は、現存の薬品を用いた殺菌消毒方法と比較して、より安全かつ短時間で殺菌効果の高い新技術として歯科医療の発展に貢献できる。

2. 研究の目的

CDCのガイドラインでは、殺菌あるいは不活化可能な微生物およびウイルスによって消毒薬を高、中、低水準に分類している (図1)。一般的な栄養型細菌 (低水準消毒薬の対象) に対するポリフェノール照射殺菌法の殺菌効果はこれまでの基礎研究で実証してきた (Nakamura et al. Sci Rep 2017, 7, 6353)。しかしながら、中水準および高水準消毒薬が対象の薬剤耐性菌、真菌、ウイルスそして細菌芽胞に対する本殺菌法の効果は明らかではない。そこで、本研究では薬剤耐性菌、真菌、ウイルス (エンベロープなし) そして細菌芽胞に対する本殺菌法の殺菌効果・不活化の検証および作用メカニズムの解明を行い、補綴歯科治療過程における新規の殺菌消毒方法の提案を目的とする。

消毒薬に対する抵抗性 ↑ 高	細菌芽胞	高水準消毒薬	グルタラル、過酢酸
	結核菌	中水準消毒薬	
	エンベロープを持たないウイルス	次亜塩素酸ナトリウム ポビドンヨード アルコール製剤	
	真菌		
	栄養型細菌	低水準消毒薬	クロルヘキシジン 塩化ベンザルコニウム 両性界面活性剤
低	エンベロープを持つウイルス		

図1. 消毒薬の分類と殺菌・不活化の対象となる微生物・ウイルス。
(補綴歯科治療過程における感染対策指針より引用改変)

3. 研究の方法

(1) 実験的多剤耐性菌の作製および過酸化水素光分解殺菌法の耐性菌への殺菌効果の評価

本研究は、薬剤耐性菌、真菌やエンベロープを持たないウイルス (中水準消毒薬対象)、および細菌芽胞 (高水準消毒薬対象) に対するポリフェノール照射殺菌法の殺菌効果・不活化の検証と作用メカニズムの解明を目的としている。まずは、殺菌対象の一つである多剤耐性菌を獲得する必要がある。実験的多剤耐性菌の作製のために、一般的に耐性を発現しやすいといわれる細菌数種を供試菌として耐性誘導試験を行った。細菌を 5×10^5 程度になるように懸濁し、ドライプレート ‘栄研’ (7種の一般的な抗菌剤に対する薬剤感受性キット) にそれぞれ播種した。培養後、各抗菌剤における最小発育阻止濃度 (MIC) を決定した。ドライプレートから 1/2MIC に相当する培養液を採取し、7種すべてを混合した。混合液を寒天培地に播種して培養し、獲られたコロニーからさらに菌懸濁液を作製し、上記の工程を繰り返す。その結果、特に Escherichia coli

および *Pseudomonas aeruginosa* において明確な耐性が認められた。これら耐性獲得細菌は、以後の実験に適宜使用できるように、その懸濁液を -40°C で冷凍保存した。

次に、これまでの研究において、より詳細なデータが得られている過酸化水素光分解殺菌法（3%過酸化水素に 365 nm LED を照射して得られる水酸化ラジカルを利用した殺菌法）による殺菌試験を耐性獲得細菌に対して行った。

(2) 細菌芽胞の作製方法の確立および過酸化水素光分解殺菌法の殺菌効果の評価

高水準消毒薬対象である細菌芽胞に対する過酸化水素光分解殺菌法の効果を評価するために、まずは細菌芽胞の作製を行った。本研究では *Bacillus cereus* および *Bacillus subtilis* を細菌芽胞形成菌として用いた。BHI 寒天培地での前培養後、Schaeffer の芽胞形成寒天培地を使用して細菌芽胞を形成させた。培養期間中は 24 時間ごとに位相差顕微鏡による観察および Wirtz 染色法を用いた光学顕微鏡による観察を行い、芽胞形成率が 90%以上になるまで培養を継続した。BHI 寒天培地と比較し、芽胞形成培地では効率的に芽胞が形成され、特に *Bacillus cereus* では、およそ 3 日以上での培養期間で 90%以上の細菌が芽胞を形成することが確認できた。

得られた *Bacillus cereus* の細菌芽胞を用いて、本研究の目的であるポリフェノール光酸化反応による殺菌作用の評価に先立ち、その殺菌機序の主体である水酸化ラジカルを効率的に生成する過酸化水素光分解殺菌法による殺菌試験を行う。細菌芽胞に対する本殺菌法の効果は検証されていないため、まずは 3%過酸化水素に波長 400 nm LED を照射する条件において殺菌効果を評価した。

(3) 細菌芽胞に対する過酸化水素光分解殺菌法の効率的殺菌条件の検証および作用機序の解明

過酸化水素光分解殺菌法によって細菌芽胞を効率的に殺菌できる条件を検証するために、(2)と同様に *Bacillus cereus* を用いて作製した細菌芽胞を芽胞懸濁液として殺菌試験に使用した。過酸化水素濃度は 3%とし、LED の波長条件を 365 nm（紫外線 A 波）および 400 nm（青色可視光）とし、照射照度は $1000\text{ mW}/\text{cm}^2$ として殺菌試験を行った。

次に細菌芽胞に対する過酸化水素光分解殺菌法の作用機序を解明するために、殺菌処理後の細菌芽胞の形態を走査型電子顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 実験的多剤耐性菌の作製および過酸化水素光分解殺菌法の耐性菌への殺菌効果の評価

Escherichia coli および *Pseudomonas aeruginosa* から得られた多剤耐性菌に対して、過酸化水素分解殺菌法（3%過酸化水素に 365 nm LED を照射して得られるラジカルを利用した殺菌法）の殺菌効果を検証したところ、高い殺菌効果を示した。特に *Escherichia coli* においては 30 秒の照射で 3-log 程度の減少が認められた。更に、耐性を獲得していない細菌に対する殺菌効果とほぼ同等であることも確認した。すなわち、本殺菌法は、抗菌剤への耐性の有無に関わらず、非常に短時間で高い殺菌効果を発揮することが明らかになった。

(2) 細菌芽胞の作製方法の確立および過酸化水素光分解殺菌法の殺菌効果の評価

Bacillus cereus から得られた細菌芽胞（図 2）を用いて、まずは 3%過酸化水素に波長 400 nm の LED 照射の処理条件下で過酸化水素光分解殺菌法の殺菌効果を評価した。栄養型細菌および細菌芽胞ともに、照射時間依存的な殺菌効果が確認できた。ただし、栄養型細菌では 3 分間の殺菌処理で 4-log 以上の生菌数の減少が認められたことに対し、細菌芽胞では 5 分間の殺菌処理で 2-log 程度の生菌数減少であった。以上から、細菌芽胞は栄養型細菌と比較して、本殺菌法に抵抗性を示すものの、ある程度の殺菌効果はあることが示唆された。

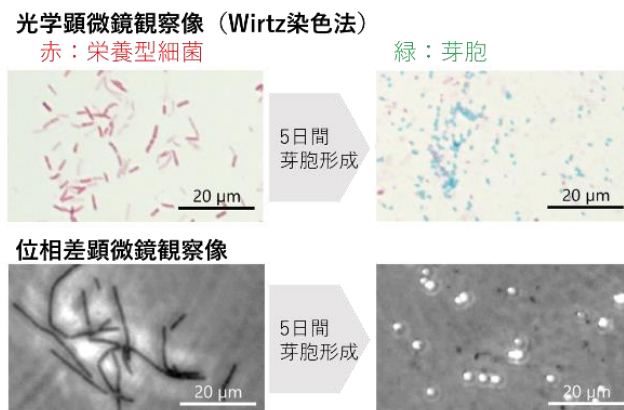


図2. *Bacillus cereus*の細菌芽胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 穴戸俊一、白土翠、倉内美智子、中村圭祐、菅野太郎、庭野吉己
2. 発表標題 Bacillus cereus芽胞に対する過酸化水素光分解殺菌法の殺芽胞効果
3. 学会等名 日本防菌防黴学会 第49回年次大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------