

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23750217

研究課題名（和文）

再生医療の発展に資する殺菌性ラジカル生成光反応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 biocidal radicals-producing photoreaction for the progression of regenerative medicine

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

研究成果の概要（和文）：

細胞緩衝液系における近紫外線発光ダイオード照射による微生物殺菌能を評価した。積算照射量 30 J/cm<sup>2</sup>において、大腸菌は 1/10000、黄色ブドウ球菌は 1/1000、酵母は 1/100 まで減少した。最も高い活性酸素種発生抑制効果を示した抗酸化剤であるモリンを添加し、ヒト皮膚繊維芽細胞と共培養後、近紫外線照射による細胞の比増殖速度に与える影響を調べた。その結果、積算照射量 5.0 J/cm<sup>2</sup>において、モリンの添加は比増殖速度を 34%増加させた。

研究成果の概要（英文）：

The antimicrobial ability of near-ultraviolet irradiation was investigated by a bactericidal assay in a cell buffer solution with a light-emitting diode. At 30 J/cm<sup>2</sup> of accumulated near-ultraviolet irradiation, survivors of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Saccharomyces cerevisiae* reduced to 1/1000, 1/100 and 1/100 of their initial survivors, respectively. The effect of near-ultraviolet irradiation on specific growth rate of human neonate dermal fibroblasts was determined after addition of morin as an antioxidant to cell cultivation broth, followed by irradiation. Morin had the highest inhibition efficacy against generating reactive oxygen species in cells. As a result, the addition of morin increased the specific growth rate by 34% at 5.0 J/cm<sup>2</sup> irradiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学・機能材料デバイス

キーワード：滅菌、活性酸素種、細胞毒性、近紫外線、抗酸化剤

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトあるいは他の動物から調製される血液、凝固因子、免疫グロブリン、骨などの生体材料やタンパク様材料製品は、細菌、酵母、かび、ウイルス、マイコプラズマなどによるコンタミネーションの可能性があり、これら微生物を滅菌することは極めて重要である。この問題は、近年飛躍的な進歩が熱望されている iPS 細胞や ES 細胞を用いた再生医療分野において重大な懸案事項である。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、細胞採取に加え、最終生物製品を得るまでに細胞の樹立、維持、増幅、分化誘導そして移植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、無菌的な細胞生物製品を提供するために、採取した細胞懸濁液に混入している細菌やウイルス、感染細胞、そして生細胞を含む生物製品とするま

での加工工程における微生物の滅菌を如何に達成するのか、つまり生細胞の微生物滅菌法の確立が大命題である。

現在、細胞の滅菌処理は、殺菌剤や抗生物質の添加により行われているが、加熱や放射線処理と同様に細胞自身に影響を与える危険性があり、またろ過による滅菌は、ウイルスやマイコプラズマの混入の危険性がある。従って、生細胞に対する微生物の最適な滅菌法は存在せず、微生物汚染が判明した細胞は直ちに廃棄処理されているのが現状である。従って、細胞生物製品の無菌性を確保するために細胞の微生物滅菌技術の確立は急務である。

## 2. 研究の目的

iPS 細胞の開発は、受精卵や ES 細胞を全く使用せずに分化万能細胞を単離培養することを可能とし、難治性疾患に対する再生医療を飛躍的に進歩させる技術であるといえよう。しかし、この夢のような技術を用いた細胞、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、採取した生細胞および細胞を含む生物製品の細菌やウイルスによるコンタミネーションである。本研究は、殺菌剤や抗生物質、ろ過によらない、細胞内物質の光反応により生成する殺菌性ラジカルを利用した再生医療の発展に資する滅菌技術を構築することを目的とする。

## 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

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) を使い、測定時間は瞬時とし、LED 素子と測定部との距離は 20 もしくは 50 mm とした。

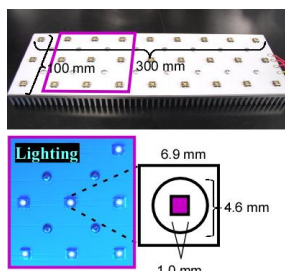


図 1 LED 照射装置の外観

### (2) 近紫外線照射 LED による細胞緩衝液系における微生物殺菌条件の決定

近紫外線は、細胞内に活性酸素種 ( $\cdot\text{OH}$  ラジカル、過酸化水素) を発生することにより DNA の酸化的損傷を引き起こし殺菌する。本研究では純水系ではなく、細胞緩衝液系とし

て PBS に懸濁させた微生物に対する近紫外線照射殺菌条件 (照射時間、照射距離) を検討した。試験微生物は、大腸菌、黄色ブドウ球菌、酵母とした。

深底 90 mm シャーレに  $2 \times 10^3 \sim 10^4$  cells/ml の菌液 20 ml を調製し、 $37^\circ\text{C}$  で照射処理した。近紫外線照射は菌液界面から 50、20 mm 離れた上部から行った。生菌数は、0.7% Tween 80 入り生理食塩水で 10 倍段階希釈し、各希釈液 100  $\mu\text{l}$  を SCDLP 寒天培地に塗布し、コロニーカウント法で決定した。

### (3) 動物細胞に対する近紫外線照射毒性

#### ① MTT アッセイ法

近紫外線による殺菌は、細胞内における活性酸素種の発生に伴うため、動物細胞においても同様に毒性に働くことが推測される。そこで、当該 LED 装置による照射距離 20 mm、365 nm 照射におけるヒト皮膚繊維芽細胞 (NB1RGB 株) に対する照射毒性評価を行った。評価方法は、96 ウェルプレートに D-MEM 培地を使用し  $5 \times 10^3$  cells/well で播種し、80% コンフルエントまで培養後、培地を PBS に置換し、近紫外線照射を行った。生細胞率は MTT アッセイ法により決定した。

#### ② トリパンプルー色素排除法

当該照射装置による照射距離 20 mm、365 nm 照射における NB1RGB 株に対する照射毒性をトリパンプルー色素排除法により決定した。6 ウェルプレートに D-MEM 培地を使用し  $2 \times 10^5$  cells/well で播種し、20 時間培養後、D 照射処理した (図 2)。照射後、24 時間後に生細胞数を計数した。また、本試験の前に培地に対する照射の影響を調べるため、照射処理した培地に細胞を播種し、細胞増殖の程度を調べた。

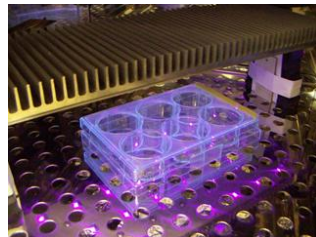


図 2 LED 照射装置による細胞照射の様子 (照射距離 65 mm)

### (4) 近紫外線照射毒性を低減する抗酸化性化合物の効果

#### ① 抗酸化性化合物の有効濃度の決定

比較的安価な抗酸化性化合物、(+)-カテキン、(-)-エピガロカテキンガレート、モリン、ケルセチン、レスベラトロールの中で、最も抗酸化効果の高い化合物を選定するため、CellROX™ Deep Red Reagent (Invitrogen) を使い、近紫外線照射による活性酸素種の発生抑制効果を検証した。96 ウェルプレートに

NB1RGB 株を  $2 \times 10^4$  cells/well で播種し、24 時間培養後、30~200  $\mu\text{M}$  範囲で抗酸化性化合物を添加した。3 時間培養後、積算照射量  $15 \text{ J/cm}^2$  で処理し、CellROX 試薬を用いて細胞内で発生した活性酸素種量の相対比から、抗酸化性化合物の添加濃度に対する活性酸素種発生阻害率を算出した。そして、50% 発生阻害濃度を決定した。

#### ②近紫外線照射毒性を低減する抗酸化性化合物の効果

365 nm 照射処理における NB1RGB 株に対する抗酸化性化合物であるモリンによる近紫外線照射毒性抑制効果を細胞比増殖速度で検討した。モリンの濃度は  $\text{IC}_{50}$  の  $90 \text{ }\mu\text{M}$  とした。6 ウェルプレートに D-MEM 培地を使用し  $2 \times 10^5$  cells/well で播種し 20 時間培養した。モリンを  $90 \text{ }\mu\text{M}$  になるように添加し、3 時間静置培養後、照射処理し、培地交換を行い、24、48、72 時間後に生細胞数を計数した。そして、生細胞数と生細胞率から比増殖速度を算出した。照射量は、殺菌力に対応させ設定した (表 1)。

表 1 殺菌の程度と積算照射量の関係

殺菌の程度 (試験菌)	積算照射量 ( $\text{J/cm}^2$ )
-3 log (大腸菌)	15.1
-2 log (大腸菌)	12.2
-1 log (大腸菌)	9.59
-0.5 log (大腸菌)	8.27
-0.5 log (黄色ブドウ球菌)	5.04

#### (5)抗酸化性化合物分岐型水溶性ポリマーの合成

##### ①抗酸化性化合物とポリマー主鎖のリンカーとなるペプチドの合成

リンカーペプチドは、カテプシン B 特異的分解配列である  $\text{NH}_2\text{-GlyPheLeuGly-COOH}$  とした。合成は、一般的な Wang Resin を用いた固相法を利用し、 $\text{NH}_2\text{-PheLeuGly-COOH}$  を合成した。精製は、HPLC で Inertsil WP300 C18 ( $\phi 20 \times 200 \text{ mm}$ , GL Science) カラム、移動相は TFA 含有アセトニトリル-水系で行った。

##### ②ポリマー主鎖となるモノマー合成

ポリマー主鎖となるモノマーは 2 種類必要である。一つは、水溶性を示すメタクリル酸誘導体モノマーであり、もう一方はグリシンを縮合したペプチドリンカーを結合させる

メタクリル酸モノマーである。

水溶性メタクリル酸誘導体モノマーは、メタクリロイルクロライドと 1-アミノ-2-プロパノールの反応により合成した。

グリシン-メタクリル酸モノマーは、メタクリロイルクロライドとグリシンを反応させることで合成した。

#### 4. 研究成果

##### (1)近紫外 LED 装置の放射スペクトルと放射強度

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 3 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  $8.39 \text{ mW/cm}^2$  であった。

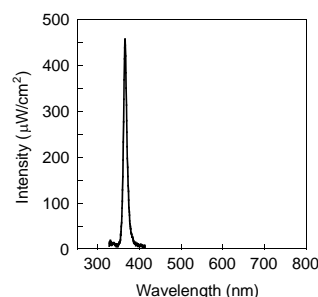


図 3 LED 放射スペクトル

##### (2)近紫外線照射による細胞緩衝液系における微生物殺菌条件の決定

図 4 は、照射距離 50 mm の時の大腸菌に対する殺菌曲線である。その結果、 $17 \text{ J/cm}^2$  (60 分間照射) の照射量で検出限界以下まで殺菌できることが分かった。しかし、 $8.5 \text{ J/cm}^2$  (30 分間照射) の照射量では 2 桁しか減菌することができず、殺菌速度としては不十分と考えた。

そこで、照射距離を 20 mm に変更し、殺菌力の評価を行った。大腸菌に対しては、検出限界以下まで殺菌するためには  $30 \text{ J/cm}^2$  (60 分間照射) の照射量が必要であったが、 $15 \text{ J/cm}^2$  (30 分間照射) 照射における残存生菌比を 50 mm と比較して 1 桁下げることができた (図 5)。この照射距離条件で、他の微生物についても同様に試験した。その結果、 $30 \text{ J/cm}^2$  (60 分間照射) で黄色ブドウ球菌を  $10 \text{ cfu/ml}$  (図 6)、酵母を  $20 \text{ cfu/ml}$  (図 7) まで減少させることができた。今回の実験では、初発生菌数を細菌では  $10^4$  オーダー、酵母では  $10^3$  オーダーとしたため生菌が残存したが、1 桁低い初発生菌数であれば、 $15 \sim 30 \text{ J/cm}^2$  照射量で  $10 \text{ cfu/ml}$  未満にすることができると示唆された。

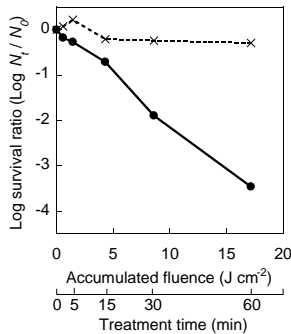


図4 大腸菌に対する近紫外線照射の殺菌効果 (照射距離 50 mm)

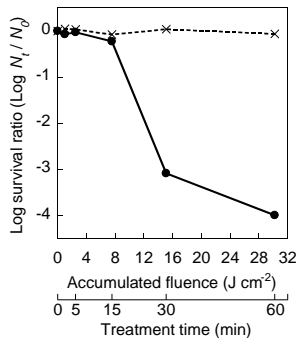


図5 大腸菌に対する近紫外線照射の殺菌効果 (照射距離 20 mm)

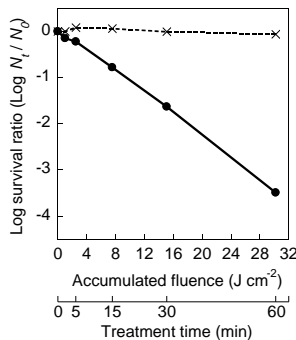


図6 黄色ブドウ球菌に対する近紫外線照射の殺菌効果 (照射距離 20 mm)

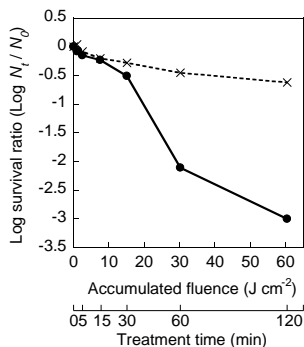


図7 酵母に対する近紫外線照射の殺菌効果 (照射距離 20 mm)

(3) 動物細胞に対する近紫外線照射毒性  
① MTT アッセイ法

近紫外線照射後の生細胞率を MTT アッセイ法により決定した。積算照射量 15 J/cm<sup>2</sup> (30 分間照射) の場合、生細胞率は 85%であり、30 J/cm<sup>2</sup> (60 分間照射) の場合 22%であった。従って、適当な LED 照射処理条件は、高い殺菌性と低度の細胞毒性を示した 20 mm の照射距離での積算照射量を 15 J/cm<sup>2</sup> (30 分間照射) と定めた。

しかし、その後の再実験より、MTT アッセイ系で測定する吸光度に近紫外線照射が大きく影響することが判明し、測定系として不適であることが分かった。そこで、トリパンブルー色素排除法で検討することとした。

② トリパンブルー色素排除法

始めに、培地に与える近紫外線照射の影響を細胞増殖度で検証した。図8に示すように、近紫外線照射した培地に細胞を播種して24時間後の生細胞数と比較すると30 J/cm<sup>2</sup> (60分間照射) 以下であれば大きな影響はないことが分かった。48時間以上培養した場合、照射による増殖への影響が認められたため、数日培養する際は、照射後、培地を交換することが必要であると示唆された。従って、近紫外線照射毒性試験では、照射して24時間後の生細胞数および生細胞率を測定し、その評価を行った。その結果、積算照射量が増加するにつれて生細胞数と生細胞率が減少することが分かり、測定系としてトリパンブルー色素排除法が適していると考えられた (図9)。

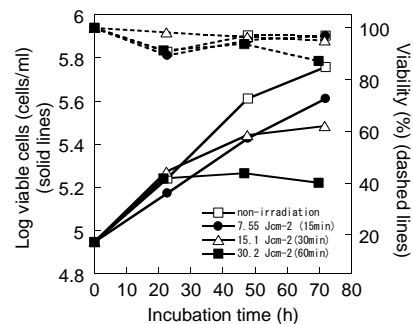


図8 D-MEM 培地に対するヒト皮膚繊維芽細胞の増殖度に及ぼす LED 照射の影響

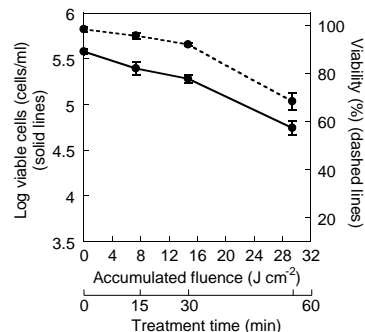


図9 ヒト皮膚繊維芽細胞に対する LED 照射の影響

(4) 近紫外線照射毒性を低減する抗酸化性化

化合物の効果

①抗酸化性化合物の有効濃度の決定

CellROX を用いた細胞内活性酸素種生成を検討した結果、抗酸化性化合物による 50%活性酸素種発生抑制濃度は、表 2 のようになった。IC<sub>50</sub> 濃度を比較することにより、モリンが最も抑制濃度が低いことが分かった。従って、以降の実験ではモリンを 90 μM に設定し、LED 照射毒性抑制効果を検証することとした。

抗酸化性化合物	IC <sub>50</sub> (μM)
(+)-カテキン	濃度依存性なし
(-)-エピガロカテキンガレート	180
モリン	90
ケルセチン	150
レスベラトロール	130

表 2 50%活性酸素種発生抑制濃度

②近紫外線照射毒性を低減する抗酸化性化合物の効果

照射量 15 J/cm<sup>2</sup> のときの比増殖速度を図 10 に表した。照射した場合、モリンの添加に影響することなく、細胞数の増減は認められず、照射なしの比増殖速度と比較して明らかな速度の低下が認められた。従って、照射量を低下して、比増殖速度に対するモリンの添加効果を再度検討することとした。

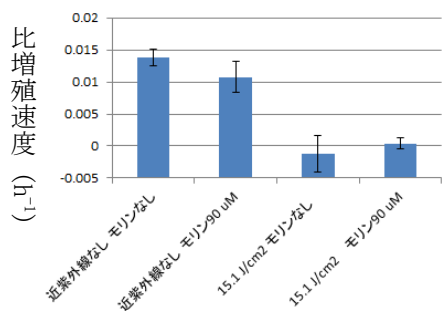


図 10 近紫外線 (15 J/cm<sup>2</sup>) あり/なし、モリン添加あり/添加なしにおける比増殖速度の比較

照射量 5.0 J/cm<sup>2</sup> のときの比増殖速度を図 11 に表した。照射した場合、比増殖速度は照射なしと比較し、30%減少することが分かった。一方、モリンを添加し照射した場合、照射なしと比較し 6%減少に留まり、照射ありモリンなしと比較し 34%増加した。従って、モリンを添加し共培養することにより、近紫

外線照射の細胞増殖に対する影響を大きく低下させることが分かった。この知見から、モリンを細胞に取り込ませることで、近紫外線感受性を低下させることが期待でき、モリンを分岐させた水溶性ポリマーとして用いることで動物細胞でのみその抗酸化効果を働かせることができるのではないかと考えた。

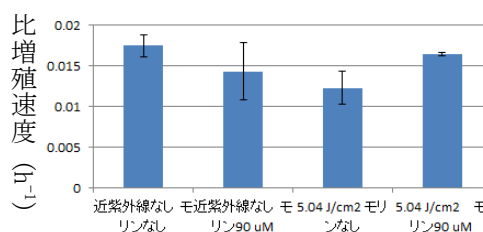


図 11 近紫外線 (5.04 J/cm<sup>2</sup>) あり/なし、モリン添加あり/添加なしにおける比増殖速度の比較

(5) 抗酸化性化合物分岐型水溶性ポリマーの合成

①抗酸化性化合物とポリマー主鎖のリンカーとなるペプチドの合成

カテプシン B 特異的分解配列の一部である NH<sub>2</sub>-PheLeuGly-COOH を固相法で合成し、HPLC で精製し、300 mg 合成した。

②ポリマー主鎖となるモノマー合成

水溶性メタクリル酸誘導体モノマーは、収率 39%、白色結晶で得られ、グリシン-メタクリル酸モノマーは、収率 48%、白色結晶で得られた。

今後、グリシン-メタクリル酸モノマーとペプチド (NH<sub>2</sub>-PheLeuGly-COOH) を縮合し、ニトロフェニルエステル化する。水溶性モノマーとのラジカル共重合によりポリマーとし、ニトロフェニルエステルとモリンのヒドロキシル基との反応により、本研究で合成予定の抗酸化性化合物分岐型水溶性ポリマーを合成できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ① 白井昭博 (他 4 名、1 番目)、Synthesis and biological properties of thiazolyl-acetic acid derivatives as possible antimicrobial agents、Biocontrol Sci.、査読有、Vol. 18、2013、印刷中
- ② 白井昭博 (他 4 名、1 番目)、Action of reactive oxygen species in the antifungal mechanism of gemini-pyridinium salts against yeast、Biocontrol Sci.、査読有、Vol. 17、No. 2、2012、pp. 77-82

〔学会発表〕（計4件）

- ① 白井昭博、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、2013.9.10、千里ライフサイエンスセンター（大阪府）
- ② 白井昭博、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、2013.4.27、あわぎんホール（徳島県）
- ③ 白井昭博、Synergistic antimicrobial activity of a gemini-quaternary ammonium compound and ultraviolet A light generated by a light-emitting diode、II International Conference on Antimicrobial Research、2012.11.21、リスボン大学（ポルトガル・リスボン）
- ④ 白井昭博、ジェミニ型抗菌剤とUVA-LED照射による殺菌相乗効果とその殺菌機構、LED総合フォーラム2012、2012.4.20、あわぎんホール（徳島県）

## 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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：