






学部長	所属長	本部長	副本部長	室長
				

令和4年3月23日

理事長 殿

学長 殿

令和3年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症  
対策支援プロジェクト研究報告書


標記の件に関しまして、別紙のとおり報告いたします。

また、本研究報告の内容は、近畿大学学術情報リポジトリ（KURepo）に公開する旨、承諾いたします。

1. カテゴリー	<input checked="" type="checkbox"/> 研究 <input type="checkbox"/> 開発・提案    /カテゴリーNo    16
2. 企画題目	新しい生活スタイルのための抗微生物マスク開発

研究代表者

所 属：           医学部微生物学          

職・氏名：           講師・朴雅美           

# 令和3年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症 対策支援プロジェクト研究報告書

企画題目	新しい生活スタイルのための抗微生物マスク開発
研究者所属・氏名	研究代表者：朴雅美 共同研究者：農学部・竹森久美子、理工学部・中村優美和 大研医器株式会社・豊島哲・藤島由紀枝

## 1. 研究、開発・提案 目的及び内容

新規抗微生物マスク開発の基礎となる、人体に無害かつ抗微生物効果を有する分子を見つけることを目的とした。その候補分子として、光増感剤や植物由来成分を用い、それらの抗微生物活性を調べる。抗微生物の候補分子をマスク素材である不織布やポリウレタンに浸透させ、各種の微生物に対して効果を有するかを調べることで抗微生物成分を見つけることを目指す。

## 2. 研究、開発・提案 経過及び成果

### 【使用した抗微生物活性候補分子】

光増感剤 3種混合液：メチレンブルー0.1%、ローズベンガル 0.06%、エリスロシン 0.06%

植物由来成分：柿ポリフェノール、枇杷の葉抽出エキス

柿ポリフェノールは共同研究者の竹森准教授らが次の手順で調整した。柿未成熟果をエチルアルコールで脱渋した後、果実を破碎した。これを遠心（1630g, 15分）することで4層に分離し、下から2層目のタンニン細胞画分（柿ポリフェノールが集積している）を採取し、凍結乾燥した。この凍結乾燥物が1%となるよう蒸留水を加え、121°C、15分間処理後の可溶画分を、柿ポリフェノールとした。柿ポリフェノールはカテキン類が多数結合したポリマー分子である。このポリマーの結合を切断し、オリゴマー（3~10程度）にする目的で亜臨界水処理（高温・高压処理）を付した。この際、180, 200, 220, 240°Cの4点で実施し、未処理柿ポリフェノールポリマーと共に研究に用いた。

### 【使用した微生物】

ウイルス：大腸菌を宿主とするバクテリオファージ；Qβ (RNA virus)、T4 (DNA virus)

細菌：グラム陰性菌—大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌。グラム陽性菌—表皮ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌、セレウス菌、枯草菌。

真菌：発芽酵母

### 【結果】

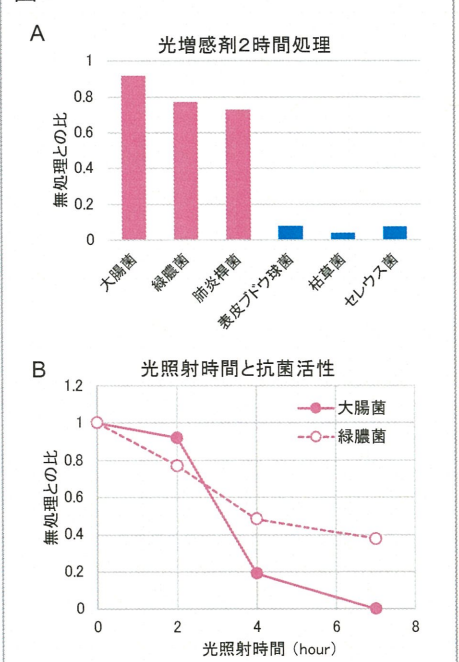
#### 光増感剤

光増感剤混合液を噴霧後乾燥させた不織布に各細菌をのせ、2時間蛍光灯の光（650ルクス）を照射した。その後、不織布から細菌を回収し、寒天培地にて一晚培養し生菌数をカウントした。その結果、図1Aのようにグラム陰性菌（ピンクカラム）に関しては抗菌活性をほとんど示さなかったが、グラム陽性菌（青カラム）は90%以上を死滅させた。そこで、長時間曝露することでグラム陰性菌に対しても抗菌活性を発揮しうるかを調べるため、大腸菌と緑膿菌を用いて時間依存性を調べた。その結果、4時間以上では半数以上を殺菌することが分かった（図1B）。また、光増感剤は抗ウイルス活性を有していることが学外共同研究者の研究結果で明らかとなった（データ提示なし）。一方で真菌である発芽酵母には全く影響しないことが分かった。これらの試薬の安全性に関しては、すでにメチレンブルーやローズベンガルなどは医療現場で生体に投与されており、有害性がないということが示されている。以上の結果から光増感剤をマスクに含ませることでウイルスの感染性を軽減しうる事、また皮膚や環境に由来する細菌の増殖を抑えられる可能性が考えられた。

#### 柿ポリフェノール

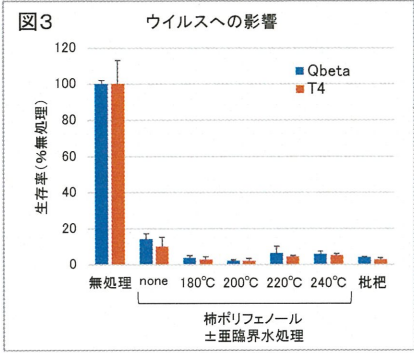
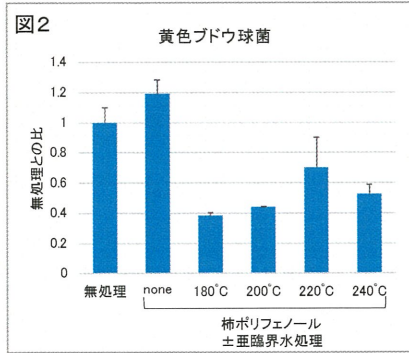
大腸菌と黄色ブドウ球菌への影響を調べた。それぞれの細

図1

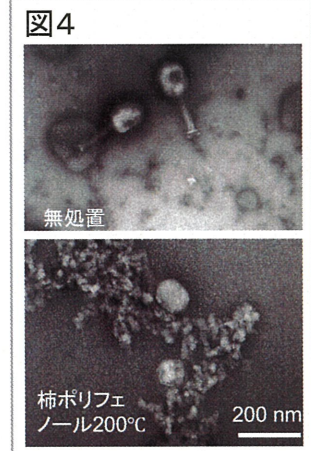




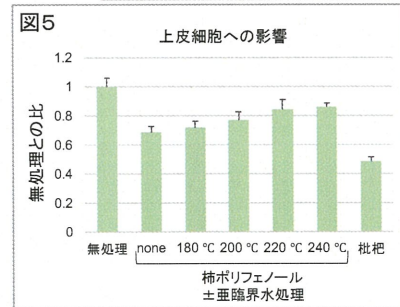
菌を柿ポリフェノール (0.1 mg/mL) 存在下、14 時間培養し、増殖能を無処理と比較した。その結果、大腸菌は全く影響を受けなかった (データ掲示なし)。黄色ブドウ球菌は柿ポリフェノールの亜臨界水処理をしていないものでは影響しなかったが、処理したものは温度によってレベルは異なるが、増殖が抑制されることが分かった (図 2)。



次にウイルスへの効果を調べた。ウイルスを 30 分間柿ポリフェノール及び枇杷の葉エキス (0.1 mg/mL) と混和後に生存率を調べた。すべての処置でウイルス生存率が低下していることが分かったが、200°C 処理柿ポリフェノールが最も強い活性を示した (図 3)。抗ウイルス作用のメカニズムを調べる目的で、200°C 処理柿ポリフェノールとファージを 30 分間混ぜた後、電子顕微鏡像を撮った。その結果、柿ポリフェノールがファージに吸着している事がわかった (図 4)。この結果から、ウイルスに吸着することで宿主への感染性を失った可能性が示唆された。



最後に、細胞への毒性を調べる目的で、培養上皮細胞 (MDCK) の増殖能に対する影響を調べた。各化合物は 10 μg/mL を添加した。いずれも増殖能を低下させたことから (図 5)、直接人体に投与するには注意が必要と言える。しかし、皮膚などは死細胞が何層にも重なっているため、この結果を直接あてはめる必要はない。



【まとめ】

今回の研究結果から、光増感剤・柿ポリフェノールはいずれも抗ウイルス活性を有することが分かった。細菌に対してはグラム陽性菌には有効であるが、陰性菌に対しては抗菌活性が低いことが分かった。抗微生物効果のメカニズムとして、光増感剤はラジカル産生によるが、柿ポリフェノールは明らかではない。今回得られた電子顕微鏡像から、柿ポリフェノールの吸着しやすい化学的な性質が関与していると考えられた。

3. 本研究と関連した今後の研究、開発・提案 計画

柿ポリフェノールの影響は亜臨界水処理により強くなることから、処理によってどういった化学的な変化が起きているのか明らかにしていく。*in silico* 研究として、ウイルスと柿ポリフェノールのオリゴマーの相互作用を解析する。  
また、柿ポリフェノールの抗微生物活性を活用したマスクやうがい薬などへの応用を模索する。

4. 研究成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)

5. 研究、開発・提案 課題の成果発表等

Ah-Mee Park, Sundar Khadka, Fumitaka Sato, Seiichi Omura, Mitsugu Fujita, Ikuo Tsunoda. Bacterial and fungal isolation from face masks: Newly emerged hygiene issues under COVID-19 pandemic (論文投稿中)  
柿ポリフェノールオリゴマーの抗ウイルス活性について (論文執筆中)