

明 細 書

発明の名称：殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤

技術分野

[0001] 本発明は、殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤に関する。

背景技術

[0002] 従来、カテキン類が殺菌作用を有することはよく知られている。これは、カテキン類が溶存酸素を還元することにより過酸化水素を発生し、この過酸化水素が殺菌作用を発揮するためである（例えば、非特許文献1参照）。また、カテキン類の中でもガレート基が付いているエピガロカテキンやエピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートは、細胞膜に対する親和性が高く、殺菌作用が強いことが確認されている（例えば、非特許文献2または3参照）。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：H. Arakawa, M. Maeda, S. Okubo and T. Shimamura, “Role of Hydrogen Peroxide in Bactericidal Action of Catechin”, Biol. Pharm. Bull., 2004, 27, 3, p.277-281

非特許文献2：H. Ikigai, T. Nakae, Y. Hara, T. Shimamura, “Bactericidal catechins damage the lipid bilayer”, Biochimica et Biophysica Acta, 1993, 1147, p.132-136

非特許文献3：加治屋勝子, 熊澤茂則, 中山勉, “茶カテキン誘導体の膜への作用と抗菌活性”, Foods & Food Ingredients Journal of Japan, 2004, 209, p.834-838

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 非特許文献1乃至3に記載のように、カテキン類は殺菌作用を有しており、低濃度でも殺菌効果を発揮する。しかしながら、十分な殺菌効果を得るた

めには、12時間以上の長い作用時間が必要であるという課題があった。

[0005] 本発明は、このような課題に着目してなされたもので、短時間で高い殺菌効果を得ることができる殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤を提供することを目的としている。

課題を解決するための手段

[0006] 上記目的を達成するために、本発明に係る殺菌方法は、カテキン類を含む殺菌剤を殺菌対象に接触させた後、前記殺菌剤に光を照射することを、特徴とする。

[0007] 本発明に係る殺菌方法は、以下の原理により殺菌効果を得ることができる。すなわち、図1に示すように、カテキン類は、溶存酸素(O_2)を還元することにより過酸化水素(H_2O_2)を発生し、抗菌活性を示す。この過酸化水素に光を照射すると、図2に示すように、過酸化水素が光分解されてヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)が生成される。このとき、カテキン類は、高い抗酸化作用を有しているため、そのフェノール性水酸基が e^- および H^+ の供与体として作用する一方で、ヒドロキシルラジカルは消去部位としても作用し、殺菌効果を得られないと通常は考えられる。

ところが、図2に示すように、供与体として作用した後のフェノール性水酸基は、最終的にキノン構造となるため、ヒドロキシルラジカルを消去することはできない。このため、十分な溶存酸素存在下では、フェノール性水酸基は供与体として作用し、ヒドロキシルラジカルを消去しないため、ヒドロキシルラジカルによる殺菌効果が得られる。

このように、本発明者らは、通常は殺菌効果が得られるとは予測できない方法に殺菌効果を見出し、本発明に至ったものである。

[0008] 本発明に係る殺菌方法では、カテキン類を含む殺菌剤を殺菌対象に接触させた後、殺菌剤に光を照射することにより、ヒドロキシルラジカルを生成させることができる。このため、ヒドロキシルラジカルによる殺菌効果が得られ、殺菌対象を殺菌することができる。また、生成されたヒドロキシルラジカルにより、光を照射しないときのカテキン類による殺菌作用と比べ、短時

間でより高い殺菌効果を得ることができる。

[0009] カテキン類は、過酸化水素よりも安定かつ低毒性であるため、直接、過酸化水素を使用する殺菌方法と比べ、安定した殺菌効果が得られるとともに安全性が高い。本発明に係る殺菌方法で、殺菌剤を殺菌対象に接触させる方法は、殺菌剤を塗布したりスプレーしたりする方法や、殺菌対象を殺菌剤の溶液に浸漬する方法など、いかなる方法であってもよい。

[0010] 本発明に係る殺菌方法で、カテキン類は、カテキン、エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート、ガロカテキン、カテキンガレート、ガロカテキンガラートのうちの1種から成っても、2種以上の組合せから成っても、それらの1種または2種以上が複数個重合したもの（例えば、プロアントシアニジン）から成ってもよい。しかし、特に、カテキン類は、ガレート基を有していることが好ましい。ガレート基を有するカテキン類は、細胞膜に対する親和性が高いため、細胞膜を有する殺菌対象に対する殺菌効果が高い。また、ガレート基がない場合と比べて、溶存酸素を還元して発生する過酸化水素の量が多いため、光照射により生成されるヒドロキシルラジカルの量も多くなり、より殺菌効果を高めることができる。

[0011] 本発明に係る殺菌方法で、前記殺菌剤は、カテキン類のみから成っても、他の物質を含んでいてもよい。他の物質は、水、殺菌剤、糖類、着色剤、香料、調味料、カテキン類以外の合成または天然の殺菌剤、その他いかなる物質であってもよい。カテキン類以外の殺菌剤としては、強酸性水、ヨウ素剤（例えば、ヨードチンキ、ポビドンヨードなど）、塩素類（例えば、次亜塩素酸ナトリウムなど）、マーキュロクロム液、グルコン酸クロルヘキシジン、アクリノール、アルコール類（例えば、エチルアルコールなど）、過酸化水素水などが挙げられる。しかし、他の物質は、安全性が高いものがより好ましい。

カテキン類を含む殺菌剤は、カテキン類を含む溶液から成ることが好ましく、特にプロアントシアニジン水溶液から成ることが好ましい。さらに、前

記プロアントシアニジン水溶液は、プロアントシアニジン濃度が0.25乃至4 mg/mLであることが好ましい。プロアントシアニジンは、カテキンを複数個重合した物質であるため、特に高い殺菌効果を得ることができ、また、安全性も高い。

[0012] 本発明に係る殺菌方法で、前記光は、過酸化水素からヒドロキシルラジカルを生成可能であれば、紫外光や赤外光などいかなる波長の光であってもよいが、特に波長が350 nm乃至500 nmであることが好ましい。この場合にも、高い殺菌効果を得ることができ、安全性も高い。特に、可視光を用いることにより、さらに安全性を高めることができる。

照射する光の放射照度は、300 mW/cm²以上が好ましく、より大きいほど効果的である。

[0013] 本発明に係る殺菌装置は、プロアントシアニジン濃度が0.25乃至4 mg/mLのプロアントシアニジン水溶液から成る殺菌剤と、殺菌対象に接触させた前記殺菌剤に、350 nm乃至500 nmの波長を有する光を照射可能に設けられた発光手段とを、有することを特徴とする。

[0014] 本発明に係る殺菌装置は、本発明に係る殺菌方法を好適に実施することができる。本発明に係る殺菌装置によれば、殺菌剤を殺菌対象に接触させた後、発光手段により殺菌剤に光を照射することにより、ヒドロキシルラジカルを生成させることができる。このため、ヒドロキシルラジカルによる高い殺菌効果が得られ、殺菌対象を殺菌することができる。また、プロアントシアニジンは低毒性であるため、安全性も高い。

[0015] 本発明に係る殺菌方法および殺菌装置で、光を照射する発光手段は、例えば、発熱灯、蛍光灯、ハロゲンランプ、キセノンランプ、LED（発光ダイオード）、半導体レーザー、太陽光を利用するものなど、いかなるものであってもよい。また、照射する光は、単一の波長の光であっても、複数の波長を含む光であっても、所定の帯域の波長から成る光であってもよい。

[0016] 本発明に係る光を利用する殺菌剤は、プロアントシアニジン水溶液を含むことを、特徴とし、特に、プロアントシアニジン濃度が0.25乃至4 mg

／mLであることを、特徴とする。

[0017] 本発明に係る光を利用する殺菌剤は、本発明に係る殺菌方法および殺菌装置の殺菌剤として好適に使用される。本発明に係る光を利用する殺菌剤は、殺菌対象に塗布したりスプレーしたりすることにより、殺菌対象に接触させて使用される。その後、光を照射されることにより、ヒドロキシルラジカルを生成することができ、そのヒドロキシルラジカルにより殺菌対象を殺菌することができる。また、プロアントシアニジンは低毒性であるため、安全性も高い。

[0018] 本発明に係る殺菌方法および殺菌装置の殺菌剤、ならびに、本発明に係る光を利用する殺菌剤は、殺菌対象に応じて適宜、選択されることが好ましい。例えば、殺菌対象が口腔内の歯や義歯等から成る場合、殺菌剤は、歯磨き粉やうがい薬、歯科治療用のリンス剤などから成ることが好ましい。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、短時間で高い殺菌効果を得ることができる殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]カテキン類の抗菌活性の原理を説明する反応式である。

[図2]カテキン類のヒドロキシルラジカル発生の原理、および、フェノール性水酸基の変化を示す構造式および反応式である。

[図3]本発明の実施の形態の殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤に関し、プロアントシアニジンとDMP Oとの混和試料に光を照射したときのESRスペクトルである。

[図4]本発明の実施の形態の殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤に関し、活性酸素の生成量に対するプロアントシアニジン濃度の影響を示すグラフである。

[図5]本発明の実施の形態の殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤に関し、活性酸素の生成量に対するレーザー照射時間の影響を示すグラフである。

[図6]本発明の実施の形態の殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤に関し、プロアントシアニジンのヒドロキシルラジカル消去活性を示すグラフである。

[図7]本発明の実施の形態の殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤に関し、プロアントシアニジンのスーパーオキシド消去活性を示すグラフである。

[図8]本発明の実施の形態の殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤の、プロアントシアニジンおよびレーザー照射の殺菌効果を示すグラフである。

[図9]本発明の実施の形態の殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤の、プロアントシアニジン濃度による殺菌効果の変化を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0021] 以下、本発明の実施の形態の殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤について説明する。

本発明の実施の形態の殺菌方法および殺菌装置の殺菌剤、ならびに、本発明の実施の形態の光を利用する殺菌剤は、プロアントシアニジン水溶液から成り、殺菌剤に光を照射する発光手段は、波長が405nmの光を照射可能な半導体レーザーから成っている。

[0022] 本発明の実施の形態の殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤について、実施例として、その特性や効果を調べる試験を行った。

実施例 1

[0023] まず、プロアントシアニジンに対する光照射で生成される活性酸素種の定性定量分析を行った。活性酸素種の定性定量分析は、電子スピン共鳴（ESR）スピントラップ法により実施した。スピントラップ剤として、5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPPO; Labotec社製)を用いた。

[0024] プロアントシアニジン濃度が活性酸素生成量に及ぼす影響を調べるために、プロアントシアニジン（Indina Japan社製）水溶液150μ

LおよびDMPO 150 μ Lを、最終濃度がプロアントシアニジン：0～4 mg/mLおよびDMPO：300 mMとなるように、マイクロプレート（96 well）中で混和した。ウェル中の試料に対して、405 nmのレーザーを出力300 mW（放射照度：940 mW/cm²）で60秒間照射し、ESR装置（製品名「JES-FA-100」、日本電子株式会社製）によりESR測定を行った。

[0025] ESR測定の条件は、以下の通りである。

field sweep : 330.50–340.50 mT
field modulation frequency : 100 kHz
field modulation width : 0.05 mT
amplitude : 80
sweep time : 2 min
time constant : 0.03 s
microwave frequency : 9.420 GHz
microwave power : 4 mW

[0026] 得られたESRスペクトルを、図3に示す。また、ESR装置に付属されているマンガンマーカのシグナルに対する相対強度として各活性酸素の生成量を求めた。その結果を、図4に示す。さらに、レーザー照射時間が活性酸素生成量に及ぼす影響を調べるために、プロアントシアニジン濃度（PA）を4 mg/mLに固定し、レーザー照射時間を0～120秒とし、他の条件は変えずにESR分析を行った。その結果を、図5に示す。

[0027] 図3に示すように、得られたESRスペクトルの超微細構造定数を解析し、定性分析を行った結果、プロアントシアニジンに光を照射することにより、DMPO-OH（ヒドロキシルラジカルのスピントラップ）およびDMPO-OOH（スーパーオキシドのスピントラップ）が生成されていることが確認された。

[0028] 図4に示すように、プロアントシアニジン濃度が1 mg/mLまではDM

PO-OHおよびDMPO-OOHのシグナル強度は増加するが、それ以上の濃度ではシグナル強度は飽和していることが確認された。また、図5に示すように、レーザー照射時間は、DMPO-OHおよびDMPO-OOHの生成にほとんど影響を及ぼさないことが確認された。これは、プロアントシアニジンから生成されるヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドによりDMPO-OHやDMPO-OOHが生成される反応と、ヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドが余剰なプロアントシアニジンによって消去される反応とが釣り合っているためであると考えられる。

実施例 2

[0029] プロアントシアニジンの活性酸素消去能を評価するため、以下の実験を行った。水の超音波分解の反応で生成されるヒドロキシルラジカルが、プロアントシアニジンの添加によってどの程度消去されるかを調べた。超音波の照射には、周波数1650kHz、出力30Wの超音波装置を用いた。プロアントシアニジン水溶液100 μ LおよびDMPO 100 μ Lを、最終濃度がプロアントシアニジン：0～64mg/mLおよびDMPO：150mMとなるように、ガラス試験管中で混和した。混和後直ちに超音波装置にセットして超音波照射を30秒間行い、その後ESR測定を行った。ESR測定には、実施例1と同じ条件を用いた。この測定結果を、図6に示す。

[0030] また、スーパーオキシドに対するプロアントシアニジンの消去活性の評価も行った。スーパーオキシドは、ヒポキサンチン/キサンチンオキシダーゼ反応系により生成した。ヒポキサンチン50 μ L、ジメチルスルホキシド30 μ L、プロアントシアニジン水溶液50 μ L、DMPO 20 μ L、およびキサンチンオキシダーゼ50 μ Lの順で混和し、最終濃度を、ヒポキサンチン：500 μ M、プロアントシアニジン：0～1mg/mL、DMPO：300mM、およびキサンチンオキシダーゼ：0.1U/mLとした。キサンチンオキシダーゼ添加後、試料を10秒間混和し、その後ESR測定を行った。ESR測定には、実施例1と同じ条件を用いた。この測定結果を、図7に示す。

[0031] 図6に示すように、30秒間の水の超音波分解で、ヒドロキシルラジカルは約 $15\text{ }\mu\text{M}$ 生成された。この反応系にプロアントシアニジンを追加することにより、濃度依存的に DMPO-OH の生成が抑制され、約 60 mg/mL のプロアントシアニジン濃度では、 DMPO-OH の生成が全く認められなくなることが確認された。このときの DMPO-OH 生成に対するプロアントシアニジンの IC_{50} （50%阻害濃度）は、 1.5 mg/mL であった。

[0032] また、図7に示すように、プロアントシアニジンを追加しない場合には、 DMPO-OOH は約 $3.5\text{ }\mu\text{M}$ 生成された。この反応系にプロアントシアニジンを追加することにより、濃度依存的に DMPO-OOH の生成量が減少し、約 0.25 mg/mL のプロアントシアニジン濃度では、 DMPO-OOH の生成が認められなくなることが確認された。このときの DMPO-OOH 生成に対するプロアントシアニジンの IC_{50} は、 0.005 mg/mL であった。

実施例 3

[0033] 本発明の実施の形態の殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤の殺菌効果を調べるために、殺菌試験を行った。細菌として、*Streptococcus aureus* ATCC 25923を用い、これを生理食塩水に懸濁して、 $2 \times 10^7\text{ cells/mL}$ の濃度で試験に使用した。細菌懸濁液 $150\text{ }\mu\text{L}$ とプロアントシアニジン水溶液 $150\text{ }\mu\text{L}$ とをマイクロプレート中で混和し、 405 nm レーザーを 300 mW （放射照度： 940 mW/cm^2 ）で10分間照射した。

[0034] プロアントシアニジンの最終濃度を $4\text{ }\mu\text{g/mL} \sim 3.2\text{ mg/mL}$ とし、濃度が殺菌効果に及ぼす影響を調べた。照射後に、試料 $50\text{ }\mu\text{L}$ と 5000 U/mL のカタラーゼ $50\text{ }\mu\text{L}$ とを混和して、プロアントシアニジンに由来する過酸化水素の反応を停止させた。その後、10倍希釈系列を作成し、Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地に播種し、 37°C の好氣的条件下で24時間培養し、殺菌効果の判定を行った。また、

コントロール群として、プロアントシアニジン単独（1 mg/mL）およびレーザー照射単独による殺菌効果の評価も行った。

[0035] プロアントシアニジン濃度が1 mg/mLのときの、レーザー照射がある場合とない場合、プロアントシアニジンもレーザー照射もない場合の試験結果を、図8に示す。また、プロアントシアニジンの濃度を変えてレーザー照射を行ったときの試験結果を、図9に示す。

[0036] 図8に示すように、試験に用いた*S. aureus*は、プロアントシアニジン単独ではほとんど殺菌されないことが確認された。また、図9に示すように、*S. aureus*は、10分間のレーザー照射のみでも、ほとんど殺菌されないことが確認された。一方、細菌とプロアントシアニジンとを混和した試料にレーザー照射を行った場合、殺菌作用が認められた。特に、プロアントシアニジン濃度が0.25～4 mg/mLの場合に最も高い殺菌効果が得られ、99%以上の殺菌効果が確認された。

[0037] なお、プロアントシアニジン濃度が、0.25 mg/mLよりも低い場合、および、4 mg/mLよりも高い場合には、殺菌効果が減弱することも確認された。これは、プロアントシアニジンに対するレーザー照射によって生成されるヒドロキシルラジカルの殺菌効果と余剰なプロアントシアニジンによる抗酸化作用との関係上、このように限られた濃度範囲でのみ高い殺菌効果が得られるものと考えられる。すなわち、プロアントシアニジン濃度を上げると、はじめのうちは、増加するプロアントシアニジンに含まれるカテキンが溶存酸素を還元して過酸化水素を発生し、レーザー照射によって過酸化水素が光分解されて、より多くのヒドロキシルラジカルが生成されるため、殺菌効果が高くなる。しかし、プロアントシアニジン濃度が高くなり、カテキンが還元する溶存酸素が少なくなると、余ったカテキンが既に生成されたヒドロキシルラジカルを消去してしまうため、殺菌効果が低下する。また、これに加えて、高濃度のプロアントシアニジン水溶液では反応液の色が濃くなるため、レーザー光が吸収されてしまい、過酸化水素からヒドロキシルラジカルへの反応がうまく進まなかった可能性も考えられる。

[0038] このように、本発明の実施の形態の殺菌方法、殺菌装置および光を利用する殺菌剤によれば、殺菌剤に光を照射することにより生成されたヒドロキシルラジカルによる殺菌効果が得られ、殺菌対象を殺菌することができる。また、カテキン類の殺菌作用およびヒドロキシルラジカルの殺菌作用による相乗効果が得られる。生成されたヒドロキシルラジカルにより、光を照射しないときのカテキン類による殺菌作用と比べ、短時間でより高い殺菌効果を得ることができる。カテキン類を含むプロアントシアニジンは、過酸化水素よりも安定かつ低毒性であるため、直接過酸化水素を使用する殺菌方法と比べ、安定した殺菌効果が得られるとともに安全性が高い。

請求の範囲

- [請求項1] カテキン類を含む殺菌剤を殺菌対象に接触させた後、前記殺菌剤に光を照射することを、特徴とする殺菌方法。
- [請求項2] 前記カテキン類はガレート基を有していることを、特徴とする請求項1記載の殺菌方法。
- [請求項3] 前記殺菌剤はプロアントシアニジン水溶液から成ることを、特徴とする請求項1または2記載の殺菌方法。
- [請求項4] 前記プロアントシアニジン水溶液は、プロアントシアニジン濃度が0.25乃至4 mg/mLであることを、特徴とする請求項3記載の殺菌方法。
- [請求項5] 前記光は、波長が350 nm乃至500 nmであることを、特徴とする請求項1、2、3または4記載の殺菌方法。
- [請求項6] プロアントシアニジン濃度が0.25乃至4 mg/mLのプロアントシアニジン水溶液から成る殺菌剤と、
殺菌対象に接触させた前記殺菌剤に、350 nm乃至500 nmの波長を有する光を照射可能に設けられた発光手段とを、有することを特徴とする殺菌装置。
- [請求項7] プロアントシアニジン水溶液を含むことを、特徴とする光を利用する殺菌剤。
- [請求項8] プロアントシアニジン濃度が0.25乃至4 mg/mLであることを、特徴とする請求項7記載の光を利用する殺菌剤。