

明 細 書

発明の名称：細胞修復剤および殺菌消毒システム

技術分野

[0001] 本発明は、細胞修復剤および殺菌消毒システムに関する。

背景技術

[0002] 感染症に対するリスクは年齢とともに増加し、我が国における60歳以上の年齢層では、感染症の一つである肺炎が死因の第4位となっている。感染症には、肺炎や敗血症といったような生命に関わる類のものから、皮膚感染である白癬菌症（水虫）や歯科疾患である歯周病などに至るまで、原因となる微生物あるいは感染部位などによって様々な病態が含まれる。いずれの感染症においても病原性微生物の除去が治療の第一目標であり、多くのケースで治療のために抗生物質などの薬剤の投与が行われている。しかしながら、抗生物質の多用は薬剤耐性菌の出現を招き、昨今問題となっている多剤耐性菌による院内感染の発生といったような深刻な問題に繋がることもある。従って、抗生物質の投与に変わる殺菌療法の確立が望まれている。

[0003] 塩化ナトリウムあるいは塩化カリウム水溶液を電気分解して得られる酸性電解水の活性本体は次亜塩素酸であるが（例えば、非特許文献1参照）、この次亜塩素酸が菌体細胞に入ると、活性酸素の一種であるヒドロキシルラジカルが生成され、その強力な酸化力により殺菌効果を発揮する（例えば、非特許文献2参照）。また、過酸化水素の光分解殺菌技術は、過酸化水素に近紫外可視光を照射して過酸化水素をホモリチックに分解することで生じるヒドロキシルラジカルの酸化力を応用した殺菌技術である（例えば、非特許文献3参照）。

[0004] 従来の抗生物質の投与による殺菌療法に対する、酸性電解水や過酸化水素の光分解殺菌技術といったヒドロキシルラジカルを利用した殺菌技術の大きな利点は、耐性菌を発生させないことである（例えば、非特許文献4参照）。酸性電解水は、この利点のため、食品分野のみならず医療分野でも活用さ

れており、特に口腔内感染性疾患や手術時の殺菌消毒の目的でも使用が試みられている（例えば、非特許文献4または5参照）。過酸化水素の光殺菌技術も歯周病への応用が模索されている（例えば、非特許文献6参照）。しかし、酸性電解水および過酸化水素の光分解殺菌技術ともその強い酸化力のため、病原性微生物のみならず疾患部位の細胞に対しても障害を発揮する懸念がある（例えば、非特許文献7乃至9参照）。また、ヒドロキシルラジカルを介さない既存消毒剤にも細胞毒性が強いものがあり、同様に疾患部位の細胞に対しても障害を発揮する懸念はある（例えば、非特許文献10参照）。

[0005] 一方、ポリフェノールは、抗酸化作用を有し、炎症部位において好中球などの炎症性細胞が産生する活性酸素による局所組織の酸化的傷害を抑制する作用を有することが知られており、皮膚外用薬や口腔用剤などに使用されている（例えば、特許文献1乃至6、非特許文献11または12参照）。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：T. Mokudai et al., “Presence of hydrogen peroxide, a source of hydroxyl radicals, in acid electrolyzed water”, PLoS ONE, 2012, 7, e46392

非特許文献2：福崎智司、「次亜塩素酸による洗浄・殺菌機構と細菌の損傷」、日本食品微生物学会雑誌、2009、26、p.76-80

非特許文献3：H. Ikai et al., “Photolysis of hydrogen peroxide, an effective disinfection system via hydroxyl radical formation”, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 49, p.5086-5091

非特許文献4：H. Ikai et al., “In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide”, PLoS ONE, 2013, 8, e81316

非特許文献5：田仲紀陽 他、「透析医療と強酸性電解水」、日本透析医学会雑誌、2004、37、p.1273-1283

非特許文献6：A. Oyamada et al., “In vitro bactericidal activity of p

hoto-irradiated oxydol products via hydroxyl radical generation” , Biocontrol Sciences, 2013, 18, p.88

非特許文献7 : K. Okubo et al., “Cytotoxicity and microbicidal activity of electrolyzed strong acid water and acidic hypochlorite solution under isotonic conditions” , 感染症学雑誌, 1999, 73, p.1025-1031

非特許文献8 : K. Gomi et al., “Microbicidal and cytotoxic effects of functional water in vitro” , Quintessence International, 2010, 41, e166-172

非特許文献9 : 猪飼紘代 他、「過酸化水素光分解により生じるヒドロキシルラジカルの細胞毒性評価」、第64回日本参加ストレス学会学術集会ープログラム・抄録集ー、73ページ

非特許文献10 : 中島啓二 他、「細胞増殖および創傷治癒に対する消毒剤の抑制作用(in vitro)」、日本病院薬剤師会雑誌、2004、40、p.1559-1562

非特許文献11 : M. A. Soobrattee et al., “Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions” , Mutation Research , 2005, 579, p.200-213

非特許文献12 : C. A. RICE-EVANS et al., “Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids” , Free Radical Biology & Medicine, 1996, 20, p.933-956

特許文献

[0007] 特許文献1 : 国際公開2005／092327号

特許文献2 : 特開平6－336422号公報

特許文献3 : 特許第3917370号公報

特許文献4 : 特願2005－213234号公報

特許文献5 : 特開2009－52185号公報

特許文献6 : 特表2010－511026号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 非特許文献 7 乃至 10 に記載のように、酸性電解水、過酸化水素の光分解殺菌技術、および既存の消毒剤が、その強い酸化力のため、病原性微生物のみならず疾患部位の細胞に対しても障害を発揮する恐れがあり、その障害を修復するための技術の開発が期待されていた。また、特許文献 1 乃至 6、非特許文献 11 および 12 に記載のように、ポリフェノールが、炎症性細胞が産生する活性酸素による局所組織の酸化的障害の抑制作用を有することは知られていたが、酸性電解水等によって重度の障害を受けた細胞に対して修復作用を有することは、これまで確認されていなかった。

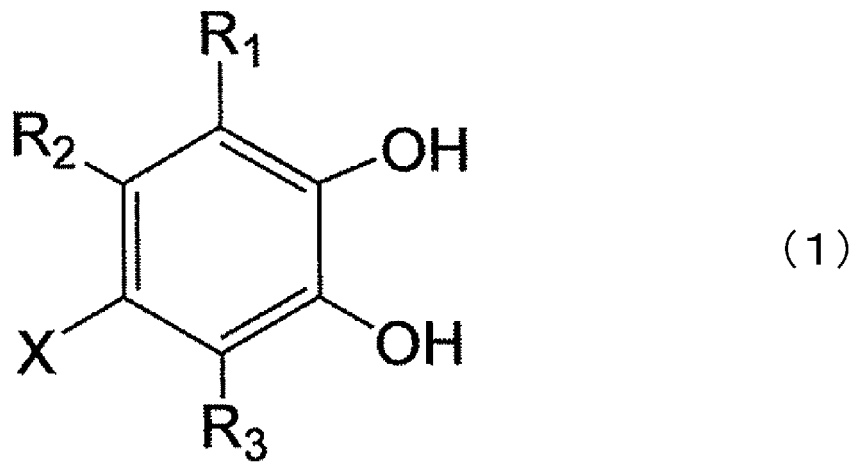
[0009] 本発明は、このような課題に着目してなされたもので、酸性電解水などの酸化力により障害を受けた細胞を修復することができる細胞修復剤、ならびに、安全かつ効率的に、皮膚や口腔内の感染創傷の殺菌および治癒を促進することができる殺菌消毒システムを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者等は、上記の課題を解決すべく鋭意研究の結果、カテコール基あるいはピロガロール基を有する特定のポリフェノールおよびその重合体組成物が、酸性電解水によって重度の障害を受けた細胞に対して、修復効果を有していることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0011] 即ち、本発明に係る細胞修復剤は、下記の一般式（1）で表わされるポリフェノール、その重合体および医薬上許容可能なその塩のうちの、少なくとも 1 種を含むことを特徴とする。

[化1]



(式中、 $R_1 \sim R_3$ は、それぞれ置換または非置換の水素原子、水酸基、ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、チオ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、ヘテロアリールオキシ基、カルボニル基、アミノ基、 C_{1-10} のアルキルアミノ基、スルホンアミド基、イミノ基、スルホニル基、スルフィニル基、 C_{1-10} のアルキル基、 C_{3-12} のシクロアルキル基、 C_{3-12} のヘテロシクロアルキル基、 C_{9-12} のビスシクロアルキル基、 C_{3-12} のヘテロビスシクロアルキル基、 C_{1-10} のアリールアルキル基、 C_{1-5} のヘテロアリールアルキル基、 C_{1-10} のパーハロアルキル基、 C_{1-3} のカルボニルアルキル基、 C_{1-3} のチオカルボニルアルキル基、 C_{1-3} のスルホニルアルキル基、 C_{1-3} のスルフィニルアルキル基、 C_{1-10} のアミノアルキル基、 C_{1-3} のイミノアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、 C_{9-12} のビスシクロアリール基および C_{4-12} のヘテロビスシクロアリールからなる群から選択され、それぞれ独立しており、または、 R_1 、 R_2 、および R_3 の任意の二つが一緒になって置換もしくは非置換の環を形成しており、 X は、置換または非置換の C_{1-20} の脂肪族炭化水素基、 C_{3-20} の芳香族炭化水素基、または C_{3-20} の多環芳香族炭化水素基である。)

[0012] 本発明に係る細胞修復剤は、一般式(1)で表わされるポリフェノール、その重合体および医薬上許容可能なその塩のうちの、少なくとも1種を含むため、殺菌消毒で使用される酸性電解水の酸化力などにより障害を受けた細

胞を修復することができる。また、炎症部位において好中球などの炎症性細胞が産生する活性酸素による局所組織の酸化的傷害の抑制作用も期待できる。

[0013] 本発明に係る細胞修復剤で、前記 R_2 および前記 R_3 は、水素原子であることが好ましい。また、前記 R_1 は、水素原子または水酸基であることが好ましい。これらの場合、特に、重度の障害を受けた細胞の修復効果が高い。

[0014] 本発明に係る細胞修復剤で、前記ポリフェノールは、プロアントシアニジン、(+)-カテキン、クロロゲン酸、カフェイン酸および没食子酸からなる群から選ばれることが好ましい。この場合にも、殺菌消毒で使用される酸性電解水などの酸化力により障害を受けた細胞を修復することができる。

[0015] 本発明に係る殺菌消毒システムは、生体に対して殺菌処理および／または消毒処理を行う殺菌消毒手段と、前記殺菌消毒手段による前記生体の被処理部に対して、本発明に係る細胞修復剤を接触可能に設けられた後処理手段とを、有することを特徴とする。

[0016] 本発明に係る殺菌消毒システムは、殺菌消毒後に、本発明に係る細胞修復剤で処理することにより、殺菌消毒で使用される酸性電解水などの酸化力により障害を受けた細胞を修復することができる。このため、本発明に係る殺菌消毒システムは、安全かつ効率的に、皮膚や口腔内の感染創傷の殺菌および治癒を促進することができる。また、本発明に係る殺菌消毒システムは、取り扱いが容易であり、短時間の処理でも感染部位や手術時の殺菌消毒を安全かつ効率的に行うことができる。殺菌消毒手段としては、例えば、液体の殺菌剤および／または消毒剤を噴射、散布、浸漬、灌流または塗布する装置、気体の殺菌剤および／または消毒剤を充満または噴射する装置が挙げられる。後処理手段としては、例えば、細胞修復剤の溶液または分散液を噴射、散布、浸漬、灌流または塗布する装置が挙げられる。後処理手段は、殺菌消毒手段と別個に操作するようになっていても、殺菌消毒手段と連動して、殺菌消毒手段を操作すると細胞修復剤を接触させるようになっていてもよい。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、酸性電解水などの酸化力により障害を受けた細胞を修復することができる細胞修復剤、ならびに、安全かつ効率的に、皮膚や口腔内の感染創傷の殺菌および治癒を促進することができる殺菌消毒システムを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]本発明の実施の形態の細胞修復剤に関し、様々な希釈率 (dilution) の酸性電解水 (A E W) による、(A) 増殖期のマウス線維芽細胞の増殖率 (cell viability) への影響、(B) 定常期のマウス線維芽細胞の増殖率 (cell viability) への影響を示すグラフである。

[図2]本発明の実施の形態の細胞修復剤に関し、様々な希釈率 (dilution) の酸性電解水 (A E W) により、定常期のマウス線維芽細胞の内部で発生した R O S 量を示すグラフである。

[図3]本発明の実施の形態の細胞修復剤に関し、(A) 4 倍希釈の酸性電解水、(B) 酸性電解水原液により、マウス線維芽細胞の細胞内 R O S を上昇させた後、それぞれジメチルスルフォキシド (D M S O) およびプロアントシアニン (P A) で処理したときの細胞内 R O S 量を示すグラフである。

[図4]本発明の実施の形態の細胞修復剤に関し、増殖期のマウス線維芽細胞を様々な希釈の酸性電解水で処理した後、それぞれ D M S O およびプロアントシアニンで後処理を行ったときの、細胞増殖の程度 (viable cells) を示すグラフである。

[図5]本発明の実施の形態の細胞修復剤に関し、増殖期のヒト歯肉線維芽細胞を様々な希釈の酸性電解水で処理した後、それぞれ D M S O およびプロアントシアニンで後処理を行ったときの、細胞増殖の程度 (cell viability) を示すグラフである。

[図6]本発明の実施の形態の細胞修復剤に関し、増殖期のマウス線維芽細胞を 1 / 4 希釈および原液の酸性電解水で処理した後、(+) - カテキンで後処理を行ったときの、細胞増殖の程度 (viable cells) を示すグラフである。

[図7]本発明の実施の形態の細胞修復剤に関し、増殖期のマウス線維芽細胞を

酸性電解水原液で処理した後、それぞれクロロゲン酸、カフェイン酸および没食子酸で後処理を行ったときの、細胞増殖の程度 (viable cells) を示すグラフである。

[図8]本発明の実施の形態の細胞修復剤に関し、増殖期のマウス線維芽細胞を酸性電解水原液で処理した後、プロアントシアニジンで (A) 1 分間、(B) 5 分間の後処理を行ったときの、細胞増殖の程度 (viable cells) を示すグラフである。

[図9]本発明の実施の形態の細胞修復剤に関し、増殖期のマウス線維芽細胞を (A) クロルヘキシジン原液 (CHL)、(B) イソジン 15 倍希釈液 (ISO) で処理した後、プロアントシアニジンで後処理を行ったときの、細胞増殖の程度 (viable cells) を示すグラフである。

[図10]本発明の実施の形態の細胞修復剤に関し、増殖期のヒト歯肉線維芽細胞を過酸化水素光分解殺菌法 ($H_2O_2 + LD$) で処理した後、プロアントシアニジンで後処理を行ったときの、細胞増殖の程度 (viable cells) を示すグラフである。

[図11]本発明の実施の形態の殺菌消毒システムの、歯周感染症に対する応用の一例を示す使用状態の斜視図である。

発明を実施するための形態

[0019] 本発明の実施の形態の細胞修復剤は、上記の一般式 (1) で表わされるポリフェノール、その重合体および医薬上許容可能なその塩のうちの、少なくとも 1 種を含んでいる。

以下に、様々な試験の結果に基づいて、本発明の実施の形態の細胞修復剤について説明する。なお、本発明は、これらの試験例 (実施例) になんら限定されるものではない。

[0020] [試験 1 : 増殖期および定常期マウス線維芽細胞に対する酸性電解水の影響]

増殖期および定常期のマウス線維芽細胞に対する酸性電解水の影響を調べる試験を行った。試験に使用する酸性電解水 (AEW) は、0.06 ~ 0.

0.8%塩化ナトリウム水溶液を電解質溶液として、電気分解装置（株式会社アルテック社製「ALTRON-MINI AL-700」）を用いて、交流電圧100Vおよび定格電流0.6Aで15分間電気分解することにより得た。得られた酸性電解水のpH、酸化還元電位（ORP）および残留塩素濃度は、pH/ORPメーター（Mettler-Toledo社製「SG2」）および残留塩素メーター（HANNA Instruments Japan社製「HI96771C」）を用いて測定した。その結果、酸性電解水は、pHが2.2～2.7、ORPが1100mV以上、残留塩素濃度が30～60mg/lであることを確認した。

[0021] 試験は、以下のようにして行った。まず、25cm²フラスコで、37℃、5%CO₂条件下で培養した細胞（マウス由来3T3-L1線維芽細胞；DSファーマバイオメディカル株式会社より購入）を、0.25%Trypsin-EDTA液（Life Technologies社製）で処理し、常法に従って、細胞密度が 2×10^4 cells/mlになるよう培地にて細胞懸濁液を調製した。ここで培地は、Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM；Life Technologies社製）に、ウシ胎児血清（Life Technologies社製）、およびペニシリン／ストレプトマイシン溶液（10000units/mlのペニシリン、および10mg/mlのストレプトマイシン；和光純薬工業製）を、それぞれ10%(v/v)、1%(v/v)になるよう添加したものを、増殖用培地として用いた。

[0022] この細胞懸濁液を、100μlずつ96-wellマイクロプレートの各wellに播種した。増殖期の細胞は、37℃、5%CO₂条件下で約25時間培養後、また定常期の細胞は、4日間培養後、培地を除去し、リン酸緩衝化生理食塩水（phosphate buffered saline, PBS, pH7.4）で洗浄後、純水にて希釈した2倍希釈系列の酸性電解水を100μlずつ各wellに加えた。30秒後に2倍希釈系列の酸性電解水を除去し、PBSで洗浄した。

[0023] 増殖期の細胞は、新鮮培地を加え、さらに37℃、5%CO₂条件下で培養を再開した。培養24時間後に、MTT（methyl thiazolyl tetrazolium）法により細胞増殖の程度を測定した。具体的には、培養22時間後にMTT

試薬 (Trevigen社製) を各wellに $10\mu\text{l}$ ずつ加え、さらに 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で2時間培養した。培養後、Detergent試薬 (Trevigen社製) を各 $100\mu\text{l}$ 加え、遮光下、室温で一晩放置した。その後、 595nm での吸光度を、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices社製「FilterMax™ F5 Multi-Mode Microplate Reader」) を用いて測定した。滅菌生理食塩水処理を対照群 (control) とし、対照群の吸光度を 100% とした時の各処理群の割合 (%) を算出した。

[0024] 定常期の細胞は、洗浄後にMTT試薬 (Trevigen社製) を各wellに $10\mu\text{l}$ ずつ加え、さらに 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で2時間培養後、同様の操作を行い、対照群 (control) の吸光度を 100% とした時の各処理群の割合 (%) を算出した。なお、各対照群の平均値との有意差は、Dunnettの多重比較解析法で検定した。

[0025] 試験の結果を、図1に示す。図1(a)に示すように、増殖期のマウス線維芽細胞に対しては、酸性電解水 (AEW) の希釈率 (dilution) が32倍程度までは、酸性電解水の希釈率が小さくなる (濃度が高くなる) に従って、細胞の増殖率 (cell viability) が低下していくことが確認された。特に希釈率が4倍以下のときに、細胞の増殖率が有意に低く、酸性電解水により多くの細胞に障害が発生していると考えられる。また、図1(b)に示すように、定常期のマウス線維芽細胞に対しては、酸性電解水 (AEW) の希釈率 (dilution) が2倍以下のときに、細胞の増殖率が有意に低くなっていることが確認され、酸性電解水により多くの細胞に障害が発生していると考えられる。

[0026] [試験2：定常期マウス線維芽細胞に対する酸性電解水の影響－細胞内ROS量－]

定常期のマウス線維芽細胞に酸性電解水を接触させたときに発生する、細胞内の活性酸素種 (ROS) の量を調べる試験を行った。まず、試験1と同様に調製・培養した定常期のマウス線維芽細胞をリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄後、純水にて希釈した4倍希釈系列の酸性電解水を $100\mu\text{l}$ ずつ各w

e l l に加えた。30秒後に2倍希釈系列の酸性電解水を除去し、PBSで洗浄した後、直ちに細胞内ROS量を測定キット（Cell Biolabs社製「Oxisselect™ Intracellular ROS Assay Kit」）を用いて測定した。

[0027] 具体的には、血清無添加培地（DMEMのみ）に溶解した100μlの1mM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein Diacetate（DCFH-DA）を各wellに加え、37℃、5%CO₂条件下で1時間培養した。培養後、リン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、2X Cell Lysis Buffer（Cell Biolabs社製）100μlと血清無添加DMEM100μlとを加え、5分間静置した。各Wellより150μlをブラック96穴マイクロプレートに移し、励起波長450nm、蛍光波長530nmでの蛍光強度をマイクロプレートリーダー（Molecular Devices社製「FilterMax™ F5 Multi-Mode Microplate Reader」）にて測定した。標準曲線は、2',7'-dichlorodihydrofluorescein（DCF）を用いて作製し、細胞内ROS量はDCF当量（nM）で表した。なお、各対照群（control）の平均値との有意差は、Dunnettの多重比較解析法で検定した。

[0028] 試験の結果を、図2に示す。図2に示すように、定常期のマウス線維芽細胞に対しては、酸性電解水（AEW）の希釈率（dilution）が4倍以下のときに、DCF当量が有意に増加しており、細胞内の活性酸素種（ROS）が増えていることが確認された。図1の結果と合わせると、希釈率が2～4倍以下の酸性電解水をマウス線維芽細胞に接触させることにより、細胞内のROSが増加して細胞毒性を誘発し、多くの細胞に障害が発生するものと考えられる。

[0029] [試験3：酸性電解水により上昇した定常期マウス線維芽細胞内ROS量に及ぼすDMSOおよびプロアントシアニジンの影響]

試験2と同様に、定常期のマウス線維芽細胞を、4倍希釈の酸性電解水および酸性電解水原液で30秒間処理した。PBSで洗浄後、ヒドロキシラジカルのスキャベンジャーとして、140mM DMSO（和光純薬工業社製）あるいは1mg/mlのプロアントシアニン（Indeda社製「Leucoselect

(登録商標)」)を含む1 mM DCFH-DAを、各wellに100 μ l加え、37℃、5%CO₂条件下で1時間培養した。培養後、試験2と同様に、細胞内細胞内ROS量を定量した。なお、各群間の有意差は、Tukey-Kramerの多重比較解析法で検定した。

[0030] 試験の結果を図3に示す。図3に示すように、酸性電解水(AEW)により増加した定常期マウス線維芽細胞内のROSは、ヒドロキシラジカルの消去剤であるDMSOおよびプロアントシアニジン(PA)により有意に低下していることが確認された。

[0031] [試験4：増殖期マウス線維芽細胞に対する酸性電解水の細胞毒性に及ぼすDMSOおよびプロアントシアニジンの影響]

試験1と同様に、増殖期のマウス線維芽細胞を、4倍希釈の酸性電解水および酸性電解水原液で30秒間処理した。リン酸緩衝化生理食塩水で洗浄後、血清無添加DMEMで調製した140 mM DMSOあるいは1 mg/mlのプロアントシアニジンを、各wellに100 μ l加え、37℃、5%CO₂条件下で30分間培養した。PBSで洗浄後、新鮮培地を加え、さらに37℃、5%CO₂条件下で24時間培養後の細胞増殖の程度をMTT法で測定した。なお、各群間の有意差は、Tukey-Kramerの多重比較解析法で検定した。

[0032] 試験の結果を、図4に示す。図4に示すように、酸性電解水(AEW)により影響を受けた増殖期のマウス線維芽細胞では、DMSOを使用しても、細胞の増殖状態に変化が認められないことが確認された。このことから、酸性電解水によりROSが増加して細胞毒性が誘発された細胞は、酸性電解水処理直後に重度の障害を受けており、DMSOでROSを消去しても、その障害から回復できないものと考えられる。これに対し、プロアントシアニジンを使用した場合には、細胞の増殖状態が有意に向上していることが確認され、細胞が修復されて障害から回復していると考えられる。

[0033] [試験5：増殖期のヒト歯肉線維芽細胞に対する酸性電解水の細胞毒性に及ぼすDMSOおよびプロアントシアニジンの影響]

増殖期のヒト歯肉線維芽細胞について、試験4と同様の試験を行った。まず、 25 cm^2 フラスコで、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で培養したヒト歯肉線維芽細胞（株式会社プライマリーセルより購入）を、マウス線維芽細胞の場合と同様に、細胞密度が $2 \times 10^4\text{ cells/ml}$ になるよう培地にて細胞懸濁液を調製した。この細胞懸濁液を、 $100\text{ }\mu\text{l}$ ずつ96-wellマイクロプレートの各wellに播種した。 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で24時間培養後、試験4と同様に、増殖期の細胞を4倍希釈の酸性電解水および酸性電解水原液で30秒間処理した。PBSで洗浄後、血清無添加DMEMで調製した 140 mM DMSOあるいは 1 mg/ml のプロアントシアニジン、各wellに $100\text{ }\mu\text{l}$ 加え、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で30分間培養した。PBSで洗浄後、新鮮培地を加え、さらに 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で24時間培養後の細胞増殖の程度をMTT法で測定した。なお、各群間の有意差は、Tukey-Kramerの多重比較解析法で検定した。

[0034] 試験の結果を、図5に示す。図5に示すように、図4と同様に、酸性電解水（AEW）により影響を受けた増殖期のヒト歯肉線維芽細胞では、DMSOを使用しても、細胞の増殖状態に変化が認められないことが確認された。このことから、酸性電解水によりROSが増加して細胞毒性が誘発された細胞は、酸性電解水処理直後に重度の障害を受けており、DMSOでROSを消去しても、その障害から回復できないものと考えられる。これに対し、プロアントシアニジンを使用した場合には、細胞の増殖状態が有意に向上していることが確認され、細胞が修復されて障害から回復していると考えられる。

[0035] [試験6：増殖期マウス線維芽細胞に対する酸性電解水の細胞毒性に及ぼす（+）-カテキンの影響]

試験4と同様に、増殖期のマウス線維芽細胞を、4倍希釈の酸性電解水および酸性電解水原液で30秒間処理した。PBSで洗浄後、血清無添加DMEMで調製した 1 mg/ml の（+）-カテキン（東京化成工業社製）を各wellに $100\text{ }\mu\text{l}$ 加え、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で30分間培養した。

PBSで洗浄後、新鮮培地を加え、さらに37℃、5%CO₂条件下で24時間培養後の細胞増殖の程度をMTT法で測定した。なお、各群間の有意差は、Tukey-Kramerの多重比較解析法で検定した。

[0036] 試験の結果を、図6に示す。図6に示すように、酸性電解水(AEW)により影響を受けた増殖期のマウス線維芽細胞に、(+)-カテキンを使用した場合には、細胞の増殖状態が有意に向上していることが確認された。このことから、酸性電解水処理直後にROSの増加により重度の障害を受けた細胞であっても、(+)-カテキンを使用することにより修復されて障害から回復するものと考えられる。

[0037] [試験7：増殖期マウス線維芽細胞に対する酸性電解水の細胞毒性に及ぼすクロロゲン酸、カフェイン酸および没食子酸の影響]

試験4と同様に、増殖期のマウス線維芽細胞を、酸性電解水原液で30秒間処理した。PBSで洗浄後、血清無添加DMEMで調製した1mg/mlのクロロゲン酸(Sigma-Aldrich社製)、カフェイン酸(東京化成工業社製)および没食子酸(東京化成工業社製)を、各wellに100μl加え、37℃、5%CO₂条件下で5分あるいは30分間培養した。PBSで洗浄後、新鮮培地を加え、さらに37℃、5%CO₂条件下で24時間培養後の細胞増殖の程度をMTT法で測定した。なお、各群間の有意差は、Tukey-Kramerの多重比較解析法で検定した。

[0038] 試験の結果を、図7に示す。図7に示すように、酸性電解水(AEW)により影響を受けた増殖期のマウス線維芽細胞に、クロロゲン酸、カフェイン酸および没食子酸をそれぞれ使用した場合には、細胞の増殖状態が有意に向上していることが確認された。このことから、酸性電解水処理直後にROSの増加により重度の障害を受けた細胞であっても、クロロゲン酸、カフェイン酸または没食子酸を使用することにより修復されて障害から回復するものと考えられる。

[0039] [試験8：増殖期マウス線維芽細胞に対する酸性電解水の細胞毒性に及ぼすプロアントシアニジン後処理時間の影響]

試験4と同様に、増殖期のマウス線維芽細胞を、酸性電解水原液で30秒間処理した。PBSで洗浄後、血清無添加DMEMで調製した1mg/mlのプロアントシアニジン（PA）を各wellに100μl加え、それぞれ室温で1分間および5分間静置した。PBSで洗浄後、新鮮培地を加え、さらに37℃、5%CO₂条件下で24時間培養後の細胞増殖の程度をMTT法で測定した。なお、各群間の有意差は、Tukey-Kramerの多重比較解析法で検定した。

[0040] 試験の結果を、図8に示す。図8（a）に示すように、酸性電解水（AEW）により影響を受けた細胞を、プロアントシアニジンで1分間処理することにより、細胞の増殖状態が有意に向上することが確認された。また、図8（b）に示すように、プロアントシアニジンで5分間処理した場合には、細胞の増殖状態がさらに向上し、対照群（control）の程度まで回復していることが確認された。

[0041] [試験9：増殖期マウス線維芽細胞に対するクロルヘキシジンおよびイソジンの細胞毒性に及ぼすプロアントシアニジンの影響]

試験4と同様に、増殖期のマウス線維芽細胞を、クロルヘキシジン原液（CHL；Xttrium Laboratories社製）あるいは、PBSで15倍希釈したイソジンガーグル液7%（ISO；明治製菓社製）で30秒間処理した。PBSで洗浄後、血清無添加DMEMで調製した1mg/mlのプロアントシアニジン（PA）を各wellに100μl加え、室温で5分間静置した。PBSで洗浄後、新鮮培地を加え、さらに37℃、5%CO₂条件下で24時間培養後の細胞増殖の程度をMTT法で測定した。なお、各群間の有意差は、Tukey-Kramerの多重比較解析法で検定した。

[0042] 試験の結果を、図9に示す。図9に示すように、それぞれクロルヘキシジン（CHL）およびイソジン（ISO）により影響を受けた増殖期のマウス線維芽細胞に、プロアントシアニジン（PA）を使用した場合にも、細胞の増殖状態が有意に向上していることが確認された。このことから、クロルヘキシジンやイソジンなどの消毒薬で処理し、重度の障害を受けたと考えられる細胞であっても、プロアントシアニジンを使用することにより修復されて

障害から回復するものと考えられる。

[0043] [試験 10 : 増殖期のヒト歯肉線維芽細胞に対する過酸化水素光分解殺菌法の細胞毒性に及ぼすプロアントシアニジンの影響]

試験 5 と同様にして得られた増殖期のヒト歯肉線維芽細胞を、PBS で洗浄後、500 mM 過酸化水素水を 100 μ l 加え、405 nm のレーザー光を出力 100 mW (放射照度は 310 mW/cm²) で 30 秒間照射した。レーザー光照射は、インジウムガリウム窒化物をレーザーダイオードとして装着したレーザー装置 (リコー光学株式会社製「RV-1000」) を用いて行った。

[0044] 照射後、1000 U/ml のカタラーゼ (和光純薬工業社製、血清無添加 DMEM で希釈したもの) を 100 μ l 注入した。全 well において本処理が終了した後、血清無添加 DMEM で 2 回洗浄し、プロアントシアニジンを 1 mg/ml 含有する血清無添加 DMEM を 100 μ l 添加し、30 分間培養した。培養後、培地を除去し PBS で洗浄後、新鮮培地を 100 μ l 加え、さらに 37℃、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養後の細胞増殖の程度を MTT 法で測定した。なお、各群間の有意差は、Tukey-Kramer の多重比較解析法で検定した。

[0045] 試験の結果を、図 10 に示す。図 10 に示すように、ヒドロキシラジカルを活性本体とする過酸化水素の光分解殺菌 ($H_2O_2 + LD$) により影響を受けた増殖期のヒト歯肉線維芽細胞に、プロアントシアニジン (PA) を使用した場合にも、細胞の増殖状態が有意に向上していることが確認された。このことから、過酸化水素の光分解殺菌法で処理し、重度の障害を受けたと考えられる細胞であっても、プロアントシアニジンを使用することにより修復されて障害から回復するものと考えられる。

[0046] 以上の各試験結果から、以下のことがわかる。すなわち、図 1 および図 2 に示すように、酸性電解水は、マウス線維芽細胞やヒト歯肉線維芽細胞に対して、細胞内 ROS の上昇を介して細胞毒性を誘発する。この細胞内 ROS は、図 3 に示すように、ヒドロキシラジカル の消去剤である DMSO およ

びプロアントシアニジン処理により有意に低下したことから、すくなくともヒドロキシルラジカルを含んでいる。しかし、図4および図5に示すように、増殖期の細胞に対する酸性電解水の細胞毒性は、DMSOによっては影響を受けなかったことから、細胞は酸性電解水処理直後からROSにより重度の障害を受け、その後にROSを消去しても細胞は障害から回復できない状態にあることがわかる。

[0047] しかしながら、図4乃至図7に示すように、そのような状態の細胞に対しても、プロアントシアニジン、(+)-カテキン、カフェイン酸、クロロゲン酸などで処理した場合には、細胞は障害から有意に回復していた。また、図8に示すように、プロアントシアニジンの試験では、1分間および5分間という短い時間でも有意な回復がみられた。従って、酸性電解水を殺菌消毒の目的で生体に処理した後、プロアントシアニジンを含む上記一般式(1)で表されるポリフェノールで処理する構成は、酸性電解水による組織障害を大きく改善できる、非常に優れた新しい殺菌消毒システムになる。

[0048] 図9および図10に示すように、酸性電解水に加えて、クロルヘキシジンやイソジンなどの消毒薬、ヒドロキシルラジカルを活性本体とする過酸化水素の光分解殺菌法の細胞毒性も、プロアントシアニジン後処理により有意に改善されたことから、細胞毒性のある抗菌化学療法と上記一般式(1)で表されるポリフェノール後処理との組み合わせは、抗菌化学療法の組織障害を軽減する技術として有用である。

[0049] また、再生医療の分野で実施される、各種幹細胞の増殖時における細胞障害性の刺激からの保護技術としての応用も可能である。例えば、骨髄幹細胞の場合は、洗浄処理が必要であるが、洗浄処理中あるいは処理後にポリフェノールを少量加えることで、洗浄処理による細胞障害を軽減することができる。

[0050] 本発明の実施の形態の細胞修復剤を利用した殺菌消毒システムの一例を、図11に示す。図11に示すように、本発明の実施の形態の殺菌消毒システム10は、歯周感染症に対する殺菌消毒システムであり、先端の噴射口11

aから液体を噴出可能に設けられた噴射器本体11と、噴射口11aから酸性電解水を噴射して殺菌処理を行う殺菌消毒手段12と、殺菌消毒手段12による被処理部に対して、噴射口11aから本発明の実施の形態の細胞修復剤であるポリフェノール溶液を噴射可能に設けられた後処理手段13とを有している。

[0051] 殺菌消毒システム10は、以下のようにして使用される。すなわち、図1に示すように、殺菌消毒手段12により歯周病患部（歯周ポケット）1を酸性電解水で灌流し、続いて後処理手段13により歯周病患部1をポリフェノール溶液で灌流する。このとき、ポリフェノール溶液で後処理することにより、酸性電解水の酸化力により障害を受けた細胞を修復することができる。このように、殺菌消毒システム10は、安全かつ効率的に、皮膚や口腔内などの感染創傷の殺菌および治癒を促進することができる。また、殺菌消毒システム10は、取り扱いが容易であり、短時間の処理でも感染部位や手術時の殺菌消毒を安全かつ効率的に行うことができる。

産業上の利用可能性

[0052] 酸性電解水、過酸化水素光分解殺菌、各種消毒薬などの抗菌化学療法に続く上記一般式（1）で表されるポリフェノール処理は、その効果から、医療用の薬剤として使用することができるため、本発明に係る殺菌消毒システムは、医療、特に皮膚治療、口腔内治療の分野において有用である。また、本発明に係る細胞修復剤は、酸性電解水等による殺菌消毒後の細胞の修復に限らず、癌手術や心臓手術、移植手術などの手術後の細胞の修復に利用することもできる。

符号の説明

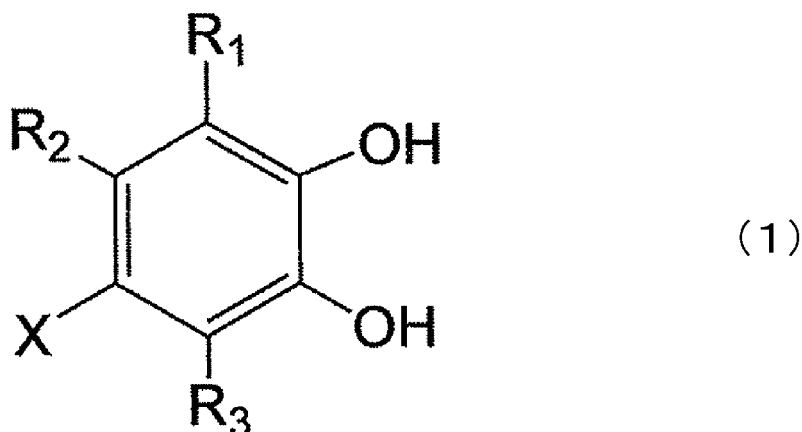
[0053] 1 歯周病患部
 10 殺菌消毒システム
 11 噴射器本体
 11a 噴射口
 12 殺菌消毒手段

1 3 後処理手段

請求の範囲

[請求項1] 下記的一般式（1）で表わされるポリフェノール、その重合体および医薬上許容可能なその塩のうちの、少なくとも1種を含むことを特徴とする細胞修復剤。

[化1]



（式中、 $R_1 \sim R_3$ は、それぞれ置換または非置換の水素原子、水酸基、ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、チオ基、アルコキシ基、アリールオキシ基、ヘテロアリールオキシ基、カルボニル基、アミノ基、 C_{1-10} のアルキルアミノ基、スルホンアミド基、イミノ基、スルホニル基、スルフィニル基、 C_{1-10} のアルキル基、 C_{3-12} のシクロアルキル基、 C_{3-12} のヘテロシクロアルキル基、 C_{9-12} のビスシクロアルキル基、 C_{3-12} のヘテロビスシクロアルキル基、 C_{1-10} のアリーラルアルキル基、 C_{1-5} のヘテロアリーラルアルキル基、 C_{1-10} のパーハロアルキル基、 C_{1-3} のカルボニルアルキル基、 C_{1-3} のチオカルボニルアルキル基、 C_{1-3} のスルホニルアルキル基、 C_{1-3} のスルフィニルアルキル基、 C_{1-10} のアミノアルキル基、 C_{1-3} のイミノアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、 C_{9-12} のビスシクロアリール基および C_{4-12} のヘテロビスシクロアリールからなる群から選択され、それぞれ独立しており、または、 R_1 、 R_2 、および R_3 の任意の二つが一緒になって置換もしくは非置換の環を形成しており、 X は、置

換または非置換の C_{1-20} の脂肪族炭化水素基、 C_{3-20} の芳香族炭化水素基、または C_{3-20} の多環芳香族炭化水素基である。)

[請求項2] 前記 R_2 および前記 R_3 は、水素原子であることを特徴とする請求項1記載の細胞修復剤。

[請求項3] 前記 R_1 は、水素原子または水酸基であることを特徴とする請求項1または2記載の細胞修復剤。

[請求項4] 前記ポリフェノールは、プロアントシアニジン、(+)-カテキン、クロロゲン酸、カフェイン酸および没食子酸からなる群から選ばれることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか1項に記載の細胞修復剤。

[請求項5] 生体に対して殺菌処理および／または消毒処理を行う殺菌消毒手段と、

前記殺菌消毒手段による前記生体の被処理部に対して、請求項1乃至4のいずれか1項に記載の細胞修復剤を接触可能に設けられた後処理手段とを、

有することを特徴とする殺菌消毒システム。