

論文の要旨

申請者 栗原 征宏

研究論文題目

難治性創傷に対する弱酸性次亜塩素酸 (HClO) 水及び銀ナノ粒子 (AgNPs) の効果に関する研究

1 目的

優れた殺微生物活性を持つ HClO 水および AgNPs/CNFS 複合体の *in vitro* での緑膿菌に対する殺微生物活性、線維芽細胞に対する細胞毒性効果、そして緑膿菌感染をした糖尿病発症マウス (C57BLKS/J *Iar^{-/+}Lepr^{db/+}Lepr^{db}*) を用いた *in vivo* での殺微生物活性および創傷治癒効果を評価する。

HClO 水および AgNPs/CNFS 複合体の安全性及び有効性が確立されれば、臨床応用の期待が持てると思われる。

2 対象並びに方法

2-1 HClO 水の緑膿菌に対する殺微生物活性の検討 (*in vitro*)

ATCC 27853 株の冷凍保存された緑膿菌 (1×10^6 Colony Forming Unit (以下、CFU) /100 μ L) を解凍、遠心分離後 Phosphate Buffered Saline (PBS) で洗浄し、培養培地等の余分な蛋白質を除去した。pH 6.5、200 ppm の HClO 水を蒸留水で希釈し、1.25 ppm、2.5 ppm、5 ppm、10 ppm、20 ppm、40 ppm の濃度のものを作製した。それぞれの濃度の 10 mL HClO 水に上記緑膿菌を 100 μ L 混入し、5 分間反応させ、緑膿菌懸濁液をセトリミド寒天培地含有のペトリディッシュ上に播種した。37°C で 24 時間インキュベートした後、生成された緑膿菌のコロニー数を計測した。

2-2 HClO 水のヒト線維芽細胞を用いた細胞傷害性の検討 (*in vitro*)

ヒト線維芽細胞と 800 ppm、200 ppm、50 ppm、12.5 ppm、3.1 ppm、0 ppm に調整した HClO 水を 15 分間反応させた。その後、Ca²⁺、Mg²⁺を含む PBS (+)、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、10%ウシ胎児血清 Fetal Bovine Serum (FBS) を含む DMEM 中で最大 3 日間培養した。生存線維芽細胞を測定するために、WST-1 試薬 200 μ L を添加し、37°C で 1 時間インキュベートし、Immuno Mini プレートリーダーで 450 nm の Optical Density (OD₄₅₀) 値より測定した。

2-3 HClO 水の緑膿菌感染した糖尿病モデルマウスに対する影響 (*in vivo*)

緑膿菌感染した糖尿病モデルマウスを (1) HClO 水洗浄群 (実験群) (2)

純水洗浄群（コントロール群）の 2 群に分け、試験薬で毎日 2 mL で 5 回繰り返し（計 10 mL）洗浄し、創部を観察した。洗浄後の創部をハイドロコロイド（デュオアクティブ®ET）で被覆し閉鎖空間を保ち、表層を 3 cm × 5 cm のエアウォール®で被覆した。

洗浄開始日を第 1 日と設定し、第 1、2、3、6、9、12 日に洗浄前後で創部に存在する緑膿菌を 1 cm × 1 cm のガーゼで各創部につき 10 回上皮化を阻害しないように丁寧に拭き回収した。回収した緑膿菌懸濁液をセトリミド寒天培地含有のペトリディッシュ上に播種した。37°C で 24 時間インキュベートした後、生成された緑膿菌のコロニー数を計測した（N = 7）。

毎日創部をデジタルカメラで撮影し、写真を Adobe Photoshop CS6（Adobe Systems Inc、USA）で解析し創部の面積を算出し、創収縮率を評価した（N = 7）。実験開始後第 12 日にペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル®）の腹腔内過量（麻酔使用量の 4 倍量）投与により犠死させたのち、創部およびその周辺部を病理組織標本作製のため採取した。

2-4 HC10 水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆時における緑膿菌感染した糖尿病モデルマウスに対する影響（*in vivo*）

緑膿菌感染モデルマウスを（1） HC10 水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群（2） 純水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群（3） HC10 水洗浄及び CNFS 被覆群（4） 純水洗浄及び CNFS 被覆群（5） 洗浄被覆処置なし（コントロール）群の 5 群に分け、試験薬 10 mL で 3 日間のみ洗浄し、試験被覆材で覆い、創部を観察した。第 4 日以降は（1）～（4）で毎日純水洗浄および CNFS 被覆を行った。

表層を 3 × 5 cm のエアウォール®で被覆し開放創に近い環境とした。

コロニー数、創収縮率、組織学的評価（N = 3）は、上記 2-3 の実験と同様に行った。

3 成 績

3-1 HC10 水の緑膿菌に対する殺微生物活性と細胞傷害性の検討（*in vitro*）

緑膿菌を用いた *in vitro* の基礎実験では HC10 水の殺微生物活性は非常に強かった。血液、滲出液等が存在する創部に使用した場合殺微生物活性は十分であると同時に、細胞障害性は緩和されると考えられた。このため、比較的低濃度である 200 ppm HC10 水（pH 6.5）は感染創部に対する細胞傷害性が低く、大量繰り返し洗浄による効果的除菌の可能性が示唆された。

3-2 HClO 水の緑膿菌感染した糖尿病モデルマウスに対する影響 (*in vivo*)

糖尿病マウスの創部緑膿菌感染モデルに対する HClO 水の効果の検討では、*in vivo*において創部を 200 ppm の HClO 水で洗浄すると、純水で洗浄した場合と比較して除菌、静菌効果は強く、創収縮面積、肉芽増生について大きな差はなかった。

3-3 HClO 水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆時における緑膿菌感染した糖尿病モデルマウスに対する影響 (*in vivo*)

糖尿病マウスの創部緑膿菌感染モデルに対する HClO 水と AgNPs/CNFS 複合体の効果の検討では、HClO 水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群がコントロール群 (無処置) と比較して多重比較の統計分析で創部菌数、創収縮率、新生毛細血管数に有意差をもって良好な結果を示した。また他 3 群 (純水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群、HClO 水洗浄及び CNFS 被覆群、純水洗浄及び CNFS 被覆群) と多重比較しても有意差をもって良好な結果を示した。しかし、3 群 (純水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群、HClO 水洗浄及び CNFS 被覆群、純水洗浄及び CNFS 被覆群) 中ではいかなる 2 群においても有意差は認めなかった。

4 考 察

in vitro における HClO 水の緑膿菌に対する殺微生物活性と細胞傷害性を検討したところ、血液、滲出液が存在する創部を洗浄する場合は 200 ppm の HClO 水が至適濃度と考えられた。

in vivo において、HClO 水の緑膿菌感染した糖尿病モデルマウスに対する影響を検討したところ HClO 水は第 3 日までであればバイオフィーム形成をおさえ、効果的に静菌している可能性が示唆された。また、12 日間使用しても創収縮面積、肉芽増生には大きな影響を及ぼさないと考えられた。

in vivo において、HClO 水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆時における緑膿菌感染した糖尿病モデルマウスに対する影響を検討したところ、3 日間の使用であれば、効果的な静菌作用を示し、細胞傷害性はごくわずかである可能性が示唆された。

5 結 論

HClO 水及び AgNPs/CNFS 複合体はそれぞれ効果的な殺微生物活性をもっており、併用すると更に相乗的に殺微生物活性及び静菌活性を *in vivo* で増強することが分かった。しかし、細胞傷害性の面を考慮すると短期間の使用が望ましく、更なる検討を行えば臨床応用できる可能性が高い。