

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

くわ ばら まさ ひろ  
栞 原 征 宏

(救急医学専攻)

防衛医科大学校

平成30年度

# 目 次

## 第1章 緒 言

- 1.1 はじめに 1
- 1.2 本研究の意義と目的 2

## 第2章 HC10 の殺微生物活性と細胞傷害性に関する基礎実験 (*in vitro*)

- 2.1 背景と目的 3
- 2.2 対象と方法 3
  - 2.2.1 HC10 の作製
  - 2.2.2 緑膿菌に対する殺微生物活性の検討
  - 2.2.3 ヒト線維芽細胞を用いた細胞傷害性の検討
  - 2.2.4 統計分析
- 2.3 結 果 5
  - 2.3.1 緑膿菌に対する殺微生物活性の検討
  - 2.3.2 ヒト線維芽細胞を用いた細胞傷害性の検討
- 2.4 考 察 5
- 2.5 小 括 6

## 第3章 糖尿病マウスの創部緑膿菌感染モデルに対する HC10 の効果の検討 (*in vivo*)

- 3.1 背景と目的 7
- 3.2 対象と方法 7
  - 3.2.1 糖尿病マウスの緑膿菌感染創モデルの作製
  - 3.2.2 実験方法
  - 3.2.3 組織学的検討
  - 3.2.4 統計分析
- 3.3 結 果 9
  - 3.3.1 創部の緑膿菌コロニー数の評価
  - 3.3.2 創部の外観の評価
  - 3.3.3 創部の面積の評価

3.3.4	創部の組織学的評価	
3.4	考 察	10
3.5	小 括	11
<b>第4章 糖尿病マウスの創部緑膿菌感染モデルに対する HClO と AgNPs/CNFS 複合体の併用効果の検討 (<i>in vivo</i>)</b>		
4.1	背景と目的	12
4.2	対象と方法	12
4.2.1	AgNPs/CNFS 複合体の作製	
4.2.2	対象	
4.2.3	実験方法	
4.2.4	組織学的検討	
4.2.5	統計分析	
4.3	結 果	15
4.3.1	創部の緑膿菌コロニー数の評価	
4.3.2	創部の外観の評価	
4.3.3	創部の面積の評価	
4.3.4	創部の組織学的評価	
4.3.5	創縁部の毛根から再生上皮までの距離	
4.3.6	毛細血管の数	
4.4	考 察	17
4.5	小 括	18
<b>第5章 総 括</b>		
<b>第6章 結 論</b>		
謝	辞	23
付	記	24
略	語 一 覧	25

引 用 文 献	26
图 表	29

## 第1章 緒言

### 1.1 はじめに

壊死性筋膜炎は急速に進行し、診断、治療の遅れが四肢切断や死亡に至る重篤な感染症であり、治療法は早期のデブリードマン、感染症の全身及び局所治療である<sup>(1)</sup>。また災害医療、有事の際には汚染された難治性創傷（皮膚軟部組織感染症、骨髄炎）を有する患者が発生すると想定され<sup>(2)</sup>、長期間抗生剤を全身投与する必要がある患者も多数発生することが予測される。長期間の抗生剤の投与により、多剤耐性菌が出現し他の患者への感染を防ぐために病棟を閉鎖する例もある<sup>(3)</sup>。局所の感染に対する抗生剤治療は効果がないばかりか、耐性菌を出現させるリスクを増やす<sup>(4)</sup>。そのためには局所感染を制御できる殺微生物活性の強い薬剤が必要であり、さまざまな研究が行われているが、それぞれ細胞傷害性があるとされている<sup>(5)</sup>。そこで細胞傷害性が少なく、かつ殺微生物活性の強い消毒薬が必要と考えられる。

無機殺菌化合物である弱酸性次亜塩素酸（HC10）水は食品添加物等に使用されており安全性が高い<sup>(6)</sup>。また弱酸性から中性の性質を示すことから殺菌効果を担う次亜塩素酸分子の存在比率が高い。幅広い抗菌スペクトルを持ち、微生物の殺菌効果やウイルスの不活化効果があり、消毒等で使用されている次亜塩素酸ナトリウムと比較して極めて細胞障害性が低いことが知られている<sup>(7) (8)</sup>。

難治性創傷の治癒に関して、アルカリ性による細胞障害性の強い次亜塩素酸ナトリウムの創傷に対する効果を検討した報告はあるが、中性に近くより細胞障害性の少ない弱酸性次亜塩素酸水の難治性創傷に対する効果を検討した研究は極めて少ない。

一方、キチン/キトサンは生物学的活性、安全性の高さ<sup>(9)</sup>、殺菌性<sup>(10)</sup>、止血<sup>(11)</sup><sup>(12)</sup>、創傷治癒促進<sup>(13)</sup><sup>(14)</sup>のために生体材料として臨床でも使用されている。さらに殺菌性を有する銀ナノ粒子 (AgNPs) を効率的に吸着することが報告されている<sup>(15)</sup>。キチンナノファイバーシート (CNFS) に AgNPs を吸着させた銀ナノ粒子/キチンナノファイバーシート (AgNPs/CNFS) 複合体はより強力な殺微生物活性を示すことが知られている<sup>(16)</sup><sup>(17)</sup>が、活性酸素ラジカルに起因する細胞毒性があるという報告もある<sup>(18)</sup>。

## 1.2 本研究の意義と目的

本研究ではこれらの背景を踏まえて、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、そして緑膿菌の創感染がある糖尿病発症マウス (*db/db* マウス) 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こととした。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。

なお、本研究はすべて防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を受け、動物取り扱い指針に基づき実施した。

## 第2章 HC10の殺微生物活性と細胞傷害性に関する基礎実験 (*in vitro*)

### 2.1 背景と目的

弱酸性次亜塩素酸 (HC10) 水 (pH 5~6.5) は一般の消毒等で使用されている次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) 水 (pH 8~9) と大きく異なる性質を有す。HC10分子はClO<sup>-</sup>と比較し殺微生物活性は約80倍高いことが知られている(図1)。またHC10分子は細菌だけでなく抗ウイルス活性も有しており、ノロウイルス、インフルエンザウイルスにも効果がある。アスペルギルス等の真菌に対しても抗真菌活性も有している。さらにClO<sup>-</sup>と比較し、pHが微弱酸性であるため細胞傷害性が少ないと考察する。

そこで本章ではHC10水による緑膿菌に対する殺微生物活性と、ヒト線維芽細胞を用いた細胞傷害性を検討した。

### 2.2 対象と方法

#### 2.2.1 HC10水の作製

0.5%次亜塩素酸ナトリウム(吉田製薬株式会社、東京、日本)を純水(脱イオン水)で希釈しHC1を添加することでpH 6.5に調整した。濃度はパッケテストの試験紙(共立理化学研究所、東京、日本)を使用し、HC10水の濃度を残留塩化物として測定した。

#### 2.2.2 緑膿菌に対する殺微生物活性の検討

ATCC 27853株(ATCC社、米国)の冷凍保存された緑膿菌(1 × 10<sup>6</sup> Colony Forming Unit (以下、CFU) /100 μL)を解凍、遠心分離後Phosphate Buffered Saline (PBS)で洗浄し、培養培地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  $\mu$ 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（ニッスイ、東京、日本）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 = 6）。

### 2.2.3 ヒト線維芽細胞を用いた細胞傷害性の検討

ヒト線維芽細胞（タカラバイオ株式会社、滋賀、日本）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、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>を含む PBS（+）、Dulbecco's Modified Eagle's Medium（以下、DMEM）、10%ウシ胎児血清 Fetal Bovine Serum（以下、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（Cell Counting Kit、株式会社 同仁科学研究所、日本）200  $\mu$ 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（Nunc, InterMed. Japan、東京、日本）で 450 nm の Optical Density (OD<sub>450</sub>) 値より測定した（N = 6）。

### 2.2.4 統計分析

統計学的検定は JMP Pro 11.2.0（SAS Institute Japan Inc.、東京、日本）を用いた。全ての値は平均  $\pm$  標準偏差として記載し、Tukey-Kramer 検定、Mann-Whitney's U 検定検定を使用した。P < 0.05 を統計学的に有意差有りとした。



## 2.3 結果

### 2.3.1 緑膿菌に対する殺微生物活性の検討

10 ppm 以上の濃度の HC10 水は緑膿菌を完全に殺菌していた。5 ppm ではおよそ 1/1000、2.5 ppm ではおよそ 1/100、1.25 ppm ではおよそ 1/10 にコロニー数は減少しており、濃度依存的であった（図 2）。

### 2.3.2 ヒト線維芽細胞を用いた細胞傷害性の検討

PBS（+）中の HC10 水の細胞傷害性は非常に高く、3.1 ppm 以上では3日間の培養で生存ヒト線維芽細胞はほとんど消滅した。しかし、DMEM 培地および 10%FBS を含む DMEM 培地中では3日間の培養で 800 ppm のみにおいて生存ヒト線維芽細胞がほとんど消滅するという結果で、細胞傷害性は大幅に緩和された（図 3）。

## 2.4 考察

HC10 水の緑膿菌に対する殺微生物活性は非常に強く、培地などのタンパク質を除去した状況下では 10 ppm という低濃度でもわずか5分間で完全殺菌することが可能である。しかし殺微生物活性が強いということは同時に細胞傷害性が強いということを表しており、*in vitro*である PBS（+）中のヒト線維芽細胞は 3.1 ppm という低濃度でも3日間の培養で生存することができなかった。HC10 水はアミノ酸などの有機化合物中第1級アミノ基（ $-NH_2$ ）と相互作用し、殺微生物活性及び細胞傷害性が大きく減少することが知られている。このように 10%FBS を含む DMEM 培地は *in vitro*ではあるがタンパク質を含んでいるので *in vivo*にやや近く細胞傷害性が大幅に緩和されたため、感染した創傷からの血液、滲出液中の有機物と

の相互作用により HC10 水の殺微生物活性及び細胞傷害性を減少させることが示唆された。

## 2.5 小 括

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 low 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。

## 第3章 糖尿病マウスの創部緑膿菌感染モデルに対する HC10 水の効果の検討 (*in vivo*)

### 3.1 背景と目的

糖尿病マウス (C57BLKS/J *lar<sup>-/+</sup>Lepr db/+Lepr db*) の緑膿菌感染モデルを用いて、細胞傷害性が低い 200 ppm HC10 水 (pH 6.5) で毎日繰り返し創部洗浄することで、HC10 水の感染創に与える除菌及び創傷治癒効果を検討した。

### 3.2 対象と方法

#### 3.2.1 糖尿病マウスの緑膿菌感染創モデルの作製

体重 40~45g の 9 週齢 糖尿病マウス (C57BLKS/J *lar<sup>-/+</sup>Lepr db/+Lepr db*) (日本エスエルシー、静岡、日本) を実験で使用した。塩酸メデトミジン 0.15 mg/kg (ドミトール<sup>®</sup>、1 mg/mL、日本全薬、福島、日本)、ミダゾラム 2 mg/kg (ドルミカム<sup>®</sup>、5 mg/mL、アステラス製薬、東京、日本)、酒石酸ブトルファノール 5 mg/kg (ベトルファール<sup>®</sup>、5 mg/mL、Meiji Seika ファルマ、東京、日本) の三種混合腹腔内麻酔下に背部皮膚の毛を剃り、脱毛クリーム (エピラット<sup>®</sup>、クラシエ、東京) を用いて脱毛した。背部中央に 8 mm × 8 mm の全層皮膚欠損創をデルマパンチ (マルホ株式会社、東京、日本) で作製した (図 4)。ATCC 27853 株の冷凍保存された緑膿菌 ( $1 \times 10^6$  CFU /100  $\mu$ L) を解凍し、創部に 1 cm 四方のガーゼを 1 枚置き、その上に上記緑膿菌を 100  $\mu$ L 滴下し、ハイドロコロイド (デュオアクティブ<sup>®</sup> ET、コンバテックジャパン株式会社、東京、日本) で被覆し、表層を 3 cm × 5 cm のエアウォール<sup>®</sup> (株式会社共和、東京、日本) で被覆した。処置終了後、塩酸アチパメゾール 1 mg/kg (アンチセダン<sup>®</sup>、5 mg/mL、日本全薬、福島) を

腹腔内投与し麻酔から覚醒させた。処置後 24 時間経過させたところで緑膿菌感染モデルマウスの完成とした。

### 3.2.2 実験方法

創部を洗浄する試験薬として HC10 と純水の 2 種類を用いた。緑膿菌感染モデルマウスを 2 群に分け、実験群は ( 1 ) HC10 水洗浄群、コントロール群は ( 2 ) 純水洗浄群とした。試験薬で毎日 2 mL を用いた洗浄を 5 回繰り返す ( 計 10 mL ) 、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、コンバテックジャパン株式会社、東京、日本 ) 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® ( 株式会社共和、東京、日本 ) 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 ( ニススイ、東京、日本 ) 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 ( Nikon 1 S1、ニコン、東京 ) 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®、共立製薬株式会社、東京、日本 ) の腹腔内過量 ( 麻酔使用量の 4 倍量 ) 投与により犠牲させたのち、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。

### 3.2.3 組織学的検討

採取した皮膚組織は 10 %ホルマリン溶液（和光純薬工業、大阪）で固定し、毛流方向に検体を切り出し、パラフィンに包埋し、 $4\mu\text{m}$ の厚さに薄切したものを hematoxylin-eosin（以下、HE）染色しプレパラートを作製した。

顕微鏡（Nikon ECLIPSE 50i、ニコン、東京）（倍率 100 倍）と画像統合ソフトウェア（NIS-Elements D 4.13、ニコン、東京）を用いて創部における肉芽の厚さの測定を行った（ $N = 7$ ）。

### 3.2.4 統計分析

統計学的検定は JMP Pro 11.2.0（SAS Institute Japan Inc.、東京、日本）を用いた。全ての値は平均  $\pm$  標準偏差として記載し、Mann-Whitney's U 検定を使用した。 $P < 0.05$  を統計学的に有意差有りとした。

## 3.3 結果

### 3.3.1 創部の緑膿菌コロニー数の評価（図 5）

マウス個体により第 1 日の創部の緑膿菌数に軽度の差が生じたため、全ての個体における第 1 日の緑膿菌数を  $1 \times 10^6$  CFU に統一し、菌数を比で算出した。

第 1 日における、HClO 水及び純水で洗浄後の創部緑膿菌コロニー数はそれぞれ  $9.2 \times 10^2$ 、 $1.2 \times 10^4$  CFU であり実験群はコントロール群より明らかに殺菌されていた。しかし創部をハイドロコロイド（デュオアクティブ<sup>®</sup>ET、コンバテックジャパン株式会社、東京、日本）で被覆し閉鎖空間を保つと、純水で洗浄したものは、約  $1 \times 10^6$  CFU と第 1 日の洗浄前のコロニー数まで上昇した。その後、

HC10 水洗浄群は純水洗浄群と比較し、コロニー数は第 2, 3, 9, 12 日で統計的有意に減少していた。

### 3.3.2 創部の外観の評価 (図 6)

第 2, 3, 6 日において HC10 水洗浄群は観察で、創部に緑膿菌による膜状のバイオフィルムの形成は観察されないが、純水洗浄群はバイオフィルムの形成が観察された。この観察は HC10 水群の殺微生物活性の影響による差と考えられた。

### 3.3.3 創部の面積の評価 (図 7)

HC10 水洗浄群は第 2 日には純水洗浄群に比べ創収縮が観察されたが、以降 3, 6, 9, 12 日においてはいずれも、純水洗浄群が HC10 水洗浄群よりも創収縮していた。しかし統計分析で 2 群に有意差はなかった。

### 3.3.4 創部の組織学的評価 (図 8)

実験群 (HC10 水洗浄群) はコントロール群 (純水洗浄群) と比較して肉芽の厚さはわずかに厚かったが、統計分析で有意差はなかった。

## 3.4 考 察

難治性潰瘍の感染<sup>(19)</sup> <sup>(20)</sup>、足潰瘍<sup>(21)</sup>、圧迫性潰瘍<sup>(22)</sup>の洗浄のために、pH 5.5～6.5 で 35～45℃の水道水、または生理食塩水で効果的に洗浄する方法が開発されている。次亜塩素酸ナトリウムを蒸留水または生理食塩水に添加することによって調整される pH 5.5～6.5 の弱酸性次亜塩素酸 (HC10) 水は pH 8 の次亜塩素酸ナトリウム水と比較して、緑膿菌のようなグラム陰性菌と同様、黄色ブドウ球菌、

B. cereus、B. subtilis などのグラム陽性菌に対して、低濃度（50 ～ 200 ppm）で優れた *in vitro* 殺菌作用を持つことが知られている<sup>(22) (23)</sup>。以上のように HC10 水は塩素系消毒剤の主要な静菌成分として作用する<sup>(23) (24)</sup>。しかし HC10 水は、さまざまな NH<sub>2</sub> または CHO を含む有機物（例えば、タンパク質、アミノ酸、炭水化物）及び無機化合物と容易に反応し、感染した創傷において HC10 分子を急速に失活させる<sup>(25)</sup>。第 3 章の *in vivo* の実験においても、第 2 章で行った *in vitro* の実験と比較して、殺微生物活性が軽減されている。

今回の実験では 200 ppm の HC10 水は、感染した創傷に対して良好な殺菌性を持つが、副作用である強い細胞傷害性をもって大幅に創傷治癒を遅延させることがなかった。これは血液や体液のタンパク質等により HC10 分子が中和され、活性が阻害されていることが理由と考えた。感染創の静菌のためには更に強力な殺微生物活性を持った薬剤が必要な場合もあると考えられる。しかし、強力な殺微生物活性を持つということは、強力な細胞傷害性を持つ可能性が高いので、さらなる検討が必要であることは言うまでもない。

### 3.5 小 括

糖尿病マウスの創部緑膿菌感染モデルに対する HC10 水の効果の検討では、*in vivo* において創部を 200 ppm の HC10 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。

## 第4章 糖尿病マウスの創部緑膿菌感染モデルに対する HC10 水と AgNPs/CNFS 複合体の併用効果の検討 (*in vivo*)

### 4.1 背景と目的

第2章、第3章で閉鎖した緑膿菌感染環境において HC10 水は菌数を減少させるが、創収縮、上皮化について悪影響を及ぼさないことが分かった。しかし、閉鎖創にしてしまうと細菌が増殖し、菌数が前日の値近くまで戻ってしまう。そこで、第4章では HC10 水に加え AgNPs/CNFS 複合体を併用することにより、さらに強力に殺菌する実験を行った。

*in vitro* において AgNPs/CNFS は酸化ストレスによる強い細胞傷害性があることが知られている<sup>(26)</sup>。洗浄及び被覆を限局的に行えば、細胞傷害性を抑え、強い殺微生物活性を有効に発揮でき、感染創の創傷治癒に有利に働くのではないかと考えられる。

また一般臨床では感染創を閉鎖創にすると感染が悪化することが知られており<sup>(27)</sup>、実臨床で感染創は開放創にすることが多い。この実験は被覆材を空気の透過性が良好なものを使用することで開放創に近い環境下で行った。

### 4.2 対象と方法

#### 4.2.1 AgNPs/CNFS 複合体の作製

木之田らの方法<sup>(26)</sup>に準じて作製した。100 mL の蒸留水に 1 g の D-グルコース（和光純薬工業株式会社、日本）と 1 g の銀イオン含有ガラス（環境サイエンス株式会社、日本）を加えてよく攪拌した。この混合物を 121°C、200 kPa の条件で 20 分間オートクレーブ（IMC-30L、池本理化製、日本）を行い、室温で冷却した。その後、その混合液を 1500 rpm、10 分の条件で遠心分離を行い、上清を採取し、



これを AgNPs 含有液（約  $60 \mu\text{g/mL}$ ）とし、保管は  $4^{\circ}\text{C}$  の冷暗所で行った。AgNPs 含有液をペトリディッシュに入れ、 $70 \text{ mm} \times 55 \text{ mm}$  のキチン創傷被覆保護材（ベスキチン<sup>®</sup>W、ニプロ株式会社、大阪、日本）を 1 時間浸した。その後、室温乾燥させたものを AgNPs/CNFS 複合体とした。

#### 4.2.2 対 象

第 3 章で使用した糖尿病マウスの緑膿菌感染創モデルマウスを用いて実験を行った。

#### 4.2.3 実験方法

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  $3 \times 5 \text{ cm}$  のエアウォール<sup>®</sup>（株式会社共和、東京、日本）で被覆し開放創に近い環境とした。

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  $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$  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（ニッスイ、東京、日本）含有のペトリディッシュ上に播種した。 $37^{\circ}\text{C}$  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（ $N = 3$ ）。

毎日創部をデジタルカメラ（Nikon 1 S1、ニコン、東京）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 = 3）。

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<sup>®</sup>、共立製薬株式会社、東京、日本）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。

#### 4.2.4 組織学的検討

採取した皮膚組織は 10 %ホルマリン溶液（和光純薬工業、大阪）で固定し、毛流方向に検体を切り出し、パラフィンに包埋し、4  $\mu$ m の厚さに薄切したものを HE 染色しプレパラートを作製した。

顕微鏡（Nikon ECLIPSE 50i、ニコン、東京）（倍率 100 倍）と画像統合ソフトウェア（NIS-Elements D 4.13、ニコン、東京）を用いて創部における肉芽の厚さの測定及び創縁の残存している毛根から上皮化した部分の距離の測定を行った。また肉芽内の新生毛細血管数（内腔径 20 ~ 50  $\mu$ m、1 mm<sup>2</sup> あたり）を評価した（N = 3）。

#### 4.2.5 統計分析

統計学的検定は JMP Pro 11.2.0（SAS Institute Japan Inc.、東京、日本）を用いた。全ての値は平均  $\pm$  標準偏差として記載し、Tukey-Kramer 検定を使用した。P < 0.05 を統計学的に有意差有りとした。

## 4.3 結果

### 4.3.1 創部の緑膿菌コロニー数の評価 (図 9)

第3章同様、全ての個体の第1日の緑膿菌数を  $1 \times 10^6$  CFU に統一し、菌数を比で算出した。無処置 (コントロール) 群は開放創にしているにも関わらず、菌数は概ね変わらなかった。処置群は全般的に菌数の減少を認め、HC10 水洗浄、AgNPs/CNFS 複合体被覆群は明らかに菌数が減少していた。

### 4.3.2 創部の外観の評価 (図 10)

3日間の HC10 水洗浄、AgNPs/CNFS 複合体被覆群は肉眼的に明らかに創収縮が良好であった。バイオフィーム形成は、純水洗浄群 CNFS 被覆群、無処置群で認められ、無処置群の方がバイオフィームの面積は明らかに大きかった。

### 4.3.3 創部の面積の評価 (図 11)

3日間の HC10 水洗浄群、AgNPs/CNFS 複合体被覆群が最も良好に創収縮した。コントロール群と比較して多重比較の統計分析でその他4群 (HC10 水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群、純水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群、HC10 水洗浄及び CNFS 被覆群、純水洗浄及び CNFS 被覆群) に有意差を認めた。 (\*:  $P < 0.05$  )  
しかし、3群間 (純水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群、HC10 水洗浄及び CNFS 被覆群、純水洗浄及び CNFS 被覆群) の中ではいかなる2群間も有意差を認めなかった。

#### 4.3.4 創部の組織学的評価 (図 12)

3 日間の HC10 水洗浄群、AgNPs/CNFS 複合体被覆群が最も良好に肉芽が増生した。コントロール群と比較して多重比較の統計分析でその他 4 群 (HC10 水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群、純水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群、HC10 水洗浄及び CNFS 被覆群、純水洗浄及び CNFS 被覆群) に有意差を認めた。 (\*:P < 0.05 ) しかし、3 群間 (純水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群、HC10 水洗浄及び CNFS 被覆群、純水洗浄及び CNFS 被覆群) の中ではいかなる 2 群間も有意差を認めなかった。

#### 4.3.5 創縁部の毛根から再生上皮までの距離 (図 13)

水平方向の再生上皮は HC10 水洗浄群、AgNPs/CNFS 複合体被覆群が最も長かった。しかし、コントロール群と比較して統計学的に差を認めなかった。

#### 4.3.6 毛細血管の数 (図 14)

毛細血管数は、HC10 水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群が最も多かった。コントロール群と比較して多重比較の統計分析でその他 4 群 (HC10 水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群、純水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群、HC10 水洗浄及び CNFS 被覆群、純水洗浄及び CNFS 被覆群) に有意差を認めた。 (\*:P < 0.05 ) しかし、3 群間 (純水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群、HC10 水洗浄及び CNFS 被覆群、純水洗浄及び CNFS 被覆群) の中ではいかなる 2 群間も有意差を認めなかった。

#### 4.4 考 察

木之田らは、細菌感染していない糖尿病マウスにおいて、毎日の AgNPs/CNFS 複合体での創部の被覆は酸化ストレスによる細胞傷害性が強く、創傷治癒遅延が起こると報告している<sup>(26)</sup>。しかし、定期的に AgNPs/CNFS 複合体を除去し、創部を生理食塩水で洗浄すると、創傷治癒遅延が改善されると報告している。酸化ストレスのバイオマーカーであるカルボニル化タンパク質で測定しており、2、3 日以内の使用で酸化ストレスによる細胞傷害性を減じることができると述べている。今回の実験では第 3 章で示した HC10 水によるバイオフィーム抑制効果は 3 日間の使用が良いと思われた。加えて創部の細菌数、創面積の収縮率、新生毛細血管の数で HC10 水洗浄および AgNPs/CNFS 複合体被覆群は他群と比較して有意に創傷治癒を促進していた。こうした点から判断すると HC10 水及び AgNPs/CNFS 複合体の使用を 3 日間に限局することにより、十分な静菌効果とともに細胞傷害性を軽減できるのではないかと考えられた。

一般臨床において難治性潰瘍の治療で Ag<sup>+</sup>が有効であることが知られており多数使用されている<sup>(28)</sup>。本章で使用している AgNPs/CNFS 複合体は理論上 4 μg/cm<sup>2</sup>の AgNPs が含有されており、臨床で使用している壊死組織の融解、殺微生物活性で使用している 1%銀スルファジアジン（ゲーベンクリーム<sup>®</sup>、田辺三菱製薬株式会社、大阪、日本）よりはるかに少ない Ag<sup>+</sup>を含有しているが、CNFS に効果的に吸着していることにより殺微生物活性を示しているものとする。その他の 3 群の多群検定で有意差は認めなかった。

#### 4.5 小 括

糖尿病マウスの創部緑膿菌感染モデルに対する HC10 水と AgNPs/CNFS 複合体の効果の検討では、HC10 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、HC10 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、HC10 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。

## 第5章 総括

創傷治癒は、サイトカイン及び成長因子などの体液性因子によって開始される一連の細胞プロセスの最終結果である<sup>(29)</sup>。これらの細胞プロセスは、サイトカイン及び成長因子の分解に寄与する組織細菌の微生物数すなわちバイオバーデンによって影響、阻害される<sup>(30) (31)</sup>。過去のさまざまな研究により組織の細菌バイオバーデンのレベルが組織 1g あたり  $1 \times 10^6$  CFU を超えると創部の感染が成立しているとされている<sup>(32)</sup>。このような高いレベルの組織細菌は、感染の臨床的徴候なしに存在することができ、創傷治癒に有害な影響を及ぼす可能性がある<sup>(33)</sup>。その中で緑膿菌は、創傷治癒障害を起こしうる院内微生物及び日和見病原体である<sup>(34)</sup>。また、臨床現場での緑膿菌感染症は重大な合併症である<sup>(35)</sup>。全身投与で使用する抗生剤は、創部の細菌レベルを効果的に低下させるとは必ずしも言えない<sup>(4)</sup>。また抗生剤入りの生理食塩水で感染創を洗浄することは、アレルギー発症の危険性や薬剤耐性菌の発生に寄与する可能性があるので推奨されていない<sup>(36)</sup>。ポビドンヨード、銀スルファジアジン、塩化ベンザルコニウム、クロルヘキシジン、オクテニジン二塩酸塩は pH の影響により創傷治癒において高い細胞傷害性があることが知られている<sup>(37)</sup>。更に静菌活性に必要とする濃度は非常に高濃度である<sup>(26, 38)</sup>。そのため、創傷治癒過程を阻害せずに細菌バイオバーデンを減少させることのできる局所使用可能な抗菌剤が治療上必要である<sup>(4)</sup>。

そこで我々は殺微生物活性が強く、細胞傷害性が弱い弱酸性次亜塩素酸 (HC10) 水に注目し、臨床的にも感染を減じるべき緑膿菌を用いて実験を行った。緑膿菌感染創に HC10 水を使用した場合の有効な濃度を検討したところ、*in vitro* のヒト線維芽細胞を用いた実験で 10%FBS を含む DMEM 培地中で細胞数が大幅に減少することなく、殺微生物活性を維持できる 200 ppm が *in vivo* で使用す

る至適濃度であると考えられた。第2章で緑膿菌感染した糖尿病モデルマウスで洗浄の実験を行ったが、閉鎖環境においては洗浄しても菌数はほぼ前日の値に戻るくらいまで上昇してしまうことが分かった。また蒸留水で洗浄する場合より細菌数は減少させるが、創傷治癒に悪影響を及ぼさないことが分かった。このことは臨床の現場において例えば腹腔内膿瘍のような開放創にすることが困難な場合に当てはまると考える。そういった状況においては、少しでも菌数を減少させることができ、細胞傷害性の少ないHC10水で洗浄すれば、より創傷治癒を促進することが可能ではないかと考えられた。

HC10水のみでは細菌数を減少したまま創部の維持ができなかったため、さらなる静菌活性の必要性を考え第4章ではAgNPs/CNFS複合体を併用して用いる実験を行った。AgNPs/CNFS複合体は有効な殺微生物活性をもつことが知られている<sup>(26)</sup>。しかしAgNPsは次第に有毒なイオン形態に溶解する。銀イオン溶解の過程は数か月以上かかる可能性があることが示唆されている<sup>(39)</sup>。木之田らの研究<sup>(26)</sup>により、3日以内のAgNPsの使用であれば銀イオン溶解による有意な影響はないことが示されている。また第3章では有意差はないが、ほんのわずかな創傷治癒の遅延があったため、細胞傷害性を考慮して洗浄、被覆を3日間に限定することによって創傷治癒抑制の防止を図った。3日間という期間はAgNPsの特性および第3章の創部の外観でバイオフィルムを抑えることのできる時期として設定した。事実、HC10水はバイオフィルムを抑えるということが知られている<sup>(40)</sup>。

第4章ではキチン創傷被覆保護材（ベスキチン<sup>®</sup>W）を被覆材に用いず、空気の透過性のよいエアウォール<sup>®</sup>のみを使用することで、開放創に近い環境で実験を行った。HC10水洗浄及びAgNPs/CNFS複合体被覆群は他の群と比較して明らかに細菌数の減少及び良好な創傷収縮を得た。このことは細菌感染創傷において、細胞傷



害性よりも殺微生物活性を重視した方が創傷治癒のためには良いということが示唆されたと考える。

これらの薬剤の臨床応用における課題としては、HClO 水及び AgNPs/CNFS 複合体の使用期間を綿密に調べる必要があると考える。ともに殺微生物活性、細胞傷害性という二面性をもつため、至適濃度、至適使用期間を検討できれば、安全に使用できる可能性があると考ええる。

## 第6章 結 論

HC10 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、さらなる検討を行えば臨床応用できる可能性が高い。

## 謝 辞

本研究にあたり、研究立案、実験方法、学会発表、論文執筆等、多くのご指導ご鞭撻を賜りました、防衛医学研究センター医療工学研究部門 石原雅之教授、防衛医科大学校形成外科 清澤智晴教授、ならびに防衛医科大学校歯科口腔外科 横江秀隆教授に心より深く感謝致します。

研究の各所においてご指導を賜りました異常環境衛生研究部門 藤田真敬教授、防衛医科大学校病院形成外科 東隆一准教授、青木伸峰講師、中村和人助教、久保諭助教、會沢哲士助教、防衛医学研究センター医療工学研究部門 中村伸吾講師、佐藤洋子助教、また動物の飼育、管理にあたりご指導いただきました福田孝一元准教授、実験手技にご協力頂きました長野寿人先生、高山智宏先生に厚く御礼申し上げます。

またあらゆる場面におきまして、日常的にご支援を下さいました防衛医科大学校病院形成外科ならびに防衛医学研究センター医療工学研究部門、異常環境衛生研究部門、動物実験施設、共同利用研究施設関係諸氏に御礼申し上げます。

最後に陰ながら支えてくれた、妻 栞原美香、長女 由愛、次女 乃愛に心より感謝致します。

## 付 記

本論文の一部は第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会（2017 年 10 月 19～20 日大阪）で発表した。

### 筆頭者論文

1. **Kuwabara M**, Ishihara M, Fukuda K, Nakamura S, Murakami K, Sato Y, Yokoe H, Kiyosawa T. Disinfection of *Pseudomonas aeruginosa*-Infected Wounds in Diabetic *db/db*Mice by Weakly Acidic Hypochlorous Acid. Wound Medicine (Accepted, preparing for publication)
2. **Kuwabara M**, Ishihara M, Fukuda K, Nakamura S, Murakami K, Sato Y, Yokoe H, Kiyosawa T. Disinfection and healing of *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds in diabetic *db/db* Mice by combining silver nanoparticles-containing chitin sheet and weakly Acidic Hypochlorous Acid. Journal of Biomedical Materials Research Part B (Submitted)

### 共著者論文

1. Sato Y, Ishihara M, Murakami K, Nakamura S, Fukuda K, **Kuwabara M**, Takayama T, Hiruma S, Murakami K, Fujita M, Yokoe H. Comparison of Various Disinfectants on Bactericidal Activity Biocontrol Sci, submitted.
2. Ishihara M, Murakami K, Fukuda K, Nakamura S, **Kuwabara M**, Hattori H, Fujita M, Kiyosawa T, Yokoe H. Stability of Weakly Acidic Hypochlorous Acid Solution with Microbicidal Activity. Biocontrol Sci. 2017;22(4):223-227. doi: 10.4265/bio.22.223.
3. Fukuda K, Ishihara M, Murakami K, Nakamura S, Sato Y, **Kuwabara M**, Fujita M, Kiyosawa T, Yokoe H. Cleansing technique using high-velocity steam-air micromist jet spray. J Med Eng Technol. 2017 Oct;41(7):522-528. doi:10.1080/03091902.2017.1364309.
4. Takabayashi Y, Ishihara M, **Kuwabara M**, Takikawa M, Nakamura S, Hattori H, Kiyosawa T. Improved Survival of Full-Thickness Skin Graft with Low-Molecular Weight Heparin-Protamine Micro/Nanoparticles Including Platelet-Rich Plasma. Ann Plast Surg. 2017 May;78(5):562-568. doi: 10.1097/SAP.0000000000001051.
5. Takabayashi Y, Nambu M, Ishihara M, **Kuwabara M**, Fukuda K, Nakamura S, Hattori H, Kiyosawa T. Enhanced effect of fibroblast growth factor-2-containing dalteparin/protamine nanoparticles on hair growth. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2016 May 17;9:127-34. doi: 10.2147/CCID.S108187.

略 語 一 覧

略語	外国語	日本語	備考
HClO	Hypochlorous Acid	弱酸性次亜塩素酸	化学式
AgNPs	Ag Nanoparticles	銀ナノ粒子	化学式を含む
AgNPs/CNFS	AgNPs/Chitin Nanofiber Sheet	銀ナノ粒子/キチンナノファイバーシート	
db/db マウス	C57BLKS/J lar <sup>+</sup> +Lepr db/+Lepr db mice	糖尿病マウス	
NaClO	Sodium Hypochlorite	次亜塩素酸ナトリウム	化学式
ClO <sup>-</sup>	Hypochlorite Ion	次亜塩素酸イオン	化学式
HCl	Hydrochloric Acid	塩酸	化学式
CFU	Colony Forming Unit	コロニー形成ユニット	
PBS	Phosphate Buffered Saline	リン酸緩衝生理食塩水	
PBS (+)	Phosphate Buffered Saline (+)	リン酸緩衝生理食塩水+	Ca <sup>2+</sup> 、Mg <sup>2+</sup> を含む
PBS (-)	Phosphate Buffered Saline (-)	リン酸緩衝生理食塩水-	Ca <sup>2+</sup> 、Mg <sup>2+</sup> を含まない
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	デルベッコイーグル培地	
FBS	Fetal Bovine Serum	ウシ胎児血清	
ppm	Parts Per Million	100 万分の 1	
OD	Optical Density	光学密度	
HE	Hematoxylin Eosin	ヘマトキシリンエオジン	

## 引用文献

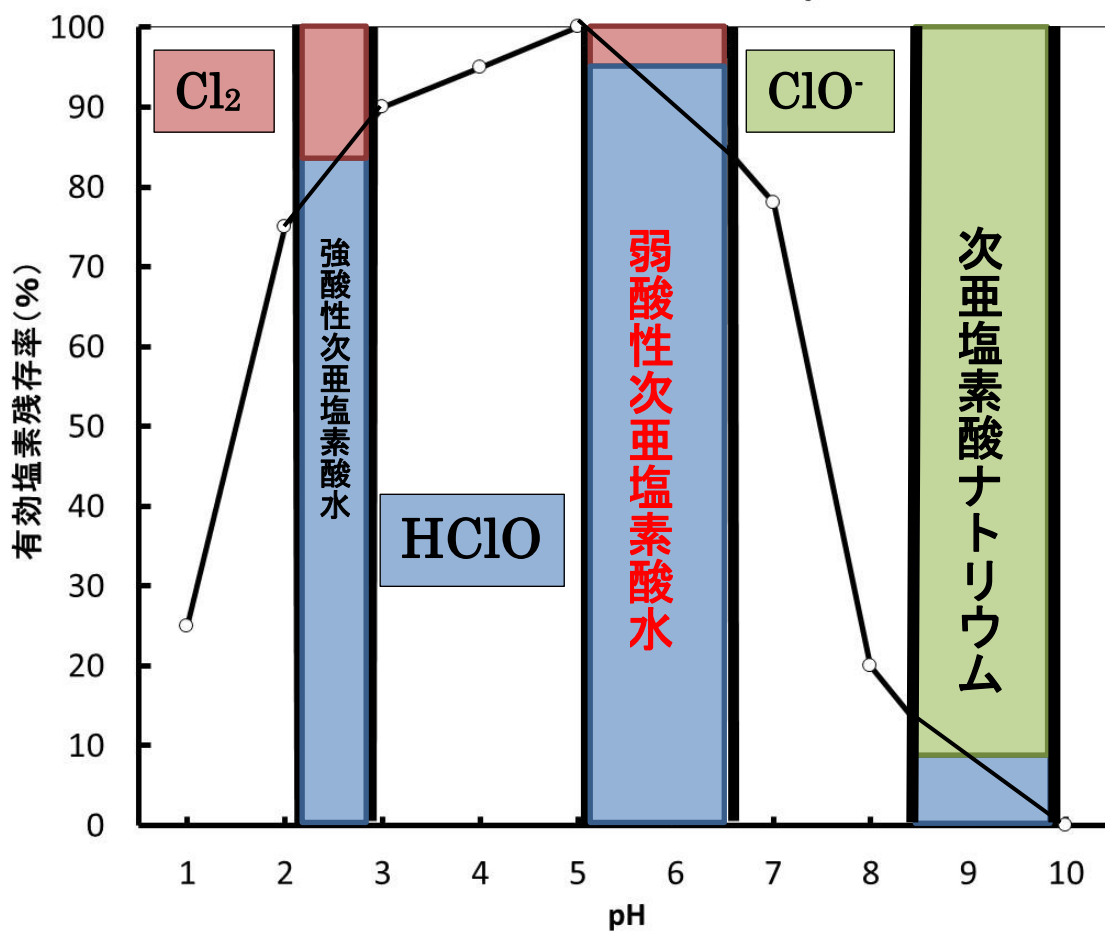
1. 岩元 俊, 善家 雄, 濱田 大, 栗之丸 直, 弓指 恵, 岡田 祥, et al. 四肢すべてに波及した重症軟部組織感染症の1例. 整形外科と災害外科. 2017;66(1):1-4.
2. McAlister CN, Marble AE, Murray TJ. The 1917 Halifax Explosion: the first coordinated local civilian medical response to disaster in Canada. Canadian journal of surgery Journal canadien de chirurgie. 2017;60(6):372-4.
3. 山元 健, 出口 善, 吉川 和, 榎本 真, 春田 浩, 安達 朋, et al. 壊死性筋膜炎に合併した多剤耐性アシネトバクター(Multiple Drug Resistant Acinetobacter:MDRA)感染が院内感染を起こしICU病棟閉鎖に至った1例. 日本救急医学会関東地方会雑誌. 2018;39(1):140.
4. Robson MC, Payne WG, Ko F, Mentis M, Donati G, Shafii SM, et al. Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part II. Stabilized hypochlorous acid: its role in decreasing tissue bacterial bioburden and overcoming the inhibition of infection on wound healing. Journal of burns and wounds. 2007;6.
5. 中島 啓, 吉村 知, 鈴木 宣, 川口 真, 後藤 恵, 岡本 佳, et al. 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(12):1559-62.
6. Ono T. Bactericidal Effects of Weak Acid Hypochlorous Solution against Various Spores and Application in Food Processing Plants. JOURNAL OF THE BREWING SOCIETY OF JAPAN. 2012;107(2):100-9.
7. 中山 智. 大量調理施設衛生管理マニュアルについて(1). 食品衛生研究. 1997;47(6):17-26.
8. 中山 智. 大量調理施設衛生管理マニュアルについて(2). 食品衛生研究. 1997;47(7):7-14.
9. Mi F-L, Tan Y-C, Liang H-F, Sung H-W. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. Biomaterials. 2002;23(1):181-91.
10. Dutta J, Tripathi S, Dutta P. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. Food Science and Technology International. 2012;18(1):3-34.
11. Hattori H, Amano Y, Nogami Y, Takase B, Ishihara M. Hemostasis for severe hemorrhage with photocrosslinkable chitosan hydrogel and calcium alginate. Annals of biomedical engineering. 2010;38(12):3724-32.
12. Horio T, Ishihara M, Fujita M, Kishimoto S, Kanatani Y, Ishizuka T, et al. Effect of photocrosslinkable chitosan hydrogel and its sponges to stop bleeding in a rat liver injury model. Artificial organs. 2010;34(4):342-7.
13. Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. Biomaterials. 1999;20(15):1407-14.
14. Kiyozumi T, Kanatani Y, Ishihara M, Saitoh D, Shimizu J, Yura H, et al. The effect of chitosan hydrogel containing DMEM/F12 medium on full-thickness skin defects after deep dermal burn. Burns. 2007;33(5):642-8.
15. Ishihara M, Hattori H, Nakamura S. A review on biomedical applications of chitosan-based biomaterials. Int J Pharm Biol Sci. 2015;6:162-78.

16. Nguyen VQ, Ishihara M, Kinoda J, Hattori H, Nakamura S, Ono T, et al. Development of antimicrobial biomaterials produced from chitin-nanofiber sheet/silver nanoparticle composites. *Journal of nanobiotechnology*. 2014;12(1):49.
17. Ishihara M, Nguyen VQ, Mori Y, Nakamura S, Hattori H. Adsorption of silver nanoparticles onto different surface structures of chitin/chitosan and correlations with antimicrobial activities. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(6):13973-88.
18. Miura N, Shinohara Y. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;390(3):733-7.
19. Fukuda K, Ishihara M, Murakami K, Nakamura S, Sato Y, Kuwabara M, et al. Cleansing technique using high-velocity steam-air micromist jet spray. *Journal of medical engineering & technology*. 2017;41(7):522-8.
20. Dissemond J. Chronic wounds and bacteria. Clinical relevance, detection and therapy. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2014;65(1):10-4.
21. Selim P, Bashford C, Grossman C. Evidence - based practice: tap water cleansing of leg ulcers in the community. *Journal of Clinical Nursing*. 2001;10(3):372-9.
22. Moore Z, Cowman S. A systematic review of wound cleansing for pressure ulcers. *Journal of clinical nursing*. 2008;17(15):1963-72.
23. Kim HJ, Lee JG, Kang JW, Cho HJ, Kim HS, Byeon HK, et al. Effects of a low concentration hypochlorous acid nasal irrigation solution on bacteria, fungi, and virus. *The Laryngoscope*. 2008;118(10):1862-7.
24. Ono T, Yamashita K, Murayama T, Sato T. Microbicidal effect of weak acid hypochlorous solution on various microorganisms. *Biocontrol science*. 2012;17(3):129-33.
25. ISHIHARA M, MURAKAMI K, FUKUDA K, NAKAMURA S, KUWABARA M, HATTORI H, et al. Stability of Weakly Acidic Hypochlorous Acid Solution with Microbicidal Activity. *Biocontrol science*. 2017;22(4):223-7.
26. Kinoda J, Ishihara M, Hattori H, Nakamura S, Fukuda K, Yokoe H. Cytotoxicity of silver nanoparticle and chitin-nanofiber sheet composites caused by oxidative stress. *Nanomaterials*. 2016;6(10):189.
27. 大上 英, 常田 孝, 豊田 誠. 術後創部感染および褥瘡に対する陰圧閉鎖療法の工夫. *通信医学*. 2017;69(4):209-12.
28. 大浦 紀. 【足・下腿難治性潰瘍】 創傷ケアの古典から最先端まで. *PEPARS*. 2009(26):25-34.
29. Clark RA. Biology of dermal wound repair. *Dermatologic clinics*. 1993;11(4):647-66.
30. Robson MC, Stenberg BD, Heggers JP. Wound healing alterations caused by infection. *Clinics in plastic surgery*. 1990;17(3):485-92.
31. Payne WG, Wright TE, Ko F, Wheeler C, Wang X, Wang MC. Bacterial Degradation of Growth Factors. *Journal of Applied Research*. 2003;3(1).

32. Group HGSC. Lack of reliability of clinical/visual assessment of chronic wound infection: the incidence of biopsy-proven infection in venous leg ulcers. *Wounds*. 2006;18:197-202.
33. Robson MC, Edstrom LE, Krizek TJ, Groskin MG. The efficacy of systemic antibiotics in the treatment of granulating wounds. *The Journal of surgical research*. 1974;16(4):299-306.
34. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases*. 1998;4(4):551-60.
35. Karna SR, D'Arpa P, Chen T, Qian L-W, Fourcaudot AB, Yamane K, et al. RNA-Seq Transcriptomic Responses of Full-Thickness Dermal Excision Wounds to *Pseudomonas aeruginosa* Acute and Biofilm Infection. *PloS one*. 2016;11(10):e0165312.
36. Wilson JR, Mills JG, Prather ID, Dimitrijevič SD. A toxicity index of skin and wound cleansers used on in vitro fibroblasts and keratinocytes. *Advances in skin & wound care*. 2005;18(7):373-8.
37. Wiegand C, Abel M, Ruth P, Elsner P, Hipler U-C. pH influence on antibacterial efficacy of common antiseptic substances. *Skin pharmacology and physiology*. 2015;28(3):147-58.
38. McCauley RL, Linares HA, Pelligrini V, Herndon DN, Robson MC, Heggers JP. In vitro toxicity of topical antimicrobial agents to human fibroblasts. *The Journal of surgical research*. 1989;46(3):267-74.
39. Watanabe S, Fujita M, Ishihara M, Tachibana S, Yamamoto Y, Kaji T, et al. Protective effect of inhalation of hydrogen gas on radiation-induced dermatitis and skin injury in rats. *Journal of radiation research*. 2014;55(6):1107-13.
40. Komachiya M, Yamaguchi A, Hirai K, Kikuchi Y, Mizoue S, Takeda N, et al. Antiseptic Effect of Slightly Acidic Electrolyzed Water on Dental Unit Water Systems. *The Bulletin of Tokyo Dental College*. 2014;55(2):77-86.



## 次亜塩素酸(HClO)の存在比率のpH依存性



酸性で高く、アルカリ性で低い (ClO<sup>-</sup>に変換される)

図1 強酸性次亜塩素酸水、弱酸性次亜塩素酸水、次亜塩素酸ナトリウムの違い  
 pH 5.0 ~ 6.5 が弱酸性次亜塩素酸水であり、強酸性次亜塩素酸水と比較してHClO含有割合が多い。pH 8.5 ~ 10 が次亜塩素酸ナトリウムであり殺微生物活性をより強力に有するHClOの割合が少なく、ClO<sup>-</sup>の割合が多い。

(参考文献: shoushuuzai.com > 臭い関連のニュースより抜粋、一部改変)

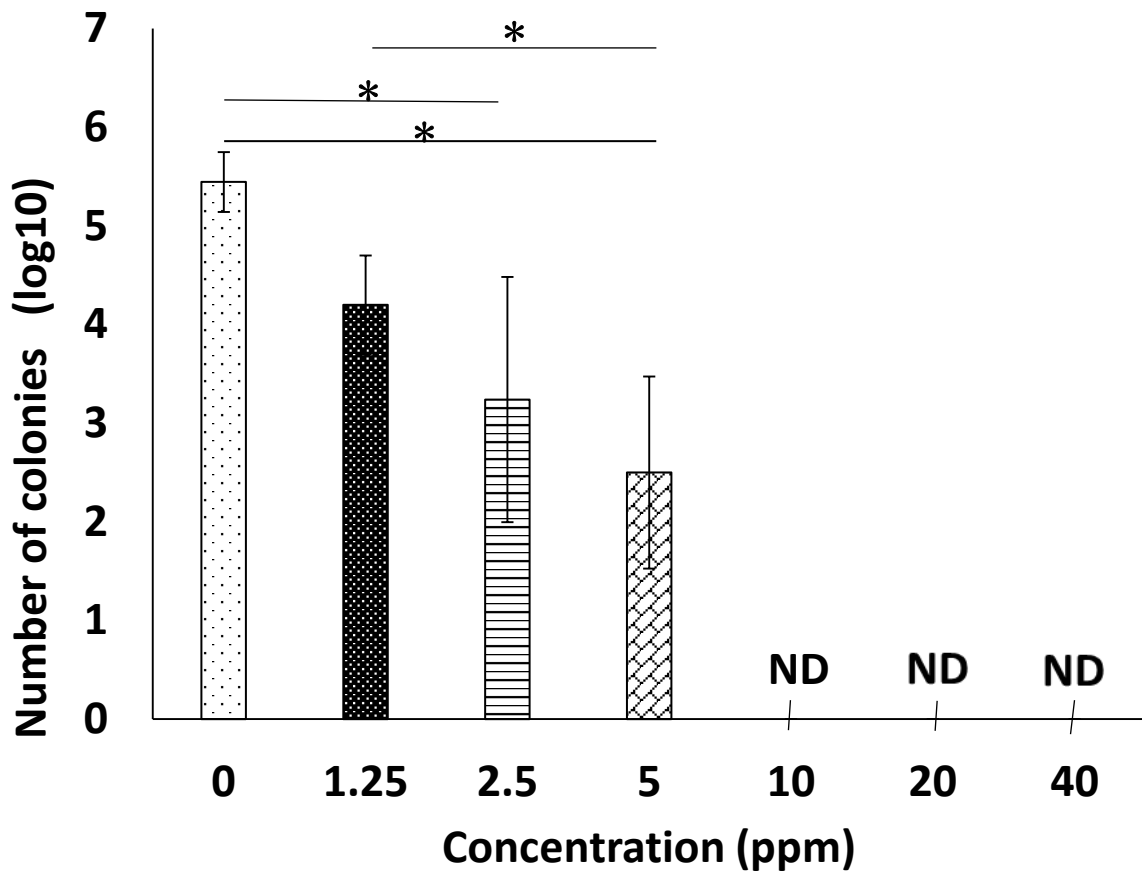


図2 HClO水の緑膿菌に対する殺微生物活性の検討

それぞれの濃度のHClO水と培地のタンパク質を除去したATCC 27853株の緑膿菌を15分間反応させ、緑膿菌懸濁液のコロニー数を計測した。縦軸は対数表記とした。コントロール群（純水）と比較し2.5 ppm、5 ppmで有意差を認めた。また1.25 ppmと5 ppmでも有意差を認めた。統計学的分析はTukey-Kramer検定を使用した。

(\*:P < 0.05)

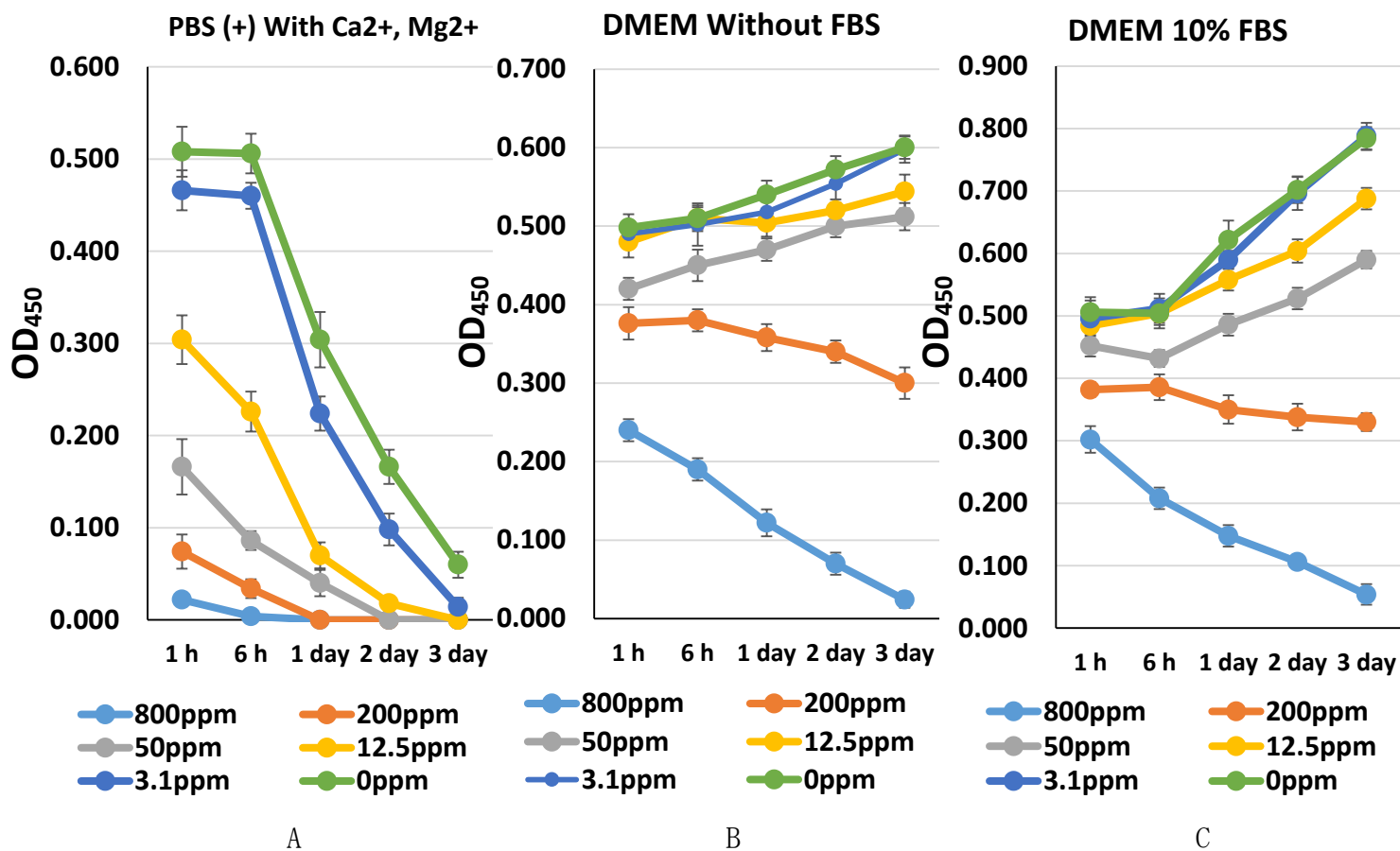


図3 HClO のヒト線維芽細胞に対する細胞傷害性の検討

15 分間 HClO とヒト線維芽細胞を反応させ、

A PBS (+) (Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>を含む) 中で培養

B DMEM 中で培養

C 10%FBS を添加した DMEM 中で培養

し、培養細胞の量を Immuno Mini プレートリーダー (Nunc, InterMed Japan、東京、日本) で 450 nm の Optical Density (OD<sub>450</sub>) 値より測定した。10%FBS を添加した DMEM 中で培養した場合、200 ppm 下では 3 日間で細胞数はほぼ変わらなかった。

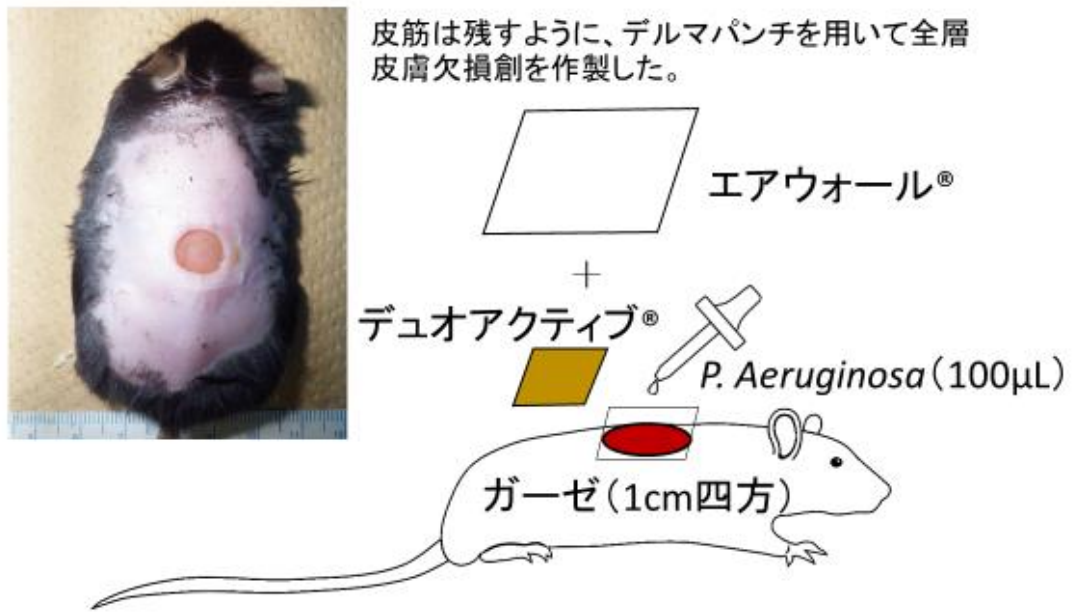


図4 糖尿病マウスの緑膿菌感染モデル

背部に脱毛した後に、8 mm デルマパンチで全層皮膚欠損創を作製した。その後ガーゼ上に緑膿菌を塗布し、上記被覆材で覆い、24 時間経過した時点でモデルの完成とした。

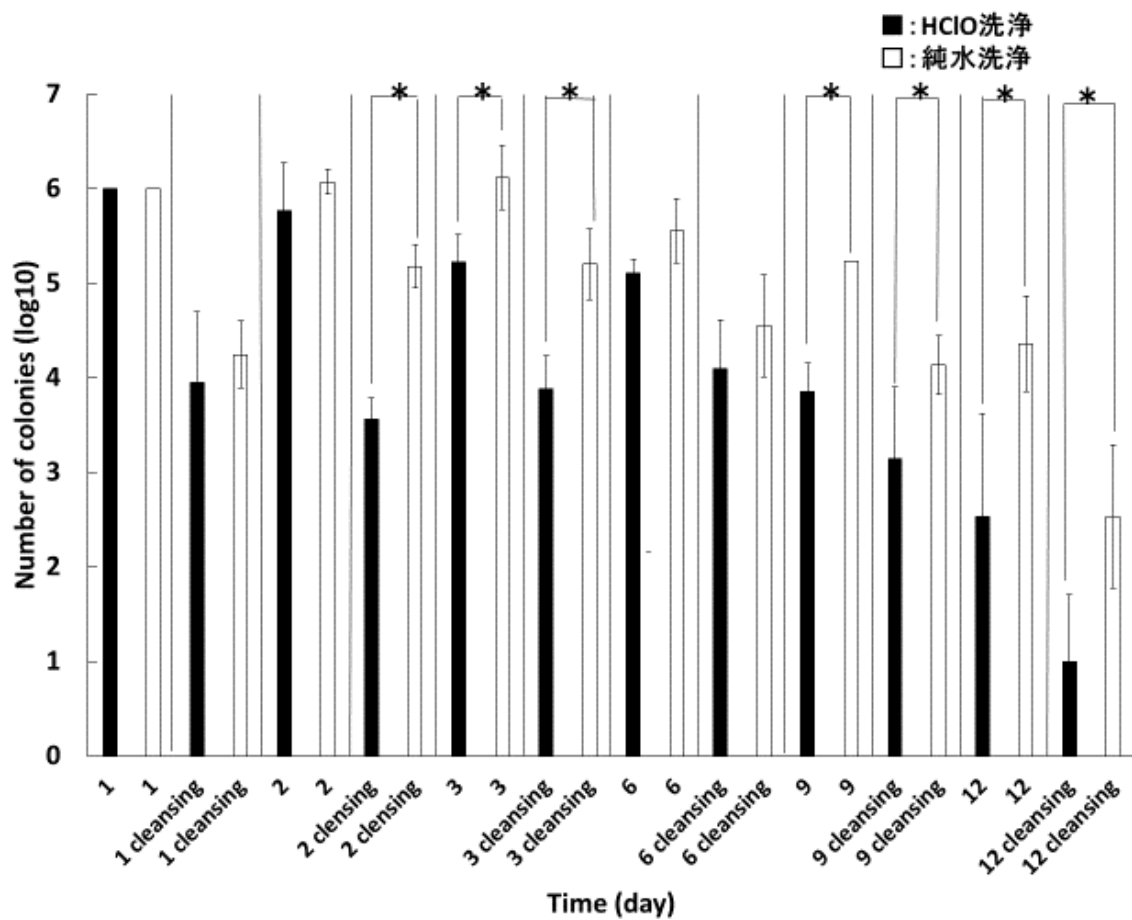


図5 創部の緑膿菌コロニー数の評価

実験群 (HClO 水) ■、及びコントロール群 (純水) □の洗浄前後の創部の緑膿菌コロニー数を計測した。縦軸は対数表記とした。統計学的分析は Mann-Whitney' s U 検定検定を用いた。 (\*:P < 0.05 )

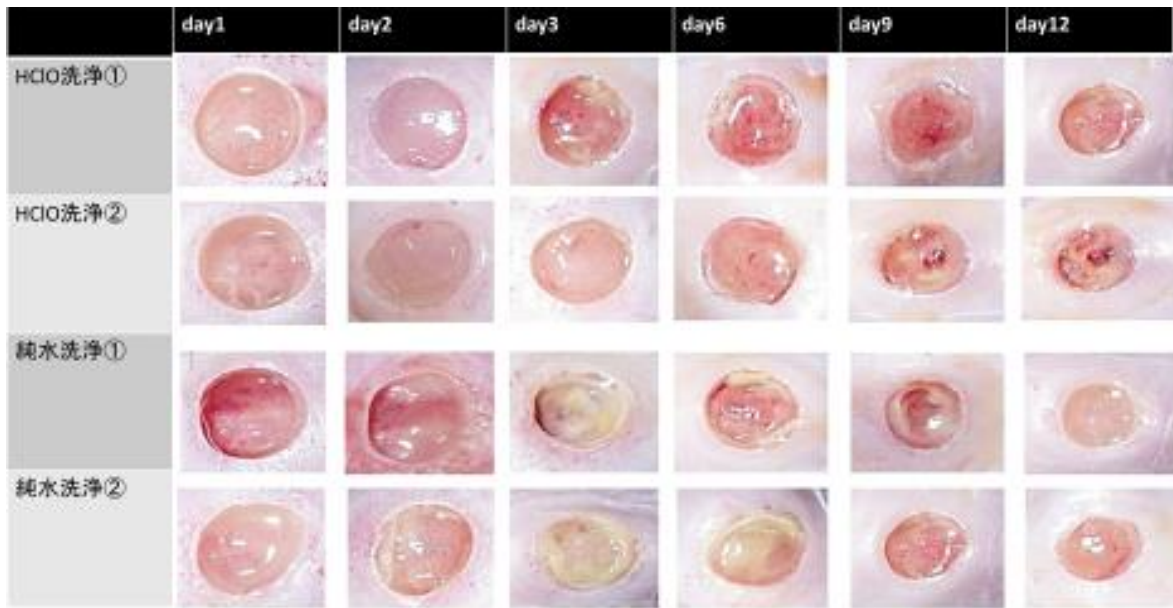


図6 創部の外観の評価

上段2列が実験群（HClO 水洗浄群）、下段2列がコントロール群（純水洗浄群）を表している。純水洗浄群では第2、3、6日においてバイオフィルム形成があるが、HClO 水洗浄群ではバイオフィルム形成がなかった。

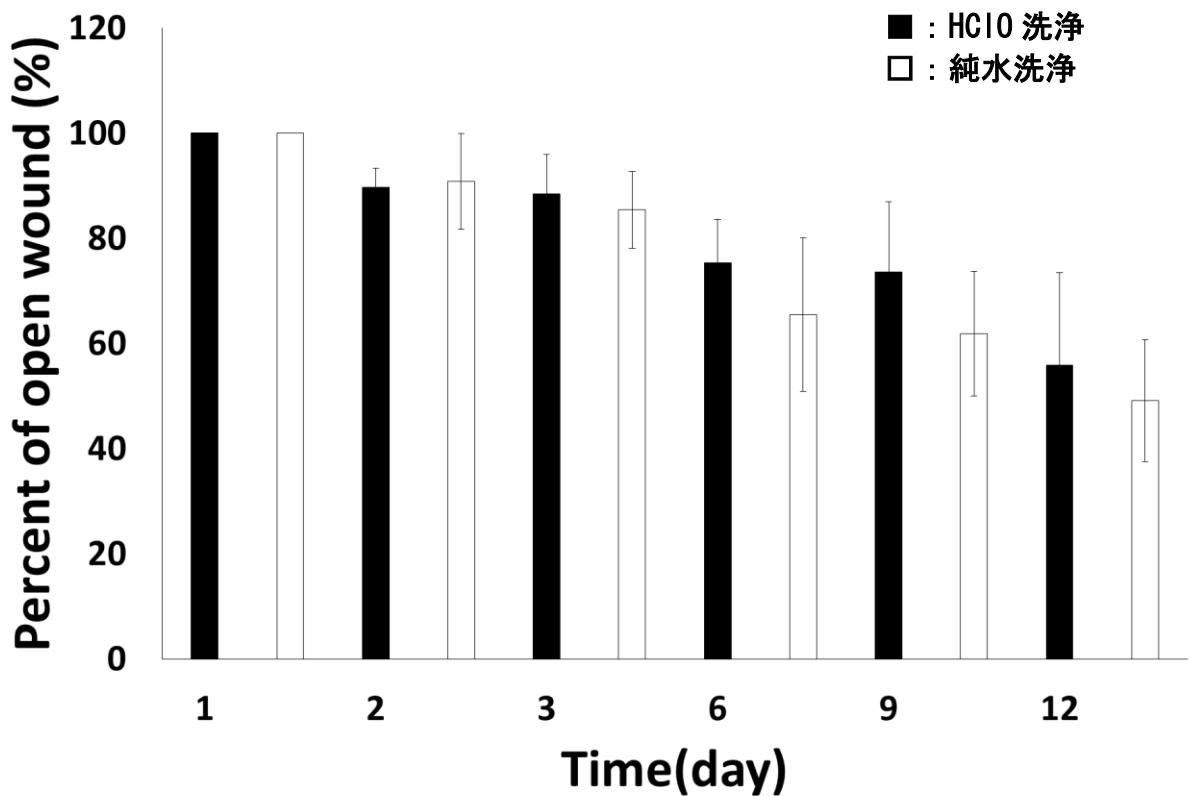
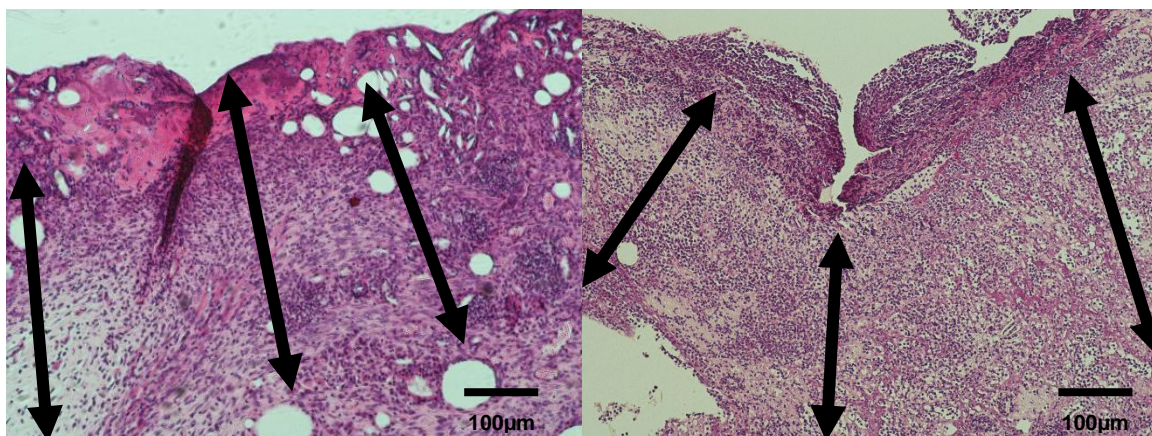


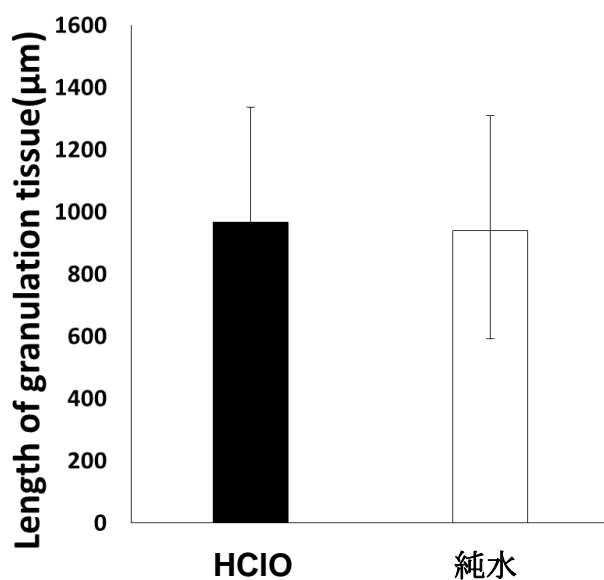
図7 創部の面積の評価

実験群（HClO 水）■、及びコントロール群（純水）□の創部面積を評価した。第1日の面積を1とし創部面積を割合表記した。統計学的分析はMann-Whitney's U 検定検定を用いた。2群間に明らかな有意差はなかったが、純水洗浄群の方がやや創収縮割合が良好であった。



A

B



### cleansing materials

C

図8 創部の組織学的評価

A 実験群 (HC10 水)、HE 染色 100 倍

B 及びコントロール群 (純水)、HE 染色 100 倍

C 実験群 (HC10 水) ■、及びコントロール群 (純水) □の創部肉芽の厚さを評価した。統計学的分析は Mann-Whitney' s U 検定検定を用いた。2 群間に有意差は認められなかった。

を評価した。統計学的分析は Mann-Whitney' s U 検定検定を用いた。2 群間に有意差は認められなかった。



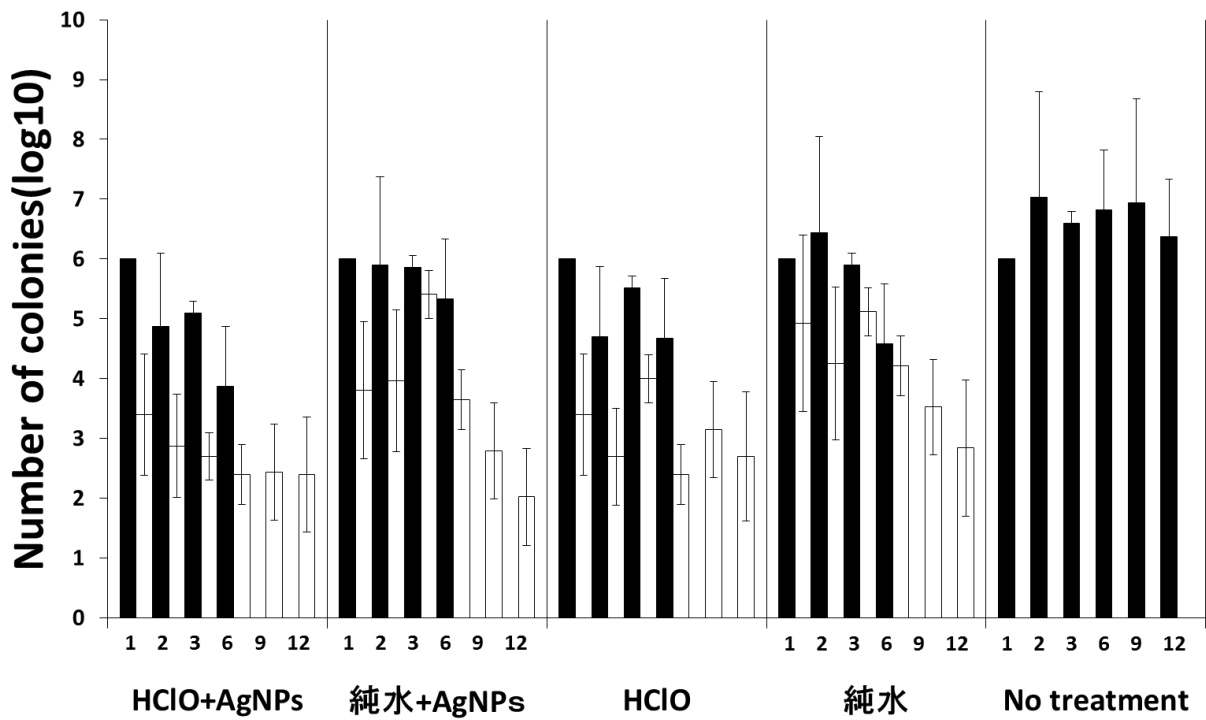


図9 創部の緑膿菌コロニー数の評価

■は洗浄前、□は洗浄後のコロニー数を表している。3日間は各洗浄薬及び被覆材で、3日以降は毎日純水洗浄及びCNFSで被覆した。HClO水洗浄及びAgNPs/CNFS複合体被覆群は菌数が急速に減少した。無処置群の菌数は増加していた。

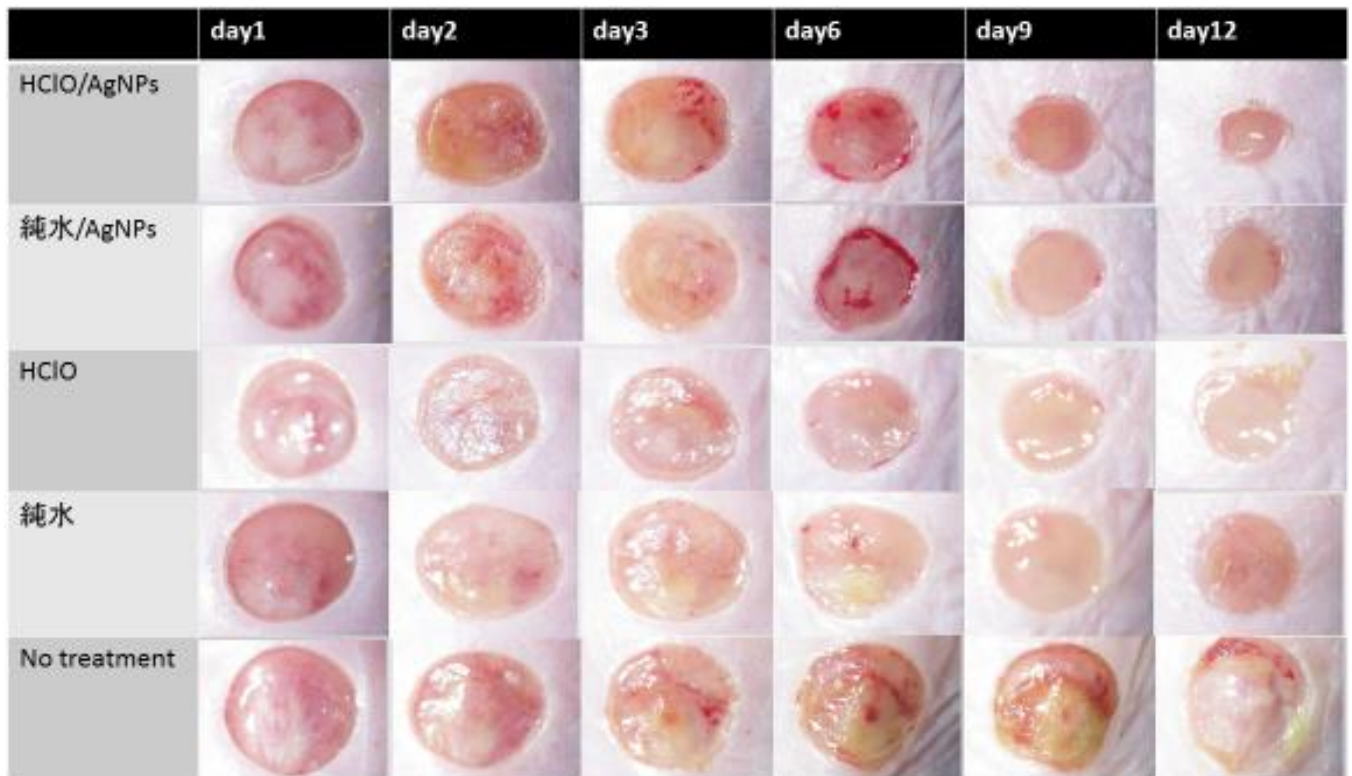


図 10 創部の外観の評価

縦軸が実験群、横軸が観察日を表している。

3 日間は各洗浄薬及び被覆材で、3 日以降は毎日純水洗浄及び CNFS で被覆した。HClO 水洗浄、AgNPs/CNFS 複合体被覆群は肉眼的に明らかに創収縮が良好であった。バイオフィルム形成は、純水洗浄群 CNFS 被覆群、無処置群で認められ、無処置群の方がバイオフィルムの面積は明らかに大きかった。

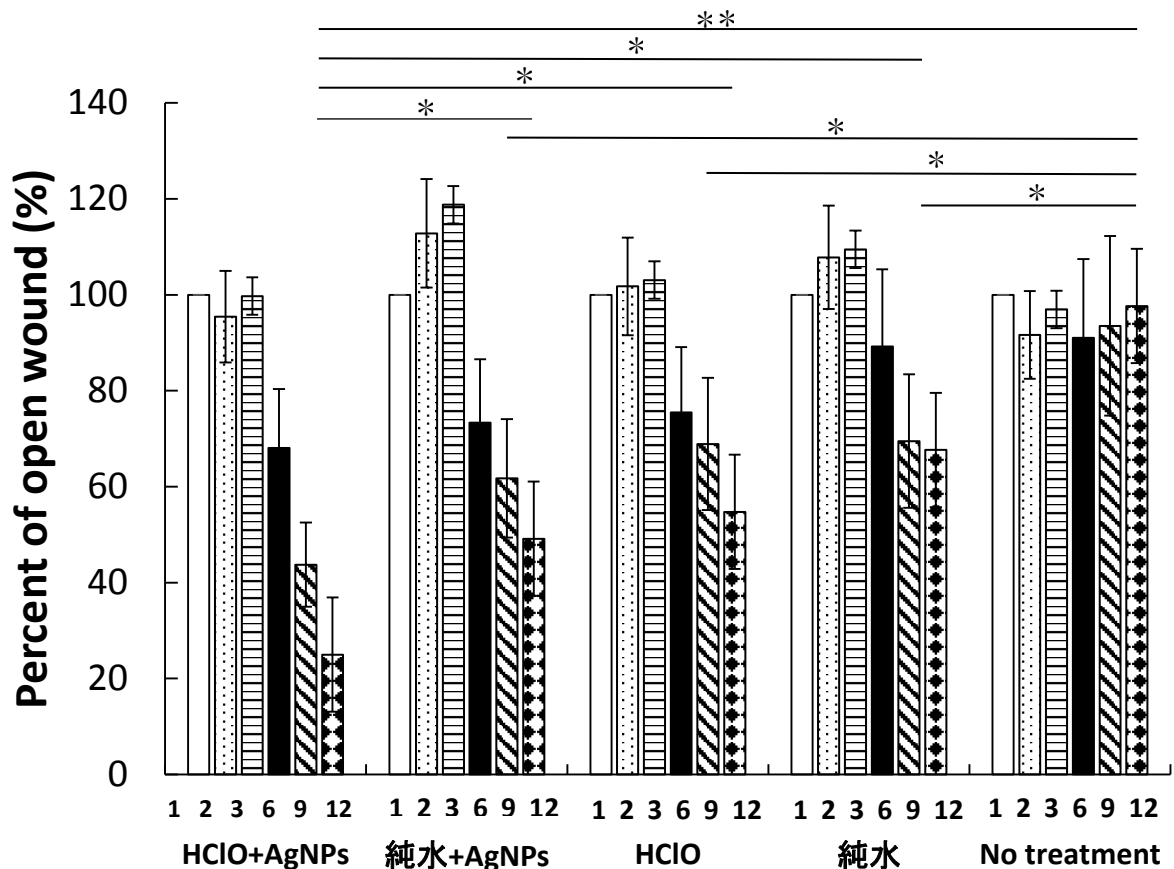


図 11 創部の面積の評価

同じ幾何学的模様のコラムは上記左の HClO+AgNPs 群の日数（1, 2, 3, 6, 9, 12 日目）に示すものと同日を表している。3 日間は各洗浄薬及び被覆材で、3 日以降は毎日純水洗浄及び CNFS で被覆した。統計学的分析は Tukey-Kramer 検定を用いた。第 1 日の面積を 1 とし創部面積を割合表記した。第 12 日において HClO 水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群とその他、無処置群とその他において有意差が認められた。

(\*:P < 0.05、\*\* :P < 0.01 )

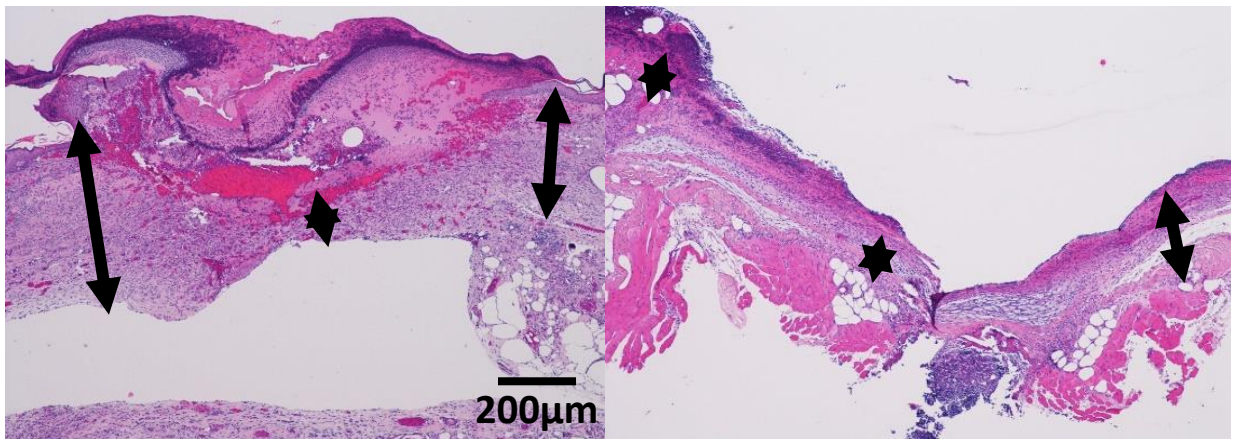
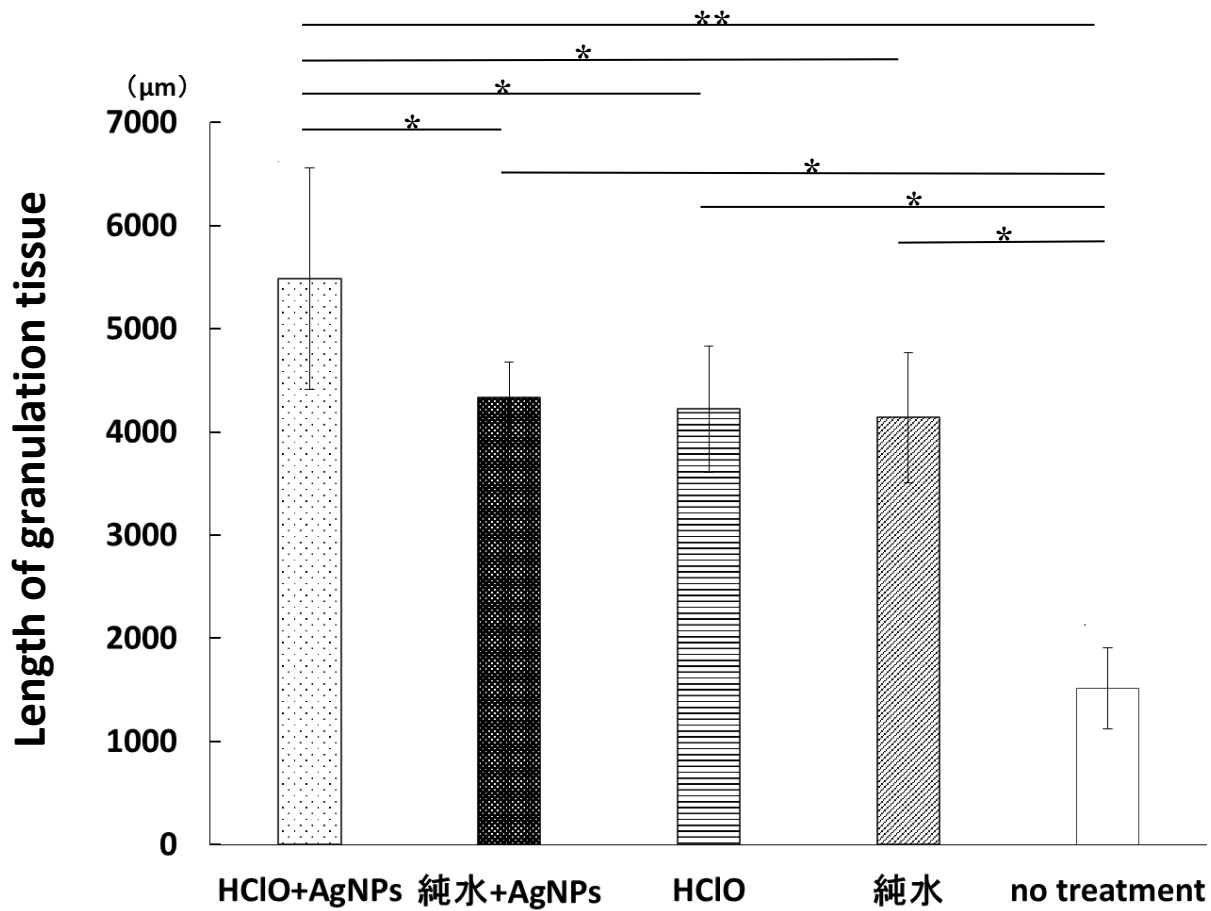


図 12 創部の組織学的評価

HE 染色した標本（40 倍）で肉芽の厚さを測定した。3 日間は各洗浄薬及び被覆材で、3 日以降は毎日純水洗浄及び CNFS で被覆した。統計学的分析は Tukey-Kramer 検定を用いた。HClO 水洗浄及び AgNPs/CNFS 複合体被覆群とその他、無処置群とその他において有意差が認められた。（\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ ）

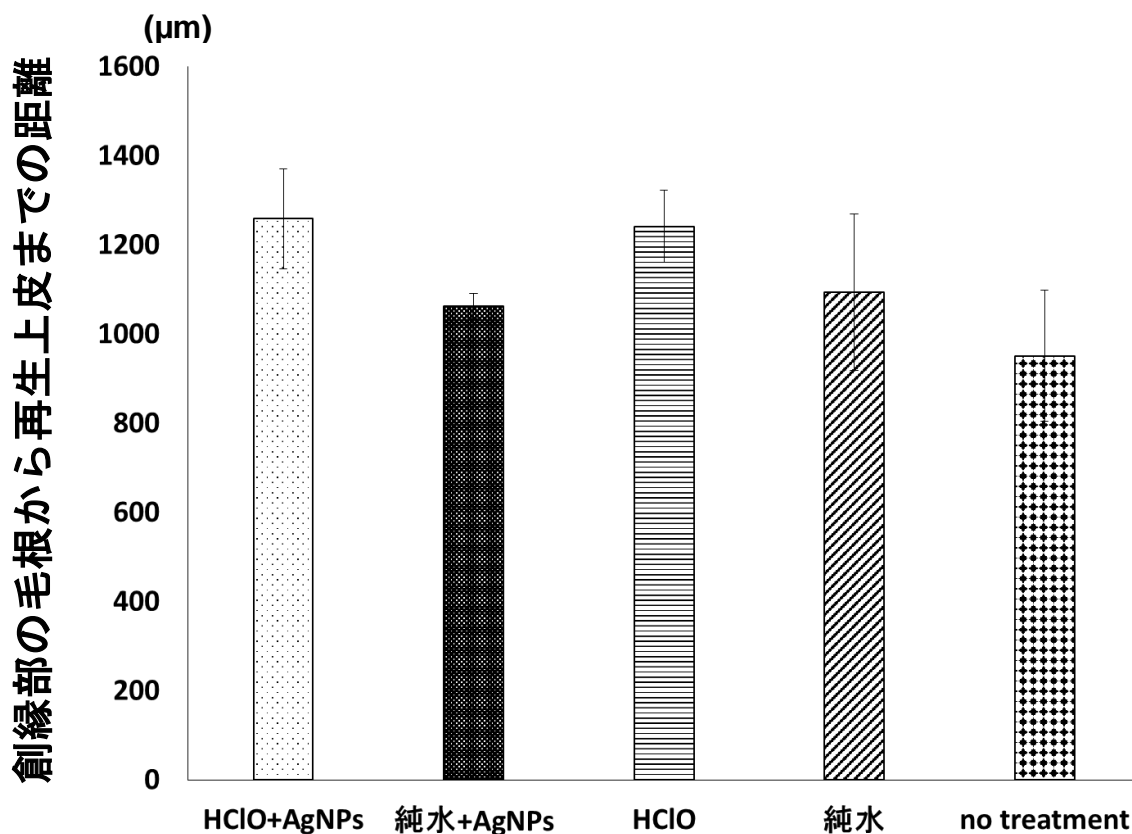


図 13 創縁部の毛根から再生上皮までの距離

第 12 日における、健全な毛根から再生上皮の断端までの距離を測定した。3 日間は各洗淨薬及び被覆材で、3 日以降は毎日純水洗淨及び CNFS で被覆した。統計学的分析は Tukey-Kramer 検定を用いた。いかなる 2 群間も有意差を認めなかった。



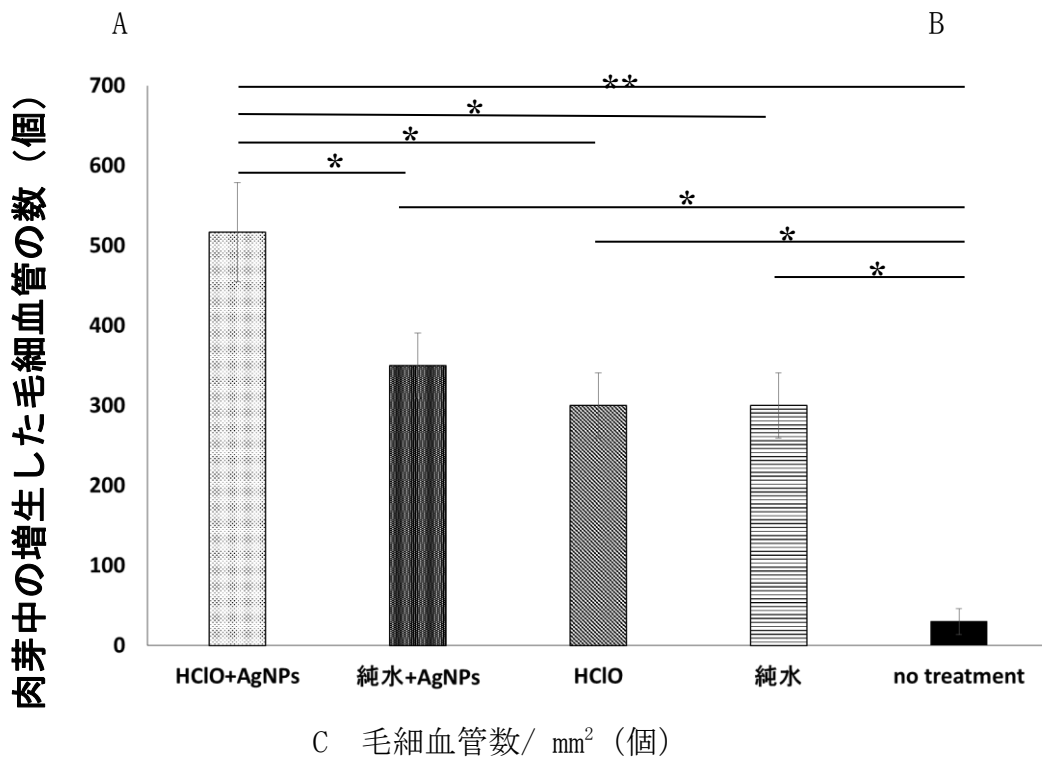
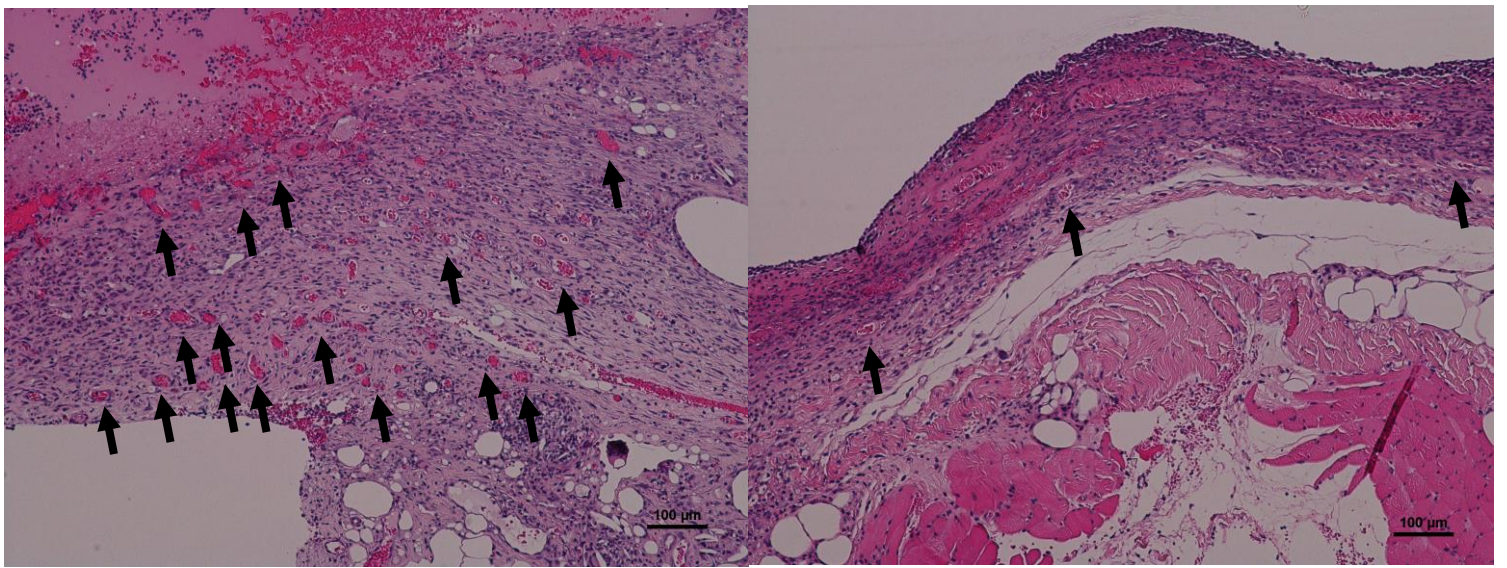


図 14 肉芽中の増生した毛細血管の数

3 日間は各洗浄薬及び被覆材で、3 日以降は毎日純水洗浄及び CNFS で被覆した。

A : HClO 水洗浄および AgNPs/CNFS 複合体被覆群 (HE 染色、100 倍) B : 無処置群 (HE 染色、100 倍) 。 ➡ が新生毛細血管を表している。

C : 1 mm<sup>2</sup> あたりの毛細血管の数。統計学的分析は Tukey-Kramer 検定を用いた。HClO 水洗浄群および AgNPs/CNFS 複合体被覆群とその他の群、無処置群とその他の群において有意差を認めた。 (\*:P < 0.05、 \*\*:P < 0.01 )