

感染性創傷に対する
ホタテ貝殻焼成酸化カルシウムの効果
に関する研究

たか やま とも ひろ
高 山 智 宏

(口腔外科学専攻)

防衛医科大学校

令和3年度

目 次

第 1 章 緒言	
(1) はじめに	1 頁
(2) 本研究の意義と目的	3 頁
第 2 章 BiSCaO 懸濁液の殺菌活性とヘアレスラット緑膿菌感染創モデルに対する効果の検討	
第 1 節 背景及び目的	5 頁
第 2 節 対象と方法	5 頁
(1) BiSCaO 懸濁液と HClO 水の作製	5 頁
(2) <i>In vitro</i> での BiSCaO 懸濁液の殺菌活性の検討	6 頁
(3) 緑膿菌感染創モデルの作製	7 頁
(4) <i>In vivo</i> での BiSCaO 懸濁液の効果の検討	7 頁
(5) 組織学的評価	9 頁
(6) 統計解析	9 頁
第 3 節 結果	9 頁
(1) <i>In vitro</i> での殺菌活性	9 頁
(2) ラット背部感染創部の緑膿菌数の評価	9 頁
(3) 感染創部の外観と面積の評価	10 頁
(4) 感染創部の組織学的評価	10 頁

第4節 考察	11 頁
第5節 小括	12 頁
第3章 BiSCaO 軟膏の殺菌活性とヘアレスラット緑膿菌感染創モデルに対する効果検討	
第1節 背景及び目的	14 頁
第2節 対象と方法	14 頁
(1) BiSCaO 軟膏の作製	14 頁
(2) <i>In vitro</i> での BiSCaO 軟膏の殺菌活性の検討	15 頁
(3) <i>In vivo</i> での BiSCaO 軟膏の効果の検討	15 頁
(4) 組織学的評価	16 頁
(5) 統計解析	16 頁
第3節 結果	17 頁
(1) <i>In vitro</i> での BiSCaO 軟膏の殺菌活性の検討	17 頁
(2) ラット背部感染創部の緑膿菌数の評価	17 頁
(3) 感染創部の外観と面積の評価	18 頁
(4) 感染創部の組織学的評価	18 頁
第4節 考察	18 頁
第5節 小括	19 頁

第4章 総括	21 頁
第5章 結論	25 頁
謝辞	26 頁
付記	27 頁
略語一覧	30 頁
引用文献	31 頁
図表	39 頁

第1章 緒言

(1) はじめに

我が国では、ホタテ貝を加工した後に大量に廃棄される貝殻の廃棄処理が大きな問題となっている。ホタテ貝の水揚げ量は農林水産省の統計によると令和元年度で約48万トンであり、その35%程度を占める貝殻は産業廃棄物として扱われ、ホタテ収穫地周辺の海岸に積まれて悪臭や土壌汚染などの深刻な環境問題を引き起こしている。それゆえ、廃棄されたホタテ貝殻を資源として有効利用することが強く求められている。これまでに、ホタテ貝殻は、主成分である炭酸カルシウム (CaCO_3) の原料として、農業用土壌改良剤や家畜用飼料、漁場造成資材、建築資材、金属精錬材料、環境保全剤に利用されてきた。しかしながら、その市場はごく限られており、ホタテ貝殻の有効利用はごく一部にとどまっている。したがって、ホタテ貝殻の新たな利用法を開拓し、バイオマス資源としてのさらなる価値を見出すことが望まれている [1-3]。

ホタテ貝殻は 700°C 以上で焼成することによって、貝殻中の CaCO_3 が水酸化カルシウム ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) や酸化カルシウム (CaO) に変化する。それらの高いアルカリ性に主に起因して、焼成したホタテ貝殻は高い殺菌活性を発現することが知られている [4]。ホタテ貝殻焼成品はいくつかが市販されているが、中でも 1000°C 以上の高温焼成後に微粉碎することで調製される heated bio-shell calcium oxide (BiSCaO) は、CaO 純度が 99.6% と極めて高い。興味深いことに、この BiSCaO は他のホタテ貝殻焼成品よりも高い殺菌活性を示すことが報告されている。BiSCaO をはじめとするホタテ貝殻焼成品の殺菌活性はスペクトル

が広く、細菌、孢子、真菌といった様々な病原性微生物に加えて、ウイルスも不活化できることが明らかにされてきた [5-9]。さらに、これらは食品添加物としても使用されており、生体安全性にも優れることから [4, 9]、BiSCaO は生体の創傷治癒に対して利用できる創傷用消毒剤としての可能性が期待されている。

創傷治癒は、サイトカインおよび増殖因子によって開始される一連の関連した細胞プロセスの結果である [10]。この細胞プロセスは細菌負荷によって阻害されることが知られており、これは主にサイトカインおよび増殖因子の分解に起因する [11, 12]。この創部の細菌負荷は微生物学的環境として汚染 (contamination)、定着 (colonization)、感染 (infection) というように連続的に捉え、細菌負荷と宿主免疫応答のバランスが崩れることにより感染が生じると考えられている [13, 14]。汚染または定着の状態では創は治癒傾向を示すが、宿主の免疫力よりも細菌負荷が勝った場合、創感染へと至り、創傷治癒が遅延する [15]。その場合、創部の浸出液などに検体 1 g あたり $1 \times 10^{5-6}$ CFU (colony forming unit) 以上の細菌数がみられることが報告されている [16]。定着と感染の間に位置する、感染へと移行しかけた状態は、臨界的定着点 (critical colonization) と呼ばれる。この臨界的定着点の状態では、創面を消毒して細菌数を低減することによって、治癒促進が可能であると考えられている [17-19]。しかしながら、通常の感染創で見られるような発赤、腫脹といった感染兆候が臨界的定着点では乏しいこともあり、治療が遅れてしばしば感染の拡大に至ってしまう [20]。

創傷感染における重要な起因菌の 1 つとして緑膿菌が挙げられる [21]。多くの抗菌薬に自然耐性を示すうえに薬剤耐性の獲得能力も高いことから、緑膿菌

に感染した創傷は治療に難渋することが多い [22]。感染を伴った難治性創傷に対して、抗菌薬の全身もしくは局所投与を行うことは、効果が期待できないばかりか多剤耐性菌の出現やアレルギーのリスクがある [23]。既存の各種消毒薬を用いることもあるが、細胞障害性があることや、接触皮膚炎発症の可能性も否定できない [24-27]。したがって、創傷治癒プロセスを障害することなく、感染性創傷における細菌負荷を減少させることができる消毒薬が、治療上必要とされている [22]。感染性創傷の治癒に関するこれまでの研究において、既存の消毒薬であるポビドンヨードや弱酸性次亜塩素酸 (HClO) 水の創傷に対する効果を検討した報告はある [25-27]。しかしながら、それら既存の消毒薬は、生体に対する毒性作用を示し、高濃度の使用は創傷治癒を遅延させることから、高い殺菌活性を示しつつも創傷治癒に悪影響を及ぼさない消毒薬の開発が依然として求められている。

(2) 本研究の意義と目的

これまでにホタテ貝殻焼成酸化カルシウムである BiSCaO は、環境衛生の確保のための除染や消毒などを中心として研究が行われてきた経緯がある。本研究は BiSCaO の人への臨床応用を見据えて、医学分野へ適用できるかどうかを検討した新規研究である。具体的には、BiSCaO の懸濁液や独自開発した BiSCaO の軟膏を調製し、緑膿菌に対する殺菌活性を既存消毒薬等と *in vitro* で比較検討した。さらに、ヘアレスラットを用いて緑膿菌の感染創を作製し、*in vivo* での殺菌活性および創傷治癒効果を評価した。本研究の意義は、生体安全性に優れる創傷用消毒剤としての BiSCaO の有用性を見出すことにあり、将来

的な臨床現場での応用に加えて海洋バイオマス資源の有効利用に資する基礎研究である (図 1)。

なお本研究における動物実験は全て、防衛医科大学校動物実験倫理委員会 (承認番号 17084)の承認を受けた後に関連規則や関係法令に慎重且つ適切に対応しながら実施した。

第2章 BiSCaO 懸濁液の殺菌活性とヘアレスラット緑膿菌感染創モデルに対する効果の検討

第1節 背景及び目的

国内外には CaCO_3 の原料となる石灰石が大量に存在し、石灰石を焼成して得られる焼成カルシウムとして生石灰 (CaO) やその水和物である消石灰 (Ca(OH)_2) も生産されている [28-30]。しかし石灰石は、重金属等有害な不純物が含まれており、水に溶かした際に高温の水和熱が発生する [28, 31]。一方で、ホタテ貝殻は、ほとんどが CaCO_3 と少量のタンパク質・糖質等有機物質から構成されており、有害不純物の含有量は少ない [2, 3, 6]。さらにホタテ貝殻由来の CaO は、生石灰と比較して水和速度が遅いため、水に溶かした際に、危険な水和熱を発生することなく、水 (H_2O) と反応して水酸化カルシウム (Ca(OH)_2) が生成されて強アルカリとなる。0.1 wt% の濃度の BiSCaO 懸濁液では pH は 11.5 を超え、これが殺菌活性を示す主な要因と考えられている [32, 33]。

本章では BiSCaO 懸濁液の感染創に対する創傷用消毒剤としての有用性を明らかにすることを目的とした。まず、*in vitro* での BiSCaO 懸濁液の緑膿菌に対する殺菌活性を HClO 水やポビドンヨードと比較検討した。さらに、ヘアレスラット緑膿菌感染創モデルを用い、感染創における BiSCaO 懸濁液の殺菌活性および創傷治癒効果を評価した。

第2節 対象と方法

(1) BiSCaO 懸濁液と HClO 水の作製

BiSCaO はプラスラボ株式会社（神奈川県、日本）から購入した。BiSCaO の作製は、洗浄済みのホタテ貝殻粉末を 1450°C で 4 時間加熱した後、ナノジェットマイザー（NJ-300-D、アイシンナノテクノロジーズ株式会社、埼玉、日本）で粉砕したもので、その平均直径は 6 μm である。プラスラボによると、X 線回折装置 Phillips X'Pert-PRO（フィリップス・ジャパン株式会社、東京、日本）を用いて測定した BiSCaO 中の CaO 及び Ca(OH)₂ の含有量は、それぞれ 99.6 および 0.2% であった。BiSCaO 1 g を蒸留水 1 L に添加し、遠心分離して 1000 ppm (0.1 wt%) の BiSCaO 懸濁液 (pH 12.2) を調製し、調製後 1 時間以内に使用した。

HClO 水は、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 HCl を添加することで pH 6.5 に調整した。HClO 濃度は残留塩化物濃度を測定できるパックテスト試験紙（共立理化学研究所、東京、日本）を使用して決定した。

(2) *In vitro* での BiSCaO 懸濁液の殺菌活性の検討

ATCC 27853 株（ATCC 社、米国）の超低温冷凍保存された緑膿菌 (1×10^5 CFU/100 μL) を解凍、遠心分離後に Phosphate Buffered Saline (PBS) で洗浄し、培養培地の余分なタンパク質を除去した。BiSCaO 懸濁液、HClO 水、およびポビドンヨード（イソジン®、ムンディファーマ、東京）を蒸留水で希釈して、濃度を 16、32、63、125、250、500 および 1000 ppm に調整した。それぞれの濃度の試験薬 100 μL に上記の緑膿菌を 100 μL 添加し、15 分間インキュベートし、緑膿菌分離寒天培地（ポアメディア®、栄研化学、栃木、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（試料数 $N=6$ ）。

(3) 緑膿菌感染創モデルの作製

ヘアレスラット（5～10 週齢雄、体重 300～350 g、HWY/S1c 系）（日本エスエルシー、静岡、日本）を使用した。塩酸メデトミジン 0.375 mg/kg（ドミトール[®]、1 mg/mL、日本全薬、福島、日本）、ミダゾラム 2 mg/kg（ドルミカム[®]、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 2.5 mg/kg（ベトルファール[®]、5 mg/mL、Meiji Seika ファルマ、東京、日本）の 3 種混合腹腔内麻酔下において、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）を用いて作製した。ATCC 27853 株の超低温冷凍保存された緑膿菌（ 1×10^5 CFU/100 μ 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 μ L 滴下した。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、さらに表層を 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。その後、塩酸アチパメゾール 0.75 mg/kg（アンチセダン[®]、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。24 時間経過後のヘアレスラットを緑膿菌感染創モデルとして利用した。

(4) *In vivo* での BiSCaO 懸濁液の効果の検討

ヘアレスラットの緑膿菌感染創部を洗浄する試験薬として、BiSCaO 懸濁液（1000ppm）、HClO 水（500ppm）、ポビドンヨード（1000ppm）、生理食塩水

を用いた。なお、HClO 水は 500ppm を超える濃度では、細胞毒性が強く、創部に対して創傷治癒遅延を引き起こすことが報告されていることから[34]、HClO 水の濃度は 500ppm に設定した。実験群は (1) 無処置群、(2) 生理食塩水洗浄群、(3) ポビドンヨード洗浄群、(4) HClO 水洗浄群、(5) BiSCaO 懸濁液洗浄群の 5 群に分けた。最初の 3 日間は緑膿菌感染創を各試験薬 3 mL を用いて 5 回洗浄を繰り返し (計 15 mL)、4~9 日目には (2) ~ (5) 群の創部を生理食塩水 (大塚製薬工場、徳島、日本) で洗浄した (図 2)。洗浄後の創部はキッチンナノファイバーシート (CNFS) (ベスキチン®W、ニプロ株式会社、大阪、日本) で被覆した。(1) の無処置群は実験期間中に洗浄は実施せず、CNFS のみ毎日交換した。

洗浄開始日を第 1 日と設定し、第 1、2、3、6、9 日に、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 回拭い回収した。その際、上皮化を阻害しないように細心の注意を払った。回収した緑膿菌懸濁液を緑膿菌分離寒天培地 (ポアメディア®、栄研化学、栃木、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 (試料数 $N=7$)。

毎日創部をデジタルカメラ (RICOH WG-50、リコーイメージング株式会社、東京、日本) で撮影し、写真を Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Inc.、CA、USA) で解析して創部の面積を算出し創収縮率を評価した (試料数 $N=7$)。

第 9 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) 投与により犠死させた後、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。

(5) 組織学的評価

創部を含む採取組織を 10% 中性緩衝ホルマリン（和光純薬工業、大阪、日本）に浸漬して固定した。創部中央の組織をパラフィン埋入し、厚さ 4 μm のパラフィン切片を作製し（大和光機、埼玉、日本）、その後 hematoxylin & eosin (HE) 染色を行った。顕微鏡（BZ-X700、キーエンス、大阪、日本）を用いて創部における肉芽の厚さと新生血管数を計測した（試料数 $N=7$ ）。新生血管は、赤血球が存在する管腔構造体について、連続切片で重複が無いように確認しながら、血管内皮細胞を伴う成熟した血管だけを計測した。

(6) 統計解析

統計学的検定は JMP Pro 14 (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 検定を使用した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

第3節 結果

(1) *In vitro* での殺菌活性

緑膿菌を BiSCaO 懸濁液、HClO 水及びポビドンヨードに暴露した結果、BiSCaO と HClO が 250 ppm 以上の濃度では CFU 値は検出下限未満となった（図 3）。125 ppm 以下では濃度減少に伴って検出される CFU 値が増大した。ポビドンヨードでは 250 ppm においても緑膿菌が検出された。

(2) ラット背部感染創部の緑膿菌数の評価

作製したヘアレスラット緑膿菌感染創モデルの創部における緑膿菌数は、いずれの個体においても 1.0×10^5 CFU 以上であった (図 4)。BiSCaO 懸濁液、HClO 水、ポビドンヨード、生理食塩水で創部を洗浄した後の 1 日目の緑膿菌コロニー数は、それぞれ 1.8×10^3 、 9.8×10^3 、 1×10^4 、 9.5×10^4 CFU であった。BiSCaO 懸濁液による洗浄により緑膿菌数が経時的に減少し、その減少速度は、HClO 水やポビドンヨード、生理食塩水と比較して統計的に有意に速かった。6 日目において、BiSCaO 懸濁液では緑膿菌が検出されなくなったのに対して、HClO 水やポビドンヨード、生理食塩水では緑膿菌が検出された。洗浄を行わない無処置群では 9 日目においても 1.0×10^4 以上の緑膿菌が検出された。なお、すべての実験群において、実験開始から感染後 9 日目まで、ラットに全身的な合併症や創傷部位の急性炎症、膿瘍形成、血種などの兆候は認めなかった。

(3) 感染創部の外観と面積の評価

実験開始 2 日目までの創収縮率には各群間で有意な差は認められなかった (図 5A、図 5B)。3 日目には BiSCaO 懸濁液による洗浄群が、他の 4 群と比較して創収縮率が有意に高く、6 日目以降においても BiSCaO 群で創傷収縮率が高い傾向にあった。

(4) 感染創部の組織学的評価

9 日目に創部を採取し、HE 染色により組織標本を作製した。BiSCaO 群と HClO 群では、無処置群と比較して、新生肉芽組織が統計学的有意に厚かった (図 6A、図 6B)。さらに、BiSCaO 群と HClO 群では生理食塩水群と比較して

肉芽が有意に増生していた。BiSCaO 群と HClO 群の間では肉芽増生の有意差を認めなかった。新生血管数に関しては、BiSCaO 群と HClO 群では無処置群とポビドンヨード群と比較して、統計学的に有意な新生血管数を示し、さらに BiSCaO 群では生理食塩水群と比較しても有意に多数の新生血管を認めた。

第 4 節 考 察

臨床現場では緑膿菌による創傷の感染が大きな合併症の一つとして挙げられる [21, 22]。そこで本研究では、緑膿菌に対する BiSCaO 懸濁液の殺菌効果を、*in vitro* で種々の消毒液と比較検討した。BiSCaO 懸濁液は 250 ppm 以上の濃度において、緑膿菌を検出限界未満まで殺菌した。同様に、HClO 水は 250 ppm 以上の濃度で、ポビドンヨードは 500 ppm 以上の濃度で緑膿菌を検出限界未満まで殺菌した。したがって、BiSCaO 懸濁液は緑膿菌に対して、HClO 水やポビドンヨードといった既存の消毒薬と同等以上の殺菌活性を有していることが分かった。

感染を伴った創傷部位の洗浄では、アミノ基やアルデヒド基を含むタンパク質、アミノ酸、および炭水化物などの有機化合物が存在しており、HClO 水はそれらと容易に反応し、結果として急速に失活して殺菌活性が減弱することが示唆されている [35, 36]。*In vivo* における本研究では、BiSCaO 懸濁液は、緑膿菌感染創の洗浄において、ポビドンヨードや HClO 水などの、他の消毒薬よりも優れた殺菌活性を示した。これは BiSCaO 懸濁液の主成分である CaO の水和による強アルカリ性による殺菌効果だけでなく、強アルカリ条件下での BiSCaO の凝集・沈殿活性 [33] による有機化合物や微生物の沈着が寄与している可能性

がある。

感染創における細菌負荷を制御するためには、創部の消毒によって菌量を減らすことが **Wound Healing Society (WHS)** のガイドラインで強く推奨されている。さらには、感染を十分に制御できたならば、消毒薬の毒性を考慮し、その使用を速やかに中止することも推奨されている [17-19]。実際の臨床では、感染創に対する消毒薬の効果は個々の症例で異なると推察されるが、細菌負荷が臨界的定着点から定着の状態に向かえば、消毒薬の使用を中止することが望ましい。本研究では、**BiSCaO** 懸濁液による洗浄は最初の 3 日間に限定したが、それによりラット背部感染創部の緑膿菌数は顕著に減少し、組織学的にも創傷治癒における肉芽形成や血管新生を阻害している所見は無く、むしろ生理食塩水で洗浄した群より治癒を促進していた。このことから 3 日間の **BiSCaO** 懸濁液の使用は緑膿菌感染創部の創傷治癒に対して有用であったと考える。一般的には、消毒薬の最適な使用期間に関しては、創部の所見からの臨床的判断に委ねることが多く、客観的に判断する手法は未だ確立されていないが、創部からの定量的な微生物学的検査の実施が可能であれば判断の一助になると考えられる。

本研究では、**BiSCaO** 懸濁液による洗浄は、最初の 3 日間行ったことで、細菌数を抑制しつつも、細胞への悪影響を最小限に抑えることができ、創傷治癒に好影響をもたらしたと推察される。

第 5 節 小 括

BiSCaO 懸濁液の創傷用消毒剤としての有用性を検討した。*In vitro* において **BiSCaO** 懸濁液は、ポビドンヨードと比較して緑膿菌に対する殺菌活性が有意

に高かった。*In vivo*での検討では、BiSCaO懸濁液により創傷部を洗浄した結果、緑膿菌数が顕著に減少し、その効果はポビドンヨードやHClO水よりも高かった。さらに、創収縮率、新生肉芽組織の厚み、および新生血管数の評価の結果、BiSCaO懸濁液はHClO水と同程度に創傷治癒を促進することが明らかとなった。以上から、BiSCaO懸濁液は優れた創傷用消毒剤として活用できる可能性があり、将来的な臨床応用が期待出来る。

第 3 章 BiSCaO 軟膏の殺菌活性とヘアレスラット緑膿菌感染創モデルに対する効果検討

第 1 節 背景及び目的

第 2 章において、BiSCaO 懸濁液は *in vitro* において既存の消毒薬より緑膿菌に対して殺菌活性が高いことが分かった。さらに、*in vivo* での緑膿菌感染創においても、既存の消毒薬と同等以上に緑膿菌数を減少させて、創収縮の促進に寄与することが分かった。消毒薬の形態は多様であり、その形態により使用目的が異なるが、感染創部に対する消毒剤の効果を最大限引き出すには、創部の状態によって消毒剤の形態を使い分ける必要がある。そこで、BiSCaO の特性をさらに応用して利用するべく、軟膏での有用性を検討した。

本章では BiSCaO 軟膏の感染創に対する創傷用消毒剤としての有用性を明らかにすることを目的とした。まず、*in vitro* での緑膿菌に対する殺菌活性をポピドンヨード軟膏と比較検討した。さらに、ヘアレスラット緑膿菌感染創モデルを用いて、感染創における BiSCaO 軟膏の殺菌活性および創傷治癒効果を評価した。

第 2 節 対象と方法

(1) BiSCaO 軟膏の作製

ホタテ貝殻粉末を 1450°C で加熱し、粉碎後に得られた平均直径 6 μm の BiSCaO を白色ワセリン（健栄製薬、大阪、日本）に均一分散させて 0.04、0.2、1 および 5 wt% の濃度の BiSCaO 軟膏を調製した。

(2) *In vitro*での BiSCaO 軟膏の殺菌活性の検討

ATCC 27853 株 (ATCC 社、米国) の超低温冷凍保存された緑膿菌 (1×10^5 CFU /100 μ L) を解凍、遠心分離後に PBS で洗浄し、培養培地の余分なタンパク質を除去した。0.04、0.2、1 および 5 wt% の BiSCaO 軟膏、3 wt% ポビドンヨード軟膏 (イソジン[®]、塩野義製薬、東京、日本)、および白色ワセリンそれぞれ 1 g を 90 \times 15 mm のペトリプレート上にコーティングした。上記緑膿菌の懸濁液 5 mL を軟膏でコーティングした各プレートに添加し、室温で 10、30 および 60 分間インキュベートさせた。その後、各緑膿菌懸濁液を緑膿菌分離寒天培地 (ポアメディア[®]、栄研化学、栃木、日本) 含有のペトリディッシュ上に播種した。37 $^{\circ}$ 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 (試料数 $N=6$)。

(3) *In vivo*での BiSCaO 軟膏の効果の検討

第 2 章で使用した緑膿菌感染創モデルラットを用いて実験を行った。ヘアレスラットの緑膿菌感染創部に適用する試験薬として、0.04、0.2、1 および 5 wt% の BiSCaO 軟膏、3 wt% ポビドンヨード軟膏、および白色ワセリンを用いた。実験群は (1) 無処置群、(2) 3 wt% ポビドンヨード軟膏群、(3) 白色ワセリン群、(4) 0.04 wt% BiSCaO 軟膏群、(5) 0.2 wt% BiSCaO 軟膏群、(6) 1 wt% BiSCaO 軟膏群、(7) 5 wt% BiSCaO 軟膏群の 7 群に分けた。(2) ~ (7) の実験群では、最初の 3 日間はヘアレスラット背部の緑膿菌感染創に、各試験薬の軟膏をそれぞれ 1 g 塗布した。4~9 日目には (2) ~ (7) 群の創部を生理食塩水で洗浄のみ実施した。洗浄後の創部は CNFS で被覆した。(1) の無処置群は実

験期間中に試験薬の塗布は実施せず、CNFSの被覆材のみ毎日交換した。

試験薬の塗布開始を第1日と設定し、第1、2、3、6、9日に、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回拭い回収した。その際、上皮化を阻害しないように細心の注意を払った。回収した緑膿菌懸濁液を緑膿菌分離寒天培地（ポアメディア®、栄研化学、栃木、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（試料数 $N=6$ ）。

毎日創部をデジタルカメラ（RICOH WG-50、リコーイメージング株式会社、東京、日本）で撮影し、写真をAdobe Photoshop CS6（Adobe Systems Inc.、CA、USA）で解析し創部の面積を算出し、創収縮率を評価した（試料数 $N=6$ ）。

第9日にペントバルビタールナトリウムの腹腔内過量（麻酔使用量の4倍量）投与により犠死させた後、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) 組織学的評価

創部を含む採取組織を10%中性緩衝ホルマリンに浸漬して固定し、創部中央の組織をパラフィン埋入し、厚さ4 μm のパラフィン切片を作製した。染色はHE染色とCD34免疫染色を行った。顕微鏡（BZ-X700、キーエンス、大阪）を用いて創部における肉芽の厚さと新生血管数を計測した（試料数 $N=6$ ）。新生血管は血管内皮細胞を伴う成熟した血管だけを計測した。

(5) 統計解析

統計学的検定は JMP Pro 14 (SAS Institute Japan Inc.、東京、日本) を用いた。全ての値は平均 ± 標準偏差として記載し、Tukey 検定を使用した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

第3節 結果

(1) *In vitro* での BiSCaO 軟膏の殺菌活性の検討

緑膿菌を BiSCaO 軟膏に暴露した結果、0.2 wt%以上の BiSCaO 軟膏では、10 分以上反応させると CFU 値は検出下限未満となった (図 7)。0.04 wt% BiSCaO 軟膏と 3 wt%ポビドンヨード軟膏では、30 分以下の暴露では、緑膿菌が検出された。全ての濃度の BiSCaO 軟膏と 3 wt%ポビドンヨード軟膏は 60 分暴露すると、CFU 値は検出下限未満となった。なお、コントロールの白色ワセリン群では 60 分暴露しても CFU 値は減少しなかった。

(2) ラット背部感染創部の緑膿菌数の評価

作製したヘアレスラット緑膿菌感染創モデルの創部における緑膿菌数は、いずれの個体においても 1.0×10^5 CFU 以上であった (図 8)。実験開始 2 日目までは 3 wt%ポビドンヨード軟膏、白色ワセリン、およびすべての濃度の BiSCaO 軟膏を塗布した各群間での緑膿菌のコロニー数に有意差は認めなかった。3 日目と 6 日目において、0.2、1 および 5 wt%の BiSCaO 軟膏群では、3 wt%ポビドンヨード軟膏、白色ワセリン、0.04 wt% BiSCaO 軟膏の群と比較して創部の緑膿菌は有意に減少した。9 日目には無処置群を除くすべての群で緑膿菌数は検出限界未満となった。無処置群では 9 日目においても 1.0×10^4 CFU 以上の緑膿

菌が検出された。なお、すべての実験群において、実験開始から感染後 9 日目まで、ラットに全身的な合併症や創傷部位の急性炎症、膿瘍形成、血種などの兆候は認めなかった。

(3) 感染創部の外観と面積の評価

実験開始から 2 日目までの創収縮率には各群間で有意な差は認められなかった (図 9A、図 9B)。3 日目では 0.2、1 wt% BiSCaO 軟膏群が、3 wt% ポビドンヨード軟膏群、白色ワセリン群、5 wt% BiSCaO 軟膏群および無処置群と比較して創収縮率が有意に高く、6 日目以降においても 0.2、1 wt% BiSCaO 軟膏群が他の群と比較して創傷収縮率が有意に高かった。

(4) 感染創部の組織学的評価

9 日目に創部を採取し、HE 染色と CD34 免疫染色により組織標本を作製した。0.2、1 wt% BiSCaO 軟膏群では、無処置群と白色ワセリン群と比較して、新生肉芽組織が有意に厚かった (図 10A、図 10B、表 1)。さらに 0.2、1 wt% BiSCaO 軟膏群は、無処置群と 3 wt% ポビドンヨード軟膏群と比較して、統計学的に有意な新生血管数を示した。

第 4 節 考 察

感染を伴った創部の創傷治癒過程において、細菌、壊死組織、乾燥や過度の湿潤、ポケットなどが存在すれば創の治癒は遅延する。その障害を取り除くため、あるいは正常な治癒過程に導くためには、創傷の状況に応じて適切な外用薬を

選択する必要がある。感染を伴った創部への外用療法には、抗菌力を有するポピドンヨード軟膏の使用が推奨されており、創傷治癒を促進することが報告されている [37, 38]。そこで本研究では、感染創の創傷治癒をさらに効果的に促進するために、軟膏としての BiSCaO の有用性を検討した。 *In vitro* における検討では、0.2 wt%以上の濃度の BiSCaO 軟膏群に緑膿菌を 10 分以上暴露すると、CFU 値は検出限界以下になることを確認した。BiSCaO は軟膏の形態において緑膿菌に対して十分な殺菌活性を示すことが明らかになった。さらに、 *in vivo* では、0.2、1 および 5 wt%の BiSCaO 軟膏群が他の群と比較して有意に緑膿数を減少させた。一方で、創傷治癒の観点からは、創収縮率、新生肉芽組織の形成、新生血管数を評価したところ、0.2、1 wt%の濃度の BiSCaO 軟膏が最も良好な結果を示した。費用対効果と安全性の観点を考慮すると、0.2 wt%の BiSCaO 軟膏が最適濃度であると考えられる。また、軟膏においても不適切な使用期間により、創面の乾燥や過度の浸潤が生じうる。さらに、周囲の皮膚に接触性皮膚炎や浸軟を起こす可能性もある。本研究では、BiSCaO 軟膏の使用期間は BiSCaO 懸濁液と同様に 3 日間に限定して使用したが、創部の緑膿菌を十分に抑制することができ、創傷治癒遅延を認めることもなかった。このことから 3 日間の 0.2、1 wt%の BiSCaO 軟膏の使用は、緑膿菌感染創において、有用性が有害性を上回り、創傷治癒へ好影響を与えたと考えられた。

第 5 節 小 括

BiSCaO 軟膏の創傷用消毒剤としての有用性を検討した。 *In vitro* での緑膿菌に対する殺菌活性は、0.2 wt%以上の BiSCaO 軟膏に 10 分以上暴露すると、緑

膿菌は検出限界以下となった。また、ヘアレスラット緑膿菌感染創モデルでの検討では、0.2、1 および 5 wt% BiSCaO 軟膏が他の群と比較して緑膿菌に対して有意な殺菌活性を示したが、創収縮率、新生肉芽組織の形成、新生血管数においては 0.2、1 wt%の BiSCaO 軟膏が最も良好な結果を示すことが明らかとなった。以上から、0.2、1 wt%の BiSCaO 軟膏は、創傷用消毒剤として有用である可能性が示唆された。

第4章 総括

ホタテ貝殻焼成酸化カルシウム (BiSCaO) は様々な病原菌 [3, 4]、鳥インフルエンザウイルス [5]、芽胞菌 [6]、真菌類 [7]、およびバイオフィーム [8, 9, 39] を除去できる。BiSCaO が殺菌活性を示すのは、BiSCaO に含まれる CaO が水和反応によって Ca(OH)_2 に変換されて、強塩基が生成されることが主要殺菌メカニズムであると考えられる [3]。一方で、全生菌細胞 (TC) および大腸菌群 (CF) に対する BiSCaO の殺菌活性は、同じ pH において Ca(OH)_2 や NaOH 水溶液よりも高いことから、BiSCaO の殺菌活性にはアルカリ度だけでは説明できない他のメカニズムが関与していると考えられる [32, 33]。さらに、BiSCaO は同じ濃度では、 HClO (pH 6.5)、 NaClO (pH 9.5)、ポビドンヨード、およびグルコン酸クロルヘキシジンを含む従来の消毒剤よりも高い殺菌活性を示す [40, 41]。第2章と第3章の *in vitro* の実験でも BiSCaO は緑膿菌に対して、既存の消毒薬である HClO 水やポビドンヨードと比較して、有意差をもって高い殺菌活性を示した。BiSCaO のこれらの高い殺菌活性は、強アルカリだけでなく、BiSCaO の還元活性によるものであり、BiSCaO 粒子の周囲に形成された薄い水層の水酸化物イオン (OH^-) 濃度が溶媒中の OH^- 濃度よりも高いことによる [32, 33]。さらに、BiSCaO の主成分である CaO から発生する活性ラジカル種も強力な殺菌活性に寄与している可能性があり [9, 39]、このことは Hewitt らによるマルチパラメーターフローサイトメトリーの研究でも裏付けられている [42]。

このように BiSCaO は広い抗菌スペクトルと高い殺菌活性を有する一方で、

ホタテ貝殻焼成酸化カルシウムは食品の貯蔵寿命を延ばすための添加剤としても使用されており、安全性が高いことが知られている [4, 9, 43]。第 2 章と第 3 章の *in vivo* での検討は、この生体安全性に優れた BiSCaO を創傷用消毒剤として臨床現場で利用できる可能性を明らかにすることを目的とした。主要な創傷感染の原因の 1 つとなっている緑膿菌を用いてヘアレスラット背部に緑膿菌感染創を作製して評価した結果、BiSCaO 懸濁液で緑膿菌感染創部を洗浄した群では、生理食塩水、ポビドンヨードおよび HClO 水で洗浄した群よりも、創傷内での緑膿菌数が早期に減少し、組織学的にも創部の治癒が促進されることが示された。また、BiSCaO 軟膏においても、0.2 wt%以上の濃度の BiSCaO 軟膏を塗布した群では、白色ワセリン、3 wt%ポビドンヨード軟膏を塗布した群と比較して創傷内での緑膿菌数が減少した。組織学的にも 0.2、1 wt%の BiSCaO 軟膏群は、無処置群と 3 wt%ポビドンヨード軟膏群と比較して、統計学的に有意な新生血管数を示し、創傷治癒に好影響をもたらすことが示された。以上の結果から、BiSCaO は、懸濁液や軟膏といった多様な形態で利用できる汎用性の高い創傷消毒剤として将来的に臨床現場で応用できる可能性が示唆された。

慢性創傷においては細菌の存在そのものが感染を意味するわけではなく、ある程度の細菌共存は創傷治癒を促進するとも報告されている [44]。創部の消毒は創傷面の組織にタンパク変性などの化学的損傷を与え、消毒薬の細胞毒性が創傷治癒遅延を招く懸念があるため漫然と使用するべきではない [45]。しかし、創部の細菌の増殖が臨界的定着点を超えて感染へと移行し、創傷治癒に障害を及ぼす状態では、多少の組織障害を犠牲にしてでも消毒によって感染をコントロールすることが推奨されている [17-19]。本研究においては、創部を BiSCaO

で消毒する期間は、十分に緑膿菌を抑制でき、かつ細胞障害性を最小限に抑えることを考慮して 3 日間に設定した。栗原らの研究では、糖尿病マウスの緑膿菌感染創に対して HClO 水による洗浄を 3 日間に限定して行った結果、HClO による組織障害の影響を最小限に抑えつつ、細菌数を抑制でき、さらには創面のバイオフィーム形成の抑制もできたと報告している [34]。本研究での 3 日間に限定した BiSCaO による創部の消毒は、十分に緑膿菌を抑制することができ、9 日目に採取した創部の組織学的解析で確認されたように、創部の新生肉芽組織や新生血管の形成を阻害するような兆候は見られず、創傷治癒を促進していた。これらの結果から、BiSCaO による緑膿菌感染創に対する 3 日間の消毒は、有用性が有害性を上回ると考えられた。BiSCaO を 3 日間以上連続使用した場合の創部への影響は、今後のさらなる検討が必要であるが、消毒剤の使用中止は、感染の兆候が消失し創傷が治癒段階に入った場合、すなわち、細菌負荷が保菌や定着の状態になった場合であることを考慮すると、創部からの定量的な微生物学的検査の実施が、BiSCaO の適正使用期間の判断に有用であると思われる。また、創面のバイオフィーム形成は創傷治癒が難治化する 1 つの要因であることが示唆されているが [13, 46]、ホタテ貝殻焼成酸化カルシウムはバイオフィームの形成を抑制する効果があることが報告されている [8, 9, 39]。今後、BiSCaO の使用期間とバイオフィーム形成の抑制効果との関係性を検討できれば、BiSCaO をより効果的に感染性創傷へ適用できる可能性が期待できる。

BiSCaO の生体適用における懸念として、pH が 12 を超える強アルカリ性であることが挙げられる。BiSCaO 懸濁液の上澄みを繰り返し回収することにより調製された BiSCaO Water (pH >12.7) は、BiSCaO 懸濁液と同様に *in vitro*

アッセイでインフルエンザウイルス、大腸菌、緑膿菌、サルモネラ菌、および黄色ブドウ球菌などの病原微生物に対して殺微生物活性があることが明らかになっている [47]。この BiSCaO Water をヘアレスラットの背部皮膚に塗布した場合、BiSCaO 中の CaO が空気中の CO₂ と反応して無害の CaCO₃ を生成しながら 5 分以内に pH は 10 に低下し、生体に支障を及ぼすことが無いレベルにまで pH が低下することが示された [48]。この研究では、ラット背部皮膚には副作用となる障害は観察されることは無く、BiSCaO の生体適用への安全性が示唆された。本研究においても BiSCaO 懸濁液と BiSCaO 軟膏の生体適応への安全性が示唆され、今後は更なる安全性の検討を重ねることで、環境適合性がある BiSCaO は、生体親和性にも優れた創傷用消毒剤として活用出来るものと期待出来る。

第5章 結 論

1. 本研究では、ホタテ貝殻を高温で焼成し微粉砕することで得られる酸化カルシウム粉末である BiSCaO から BiSCaO 懸濁液と独自開発した BiSCaO 軟膏を調製した。
2. *In vitro* において BiSCaO 懸濁液、BiSCaO 軟膏は緑膿菌に対して、優れた殺菌活性を示した。
3. *In vivo* において BiSCaO 懸濁液、BiSCaO 軟膏はヘアレスラット背部の緑膿菌感染創に対して、緑膿菌細菌数を抑制するとともに、創収縮率、肉芽組織形成、および血管新生の亢進を示し、創傷治癒に良好な効果をもたらした。
4. BiSCaO の感染性創傷に対する創傷用消毒剤としての有用性が示唆された。

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 石原雅之名誉教授、中村伸吾教授、防衛医科大学校歯科口腔外科 横江秀隆教授、ならびに防衛医科大学校形成外科 清澤智晴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、防衛医科大学校歯科口腔外科 村上馨准教授、防衛医学研究センター医療工学研究部門、佐藤洋子元助教、秦裕樹助教、比留間寿美代研究員、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적으로ご支援を下さいました防衛医科大学校歯科口腔外科ならびに防衛医学研究センター医療工学研究部門、特殊環境衛生研究部門、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。

付 記

本研究の一部を以下の論文で発表した。

筆頭者論文

1. **Takayama T.** Ishihara M, Sato Y, Nakamura S, Fukuda K, Murakami K, Yokoe H. Bioshell calcium oxide (BiSCaO) for cleansing and healing *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds in hairless rats. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2020;31(2):95-105.
2. **Takayama T.** Ishihara M, Nakamura S, Sato Y, Hiruma S, Fukuda K, Murakami K, Yokoe H. Bioshell Calcium Oxide (BiSCaO) Ointment for the Disinfection and Healing of *Pseudomonas aeruginosa*-Infected Wounds in Hairless Rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(11):4176.

本研究の一部を以下の学術集会で発表した。

日本防菌防黴学会 第46回年次大会 (大阪) 2019.9.25, 26

「難治性創傷に対するホタテ貝殻焼成酸化カルシウムの効果」

共著者論文

1. Sato Y, Ishihara M, Nakamura S, Fukuda K, **Takayama T.** Hiruma S, Murakami K, Fujita M, Yokoe H. Preparation and Application of Bioshell Calcium Oxide (BiSCaO)

- Nanoparticle-Dispersions with Bactericidal Activity. *Molecules*. 2019;24(18):3415.
2. Sato Y, Ohata H, Inoue A, Ishihara M, Nakamura S, Fukuda K, **Takayama T**, Murakami K, Hiruma S, Yokoe H. Application of Colloidal Dispersions of Bioshell Calcium Oxide (BiSCaO) for Disinfection. *Polymers*. 2019;11(12):1991.
 3. Sato Y, Ishihara M, Nakamura S, Fukuda K, Kuwabara M, **Takayama T**, Hiruma S, Murakami K, Fujita M, Yokoe H. Comparison of various disinfectants on bactericidal activity under organic matter contaminated water. *Biocontrol Science*. 2019;24(2):103-108.
 4. Nakamura S, Sato M, Sato Y, Ando N, **Takayama T**, Fujita M, Ishihara M. Synthesis and Application of Silver Nanoparticles (Ag NPs) for the Prevention of Infection in Healthcare Workers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(15):3620.
 5. Ishihara M, Nakamura S, Sato Y, **Takayama T**, Fukuda K, Fujita M, Murakami K, Yokoe H. Heparinoid Complex-Based Heparin-Binding Cytokines and Cell Delivery Carriers. *Molecules*. 2019;24(24):4630.
 6. Fukuda K, Sato Y, Ishihara M, Nakamura S, **Takayama T**, Murakami K, Fujita M, Yokoe H. Skin cleansing technique with disinfectant using improved high-velocity steam-air micromist jet spray. *Biocontrol Science*. 2020;25(1):35-39.
 7. Hiruma S, Ishihara M, Nakamura S, Sato Y, Asahina H, Fukuda K,

- Takayama T**, Murakami K, Yokoe H. Bioshell Calcium Oxide-Containing Liquids as a Sanitizer for the Reduction of Histamine Production in Raw Japanese Pilchard, Japanese Horse Mackerel, and Chub Mackerel. *Foods*. 2020;9(7):964.
8. Nakamura S, Ishihara M, Sato Y, **Takayama T**, Hiruma S, Ando N, Fukuda K, Murakami K, Yokoe H. Concentrated Bioshell Calcium Oxide (BiSCaO) Water Kills Pathogenic Microbes: Characterization and Activity. *Molecules*. 2020;25(13):3001.
9. Ishihara M, Hata Y, Hiruma S, **Takayama T**, Nakamura S, Sato Y, Ando N, Fukuda K, Murakami K, Yokoe H. Safety of Concentrated Bioshell Calcium Oxide Water Application for Surface and Skin Disinfections against Pathogenic Microbes. *Molecules*. 2020;25(19):4502.
10. Hiruma S, Hata Y, Ishihara M, **Takayama T**, Nakamura S, Ando N, Fukuda K, Sato Y, Murakami K, Yokoe H. Efficacy of Bioshell Calcium Oxide Water as Disinfectants to Enable Face Mask Reuse. *Biocontrol Science*. 2021;26(1):27-35.

略語一覧

略語	外国語	日本語
BiSCaO	Heated bio-shell calcium oxide	貝殻焼成酸化カルシウム
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
ppm	Parts Per Million	100 万分の 1
CNFS	Chitin Nanofiber Sheet	キチンナノファイバーシート
HE	Hematoxylin & eosin	ヘマトキシリンエオジン
WHS	Wound Healing Society	創傷治癒学会
wt%	Percent concentration of mass	質量パーセント濃度
CD	Cluster of differentiation	分化抗原群

引用文献

1. 安江 任, 遠山 岳史. 廃棄貝がらの資源化による循環型社会への挑戦.
Journal of the Society of Inorganic Materials, Japan. 2001;8(290):58-68.
2. Sawai J, Shiga H, Kojima H. Kinetic analysis of the bactericidal action of heated scallop-shell powder. International Journal of Food Microbiology. 2002;71(2):211-218.
3. Sawai J. Antimicrobial characteristics of heated scallop shell powder and its application. Biocontrol Science. 2011;16(3):95–102.
4. Watanabe T, Fujimoto R, Sawai J, Kikuchi M, Yahata S, Satoh S. Antibacterial characteristics of heated scallop-shell nano-particles. Biocontrol Science. 2014;19(2):93–97.
5. Thammakarn C, Satoh K, Suguro A, Hakim H, Ruenphet S, TaKehara K. Inactivation of avian influenza virus, Newcastle disease virus and goose parvovirus using solution of nano-sized scallop shell powder. Journal of Veterinary Medical Science. 2014;76(9):1277–1280.
6. Sawai J, Miyoshi H, Kojima H. Sporicidal kinetics of *Bacillus subtilis* spores by heated scallop shell powder. Journal of Food Protection. 2003;66(8):1482–1485.
7. Xing R, Qin Y, Guan X, Liu S, Yu H, Li P. Comparison of antifungal activities of scallop shell, oyster shell and their pyrolyzed products.

- The Egyptian Journal of Aquatic Research. 2013;39(2):83–90.
8. Sawai J, Nagasawa K, Kikuchi M. Ability of heated scallop–shell powder to disinfect *Staphylococcus aureus* biofilm. Food Science and Technology Research. 2013;19(14):561–568.
 9. Shimamura N, Irie F, Yamakawa T, Kikuchi M, Sawai J. Heated scallop-shell powder treatment for deactivation and removal of *Listeria* sp. Biofilm formed at low temperature. Biocontrol Science. 2015;20(2):153–157.
 10. Clark RA. Biology of dermal wound repair. Dermatologic clinics. 1993;11(4):647-666.
 11. Robson MC, Stenberg BD, Hegggers JP. Wound healing alterations caused by infection. Clinics in plastic surgery. 1990;17(3):485-492.
 12. Payne WG, Wright TE, Ko F, Wheeler C, Wang X, Wang MC. Bacterial Degradation of Growth Factors. Journal of Applied Research. 2003;3(1).
 13. Richard J, Keith F. Critical colonization - the concept under scrutiny. Ostomy Wound Manage. 2006;52(11):50-56.
 14. Sibbald R, Browne A, Coutts P, Queen D. Screening evaluation of an ionized nanocrystalline silver dressing in chronic wound care. Ostomy Wound Manage. 2001;47(10):38-43.
 15. Iijima S, Kuramochi M. Investigation of irritant skin reaction by 10% povidone-iodine solution after surgery. Dermatology.

2002;204(1):103-108.

16. Group HGSC. Lack of Reliability of Clinical/Visual Assessment of Chronic Wound Infection: The Incidence of Biopsy-Proven Infection in Venous. *Wounds*. 2006;18(7):197-202.
17. Whitney J, Phillips L, Aslam R, Barbul A, Gottrup F, Gould L, Robson MC, Rodeheaver G, Thomas D, Stotts N. Guidelines for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair Regen*. 2006;14(6):663-679.
18. Steed DL, Attinger C, Colaizzi T, Crossland M, Franz M, Harkless L, Johnson A, Moosa H, Robson M, Serena T, Sheehan P, Veves A, Bryant LW. Guidelines for the treatment of diabetic ulcers. *Wound Repair Regen*. 2006;14(6):680-692.
19. Robson MC, Cooper DM, Aslam R, Gould LJ, Harding KG, Margolis DJ, Ochs DE, Serena TE, Snyder RJ, Steed DL, Thomas DR, Bryant LW. Guidelines for the treatment of venous ulcers. *Wound Repair Regen*. 2006;14(6):649-662.
20. Robson M, Edstrom L, Krizek T, Groskin M. The efficacy of systemic antibiotics in the treatment of granulating wounds. *Journal of Surgical Research*. 1974;16(4):299-306.
21. Karna SR, D'Arpa P, Chen T, Qian L-W, Fourcaudot AB, Yamane K, Chen P, Abercrombie JJ, You T, Leung KP. RNA-Seq Transcriptomic Responses of Full-Thickness Dermal Excision Wounds to *Pseudomonas aeruginosa* Acute and Biofilm Infection.

- PLOS ONE. 2016;11(10):e0165312.
22. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases*. 1998;4(4):551-60.
 23. 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.
 24. 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.
 25. McCauley RL, Linares HA, Herndon DN, Robson MC, Hegggers JP. In vitro toxicity of topical antimicrobial agents to human fibroblasts. *Journal of Surgical Research*. 1989;46(3):267-274.
 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. McCauley RL, Li YY, Poole B, Evans MJ, Robson MC, Hegggers JP. Differential inhibition of human basal keratinocyte growth to silver sulfadiazine and mafenide acetate. *Journal of Surgical Research*. 1992;52(3):276-285.
 28. Wiercinski FJ. Calcium, An Overview-1989. *Biol Bull*. 1989;176(3):195-217.

29. Yasue T, Kojima Y, Arai Y. Research Trend in Lime. *Inorganic Materials*. 1994;1(252):370-381.
30. Yasue T, Arai Y. Crystal Shape and Size Controls of Lime. *Inorganic Materials*. 1995;2(258):356-364.
31. Liu FJ, Chou KS, Huang YK. A novel method to make regenerable core-shell calcium-based sorbents. *Journal of Environmental Management*. 2006;79(1):51-56.
32. Sato Y, Ishihara M, Nakamura S, Fukuda K, Takayama T, Hiruma S, Murakami K, Fujita M, Yokoe H. Preparation and Application of Bioshell Calcium Oxide (BiSCaO) Nanoparticle-Dispersions with Bactericidal Activity. *Molecules*. 2019;24(18):3415.
33. Sato Y, Ohata H, Inoue A, Ishihara M, Nakamura S, Fukuda K, Takayama T, Murakami K, Hiruma S, Yokoe H. Application of Colloidal Dispersions of Bioshell Calcium Oxide (BiSCaO) for Disinfection. *Polymers*. 2019;11(12):1991.
34. Kuwabara M, Sato Y, Ishihara M, Takayama T, Nakamura S, Fukuda K, Murakami K, Yokoe H, Kiyosawa T. Healing of *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds in diabetic db/db mice by weakly acidic hypochlorous acid cleansing and silver nanoparticle/chitin-nanofiber sheet covering. *Wound Medicine*. 2020;28:Art.No.100183

35. Ishihara M, Fukuda K, Nakamura S, Kuwabara M, Murakami K, Hattori H, Fujita M, Kiyosawa T, Yokoe H. Stability of weak acidic hypochlorous acid solution with microbicidal activity. *Biocontrol Science*. 2017;22(4):223-227.
36. Sato Y, Ishihara M, Fukuda K, Nakamura S, Murakami K, Fujita M, Yokoe H. Behavior of nitrate nitrogen and nitrite nitrogen in drinking waters. *Biocontrol Science*. 2018;23(3):139-143.
37. O'Meara S, Al-Kurdi D, Ologun Y, Ovington LG, James M, Richardson R. Antibiotics and antiseptics for venous leg ulcers. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014;10(1): CD003557.
38. Sundberg J, Meller R. A retrospective review of the use of cadexomer iodine in the treatment of chronic wounds. *Wounds*. 1997;9(3):68-86.
39. Kubo M, Ohshima Y, Irie F, Kikuchi M, Sawai J. Disinfection Treatment of Heated Scallop-Shell Powder on Biofilm of *Escherichia coli* ATCC 25922 Surrogated for *E. coli* O157:H7. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2013;4(4):10-19.
40. Sato Y, Ishihara M, Nakamura S, Fukuda K, Kuwabara M, Takayama T, Hiruma S, Murakami K, Fujita M, Yokoe H. Comparison of various disinfectants on bactericidal activity under organic matter contaminated water. *Biocontrol Science*. 2019;24(2):103-108.
41. Fukuda K, Sato Y, Ishihara M, Nakamura S, Takayama T, Murakami K, Fujita M, Yokoe H. Skin cleansing technique with disinfectant using

- improved high-velocity steam-air micromist jet spray. *Biocontrol Science*. 2020;25(1):35-39.
42. Hewitt CJ, Bellara SR, Andreani A, Nebe-von-Caron G, McFarlane CM. An evaluation of the anti-bacterial action of ceramic powder slurries using multi-parameter flow cytometry. *Biotechnology Letters*. 2001;23(9):667-675.
43. Hiruma S, Ishihara M, Nakamura S, Sato Y, Asahina H, Fukuda K, Takayama T, Murakami K, Yokoe H. Bioshell Calcium Oxide-Containing Liquids as a Sanitizer for the Reduction of Histamine Production in Raw Japanese Pilchard, Japanese Horse Mackerel, and Chub Mackerel. *Foods*. 2020;9(7):964.
44. Kanno E, Kawakami K, Ritsu M, Ishii K, Tanno H, Toriyabe S, Imai Y, Maruyama R, Tachi M. Wound healing in skin promoted by inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: The critical role of tumor necrosis factor- α secreted from infiltrating neutrophils. *Wound Repair Regen*. 2011;19(5):608-621.
45. 市岡滋. 創傷治療における感染管理. 治療. 2003;85(10):2729-2733.
46. Bjarnsholt T, Moller K, Jensen P, Madsen KG, Phipps R, Kroghfelt K, Niels H, Michael G. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen*. 2008;16(1):2-10.
47. Nakamura S, Ishihara M, Sato Y, Takayama T, Hiruma S, Ando N, Fukuda K, Murakami K, Yokoe H. Concentrated Bioshell Calcium Oxide

(BiSCaO) Water Kills Pathogenic Microbes: Characterization and Activity. *Molecules*. 2020;25(13):3001.

48. Ishihara M, Hata Y, Hiruma S, Takayama T, Nakamura S, Sato Y, Ando N, Fukuda K, Murakami K, Yokoe H. Safety of Concentrated Bioshell Calcium Oxide Water Application for Surface and Skin Disinfections against Pathogenic Microbes. *Molecules*. 2020;25(19)4502.

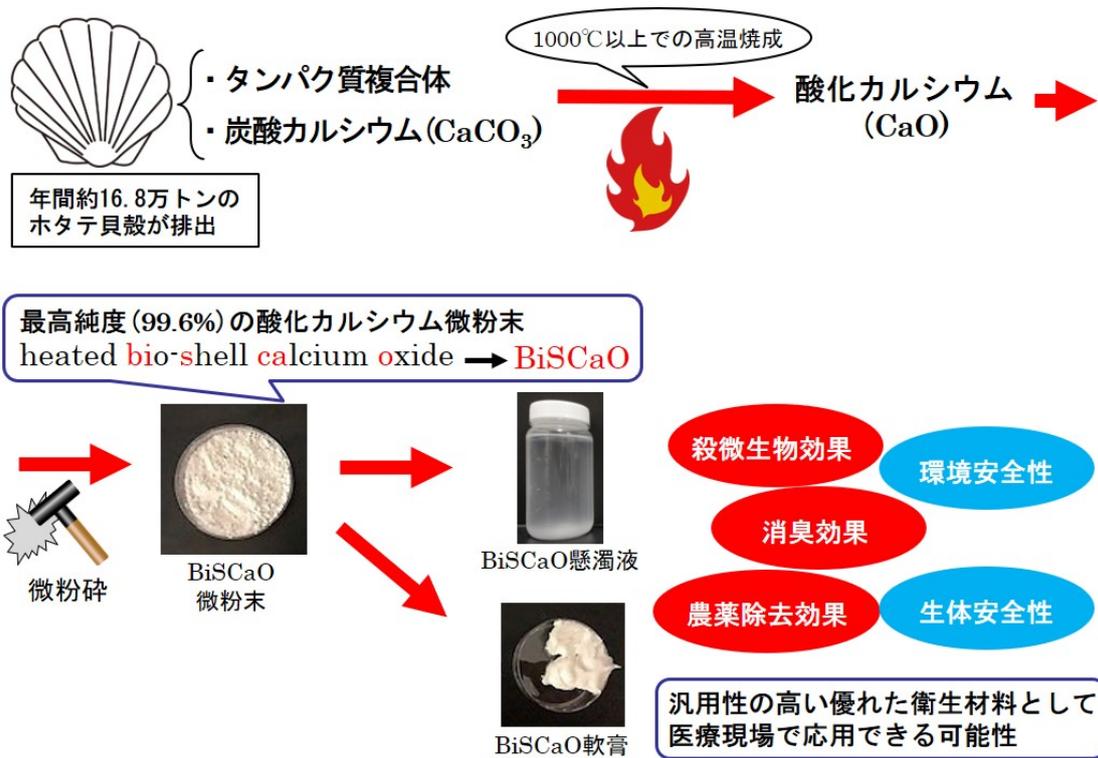


図1 ホタテ貝殻焼成酸化カルシウム (BiSCaO) の形態とその応用・可能性

ホタテ貝殻を1000°C以上の高温で焼成し微粉碎することで得られたBiSCaOは、高い殺菌活性を示す一方で、生体安全性が高い材料であり、汎用性の高い優れた衛生材料として臨床現場で応用できる可能性がある。

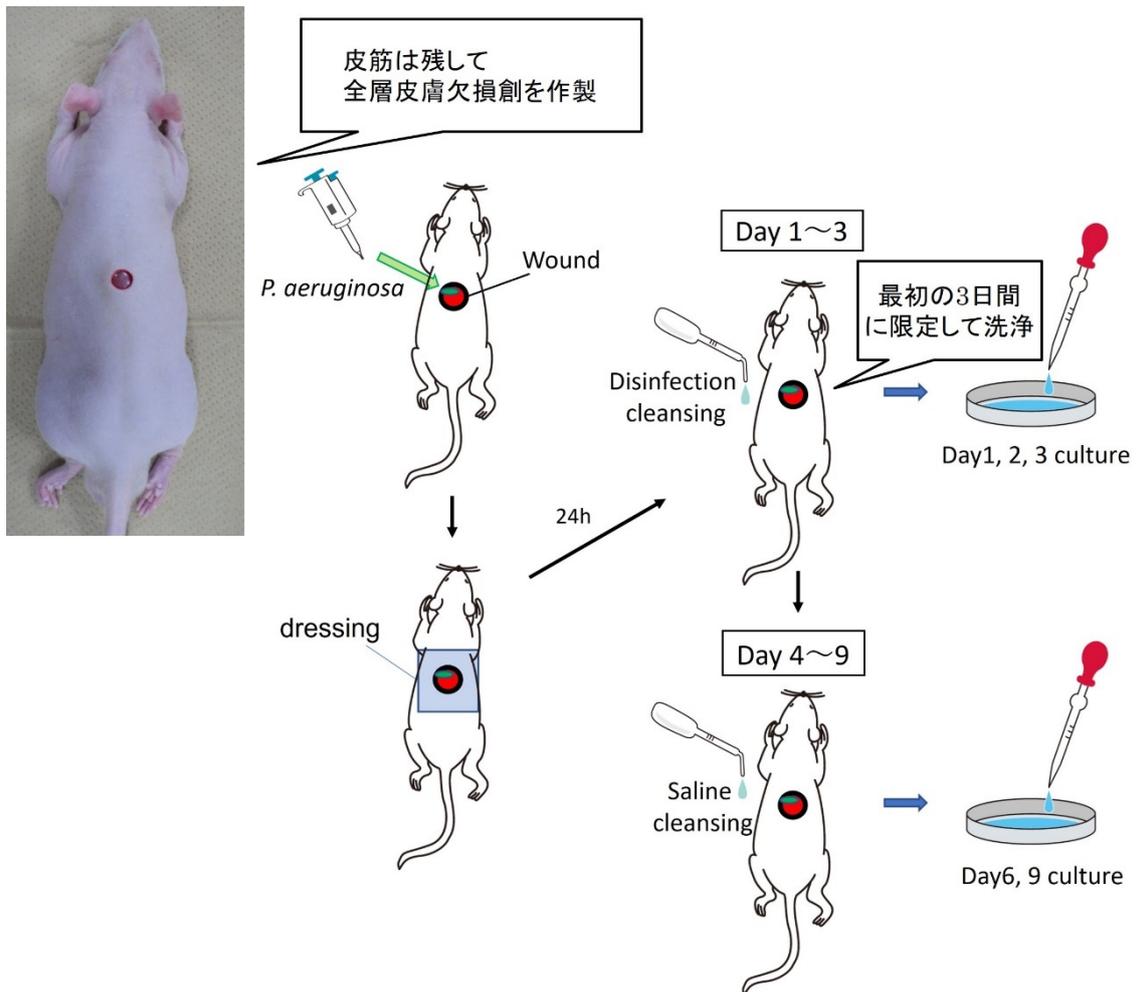


図 2 ヘアレスラット緑膿菌感染創モデルと BiSCaO 懸濁液の殺菌活性の検討

8 mm デルマパンチで全層皮膚欠損創を作製し、緑膿菌を播種させてハイドロコロイドで被覆し、24 時間経過した時点で緑膿菌感染創モデルの完成とした。創部を各試験薬で最初の 3 日間のみ洗浄、4~9 日目には創部を生理食塩水で洗浄した。第 1、2、3、6、9 日に創部に存在する緑膿菌を回収し、コロニー数を計測した。

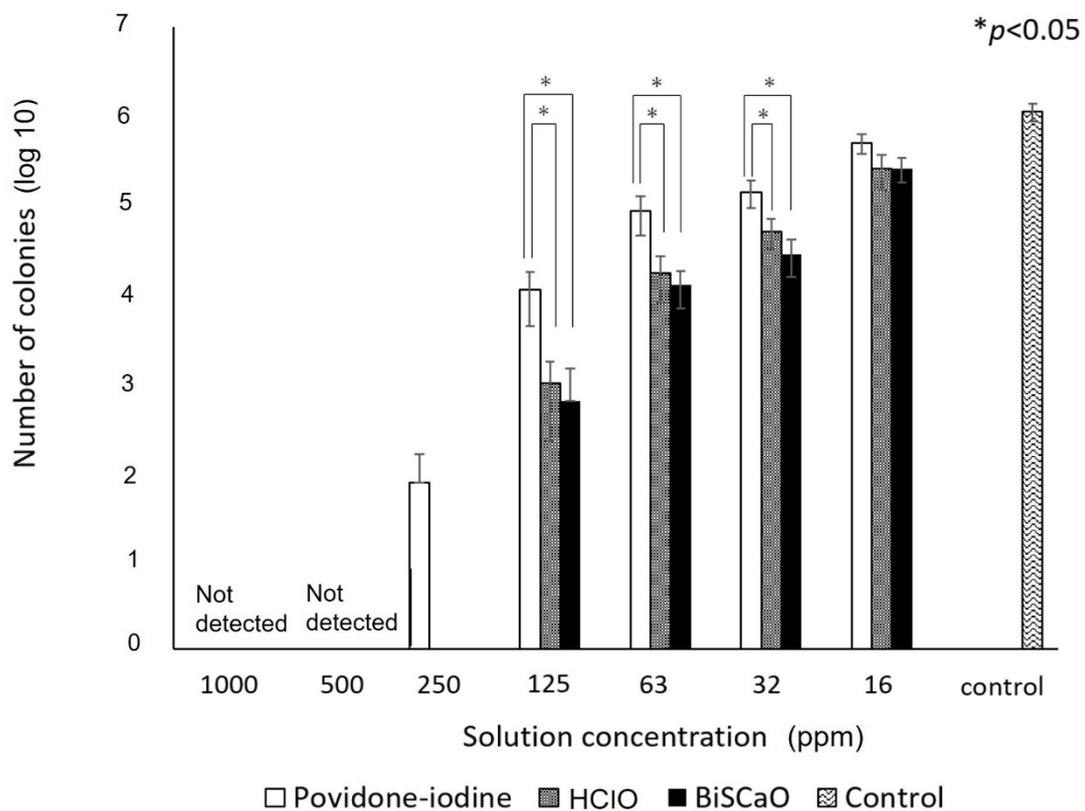


図3 *In vitro* での BiSCaO 懸濁液の殺菌活性の検討

BiSCaO 懸濁液、HClO 水、及びポビドンヨードを各濃度に調製し、緑膿菌と 15 分間反応させた後に、緑膿菌コロニー数を計測して評価した。コントロールとして生食を用いて同条件で設定した。各群とも $N=6$ とし平均値±標準偏差で示す。BiSCaO 懸濁液はポビドンヨードと比較して緑膿菌に対する殺菌活性が有意に高かった。

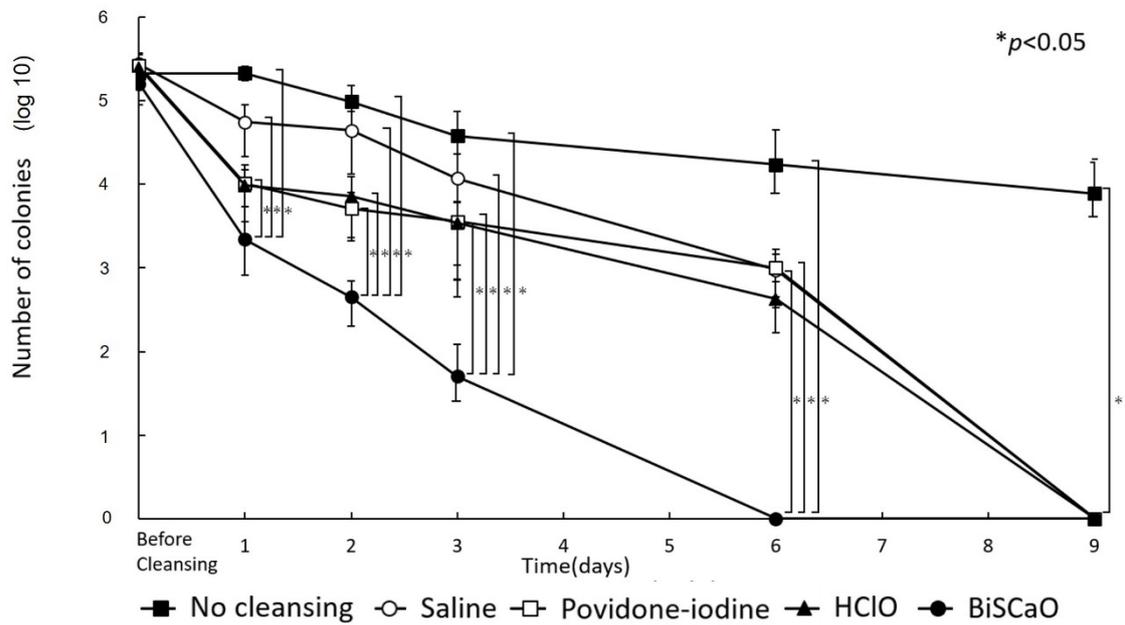


図4 *In vivo*でのBiSCaO懸濁液の効果の検討

ラット背部に緑膿菌感染創部を作製し、創部を1~3日目に各試験薬で洗浄し、4~9日目は生理食塩水で洗浄した。コントロールとして未処置群を設定した。第1、2、3、6、9日に創部に存在する緑膿菌数を計測して評価した。各群とも $N=7$ とし緑膿菌数の経時的変化を平均値±標準偏差で示した。BiSCaO懸濁液による洗浄により緑膿菌数は経時的に減少し、その減少速度は、HClO水、ポビドンヨード及び生理食塩水と比較して有意に速かった。

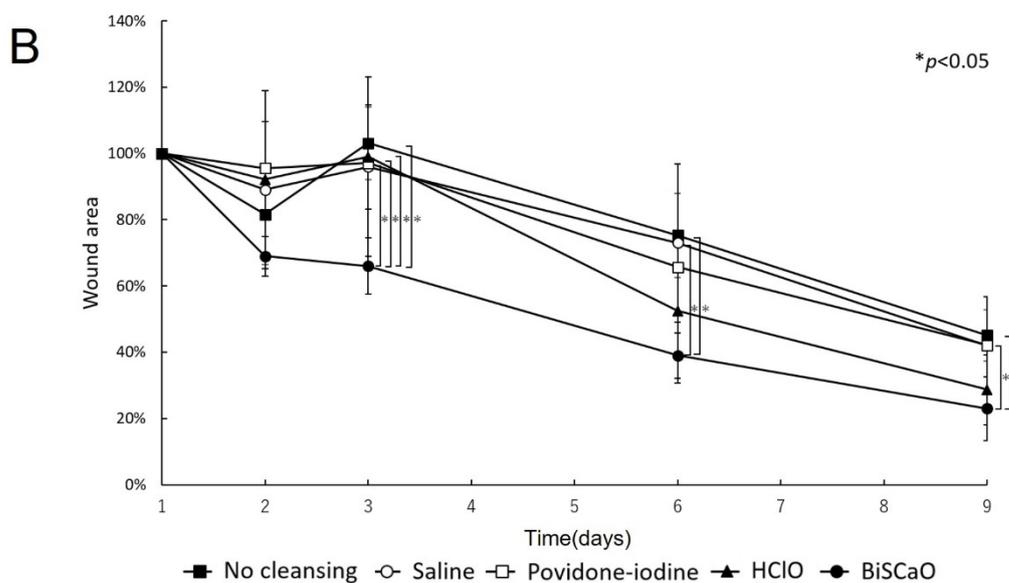
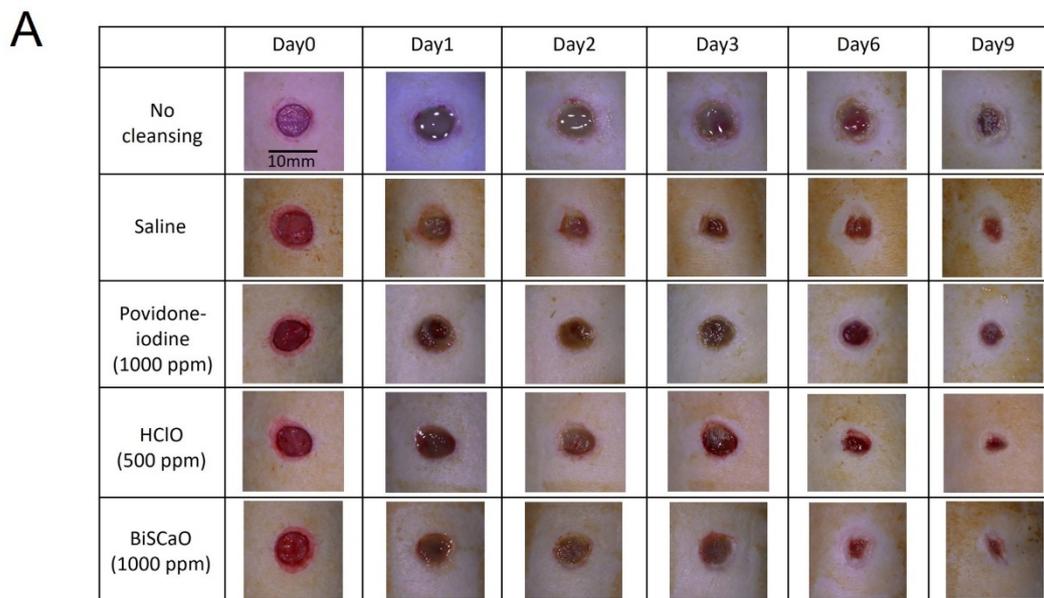
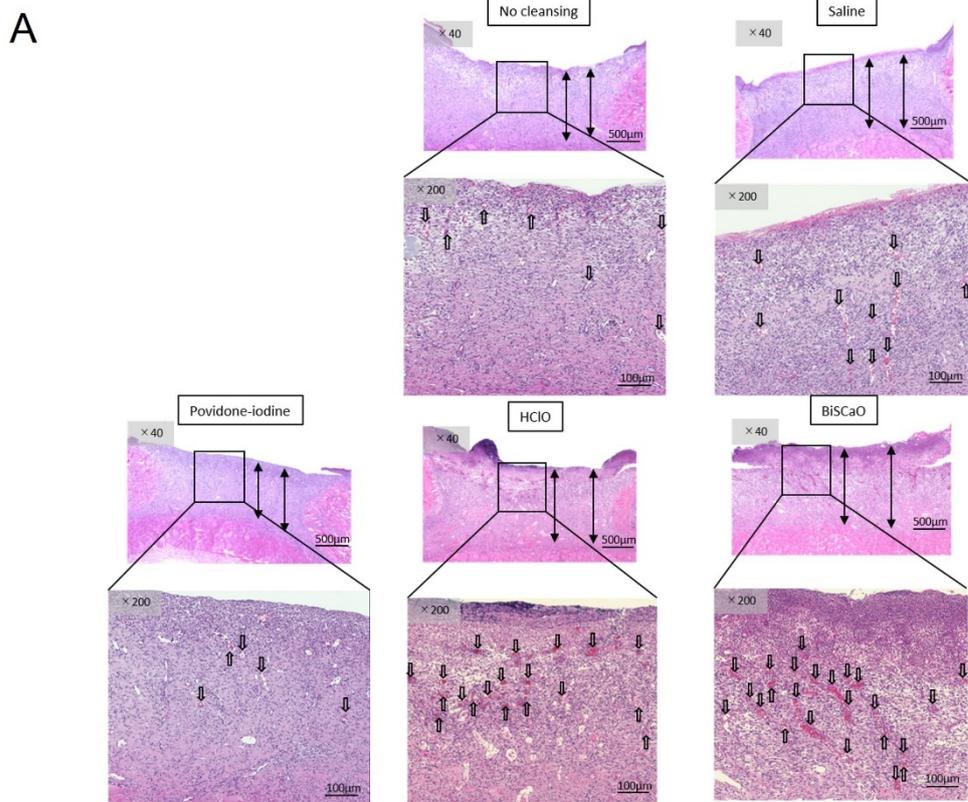


図 5 感染創部の外観と面積の評価

A : 各試験薬で洗浄した創部の経時的変化の外観写真。

B : 創部収縮率の経時的変化。(平均値±標準偏差、* $p < 0.05$)

3日目には BiSCaO 懸濁液による洗浄群が、他の4群と比較して創収縮率が有意に高く、6日目以降においても BiSCaO 群で創傷収縮が高い傾向にあった。



B

Disinfectant	Thickness of granulation tissue (μm)	Capillary formation (Capillary number / image)
No cleansing	920 ± 95	7 ± 5
Saline	1010 ± 160	18 ± 5
Povidone-iodine	930 ± 70	8 ± 3
HClO	1030 ± 50**	20 ± 6**
BiSCaO	1050 ± 50*,**	23 ± 6*,**

In Thickness of granulation tissue, * $P < 0.05$ vs. saline, ** $P < 0.01$ vs. no cleansing ($N = 7$),
 In capillary formation, * $P < 0.05$ vs. saline, ** $P < 0.01$ vs. no cleansing and povidone-iodine ($N = 7$)

図 6 緑膿菌感染創部の組織学的評価

A : 第 9 日目の緑膿菌感染創部の HE 染色による組織像。上段の画像の矢印の範囲は新生肉芽組織の厚みを、下段の画像の矢印は血管内皮細胞を有する新生血管を示す。

B : 各試験薬の新生肉芽組織の厚みと新生血管数を平均値 ± 標準偏差で示す。

BiSCaO 懸濁液洗浄群では無処置群、生食群と比較して有意に新生肉芽組織の厚みが増していた。新生血管数においても BiSCaO 懸濁液洗浄群は無処置群、生食群、ポビドンヨード群と比較して有意に多数の新生血管数を認めた。

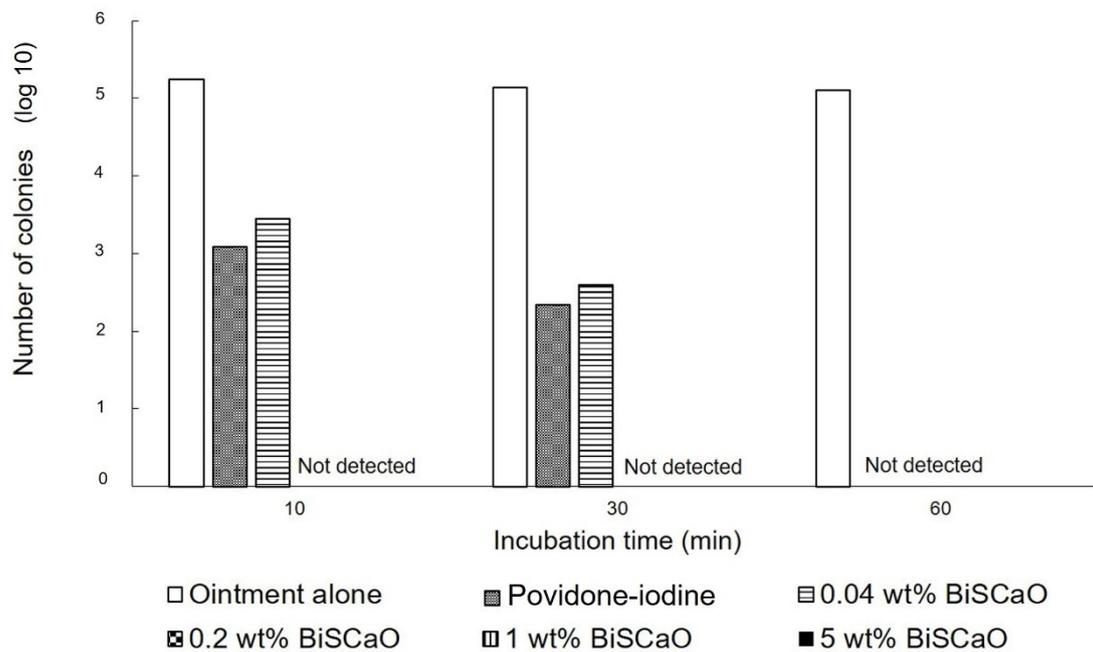


図 7 *In vitro* での BiSCaO 軟膏の殺菌活性の検討

各濃度に調製した BiSCaO 軟膏、3 wt%ポビドンヨード軟膏、白色ワセリン、それぞれ 1 g をペトリプレート上にコーティングし、緑膿菌の懸濁液を 5 mL を各プレートに添加し、室温で 10、30、60 分反応させた後、緑膿菌コロニー数を計測して評価した。各群とも $N=6$ とし平均値±標準偏差で示す。0.2 wt%以上の BiSCaO 軟膏では、10 分以上反応させると CFU 値は検出下限未満となった。

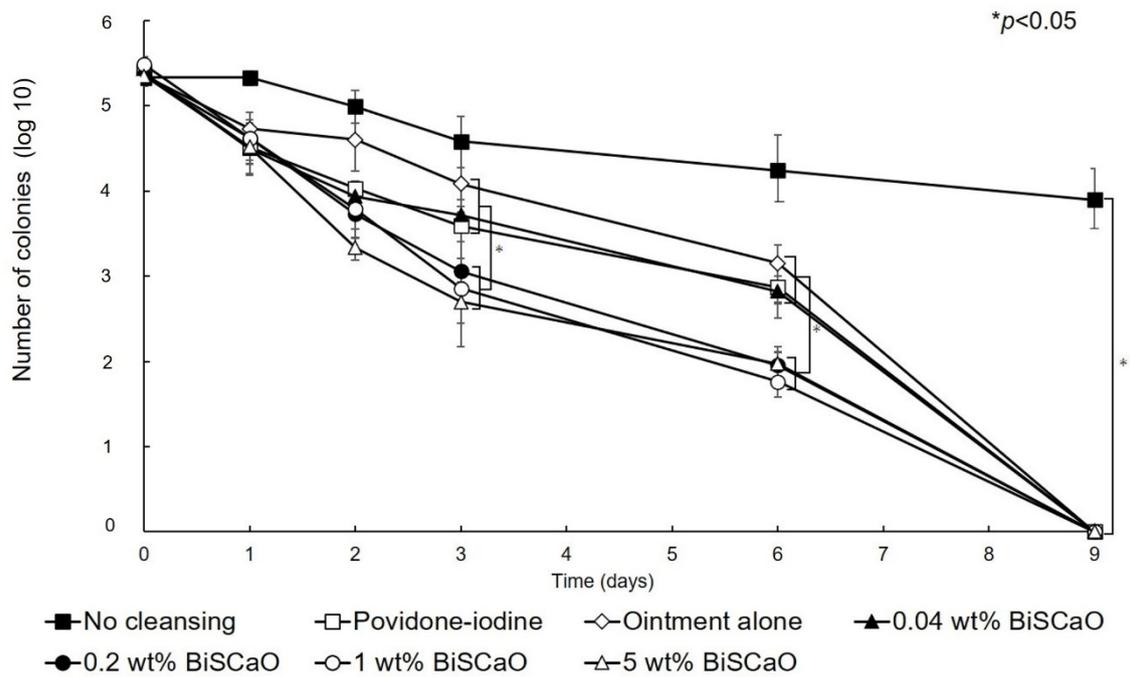


図 8 *In vivo* での BiSCaO 軟膏の効果の検討

ラット背部に緑膿菌感染創部を作製し、創部に 1~3 日目に各試験薬の軟膏を 1 g 塗布し、4~9 日目は生理食塩水で洗浄のみ行った。コントロールとして未処置群を設定した。第 1、2、3、6、9 日に創部に存在する緑膿菌数を計測して評価した。各群とも $N=6$ とし緑膿菌数の経時的変化を平均値±標準偏差で示した。0.2、1、5 wt% の BiSCaO 軟膏を塗布した群では、3 wt% ポビドンヨード軟膏、白色ワセリン、0.04 wt% BiSCaO 軟膏の群と比較して、創部の緑膿菌は有意に減少した。

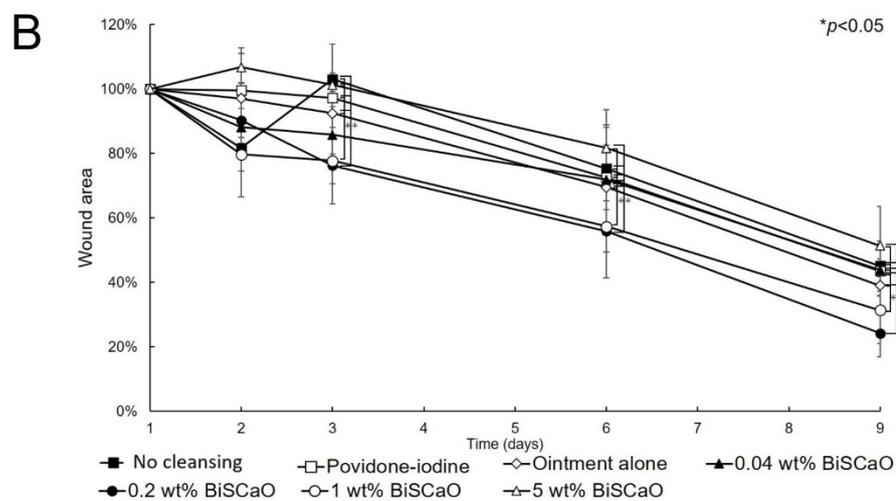
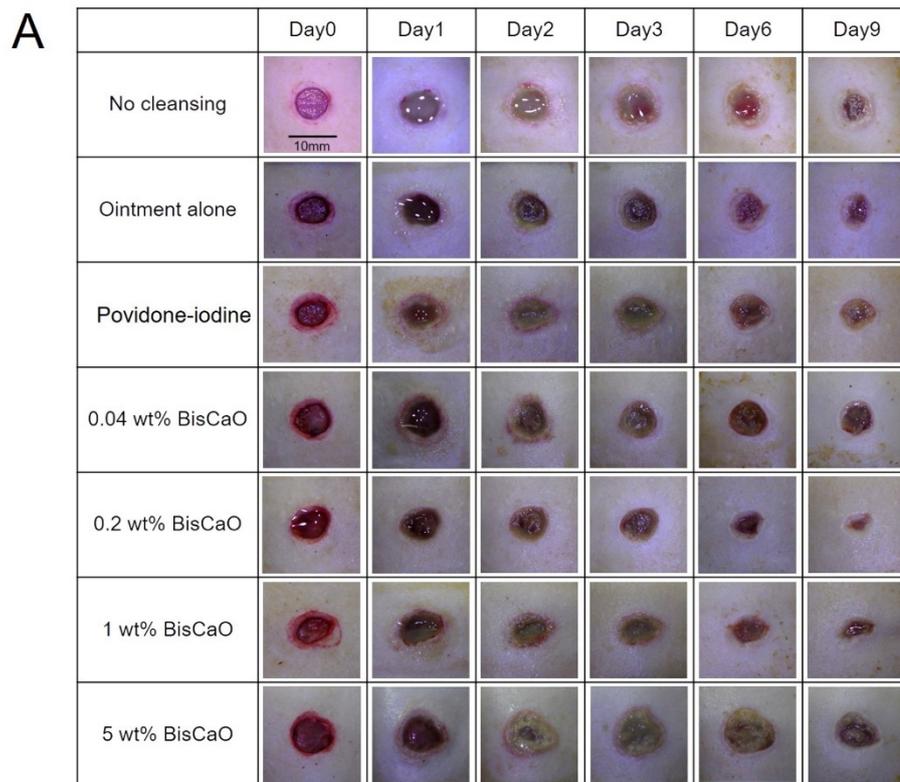


図 9 感染創部の外観と面積の評価

A : 各試験薬を塗布した創部の経時的変化の外観写真。

B : 創部収縮率の経時的変化。(平均値±標準偏差、* $p < 0.05$)

3日目以降、0.2、1 wt% BiSCaO 軟膏群では、他の群と比較して創傷収縮が有意に促進された。

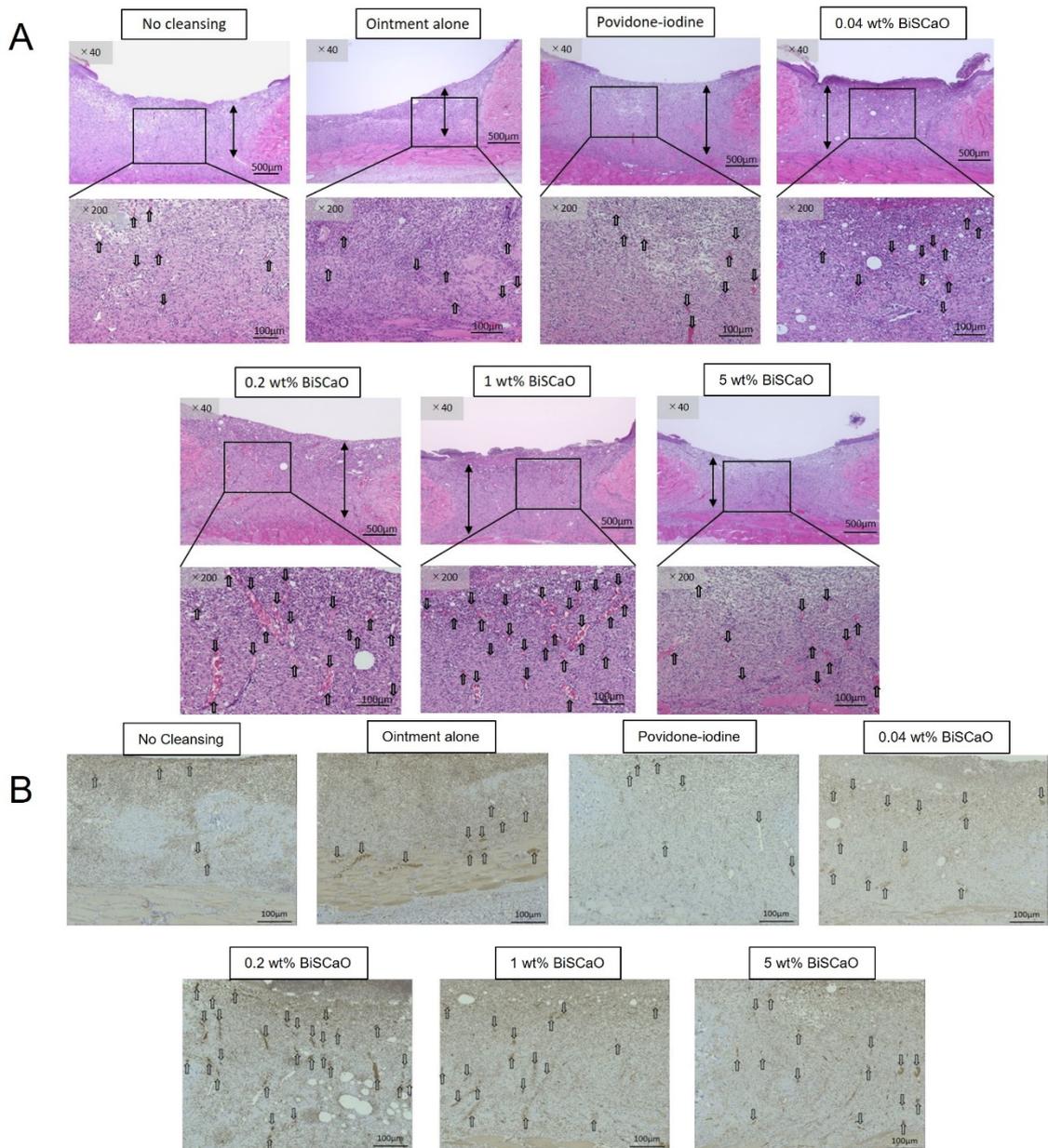


図 10 緑膿菌感染創部の組織学的評価

A：第9日目の緑膿菌感染創部の HE 染色による組織像。上段の画像の矢印の範囲は新生肉芽組織を、下段の画像の矢印は血管内皮細胞を有する新生血管を示す。

B：第9日目の緑膿菌感染創部の CD34 染色による組織像。矢印は血管内皮細胞を有する新生血管を示す。

Disinfectant in Ointments	Thickness of Granulation Tissue (μm)	Capillary Formation (Capillary Number / Image)
No cleansing	920 ± 95	7 ± 5
Ointment alone	940 ± 100	13 ± 4
Povidone-iodine	980 ± 80	9 ± 3
0.04 wt% BiSCaO	1020 ± 60	14 ± 6
0.2 wt% BiSCaO	1160 ± 85*	35 ± 10*
1 wt% BiSCaO	1120 ± 75*	31 ± 8*
5 wt% BiSCaO	950 ± 65	11 ± 6

In thickness of granulation tissue, *P <0.05 vs. no cleansing and ointment alone (N= 6),
In capillary formation, *P <0.05 vs. no cleansing and povidone-iodine (N= 6)

表 1 緑膿菌感染創部の組織学的評価

各試験薬での新生肉芽組織の厚みと新生血管数を平均値±標準偏差で示す。
0.2、1 wt% BiSCaO 軟膏群では、無処置群と白色ワセリン群と比較して、統計学的に有意な新生肉芽組織の厚みを示した。また新生血管数においても0.2、1 wt%BiSCaO 軟膏群は、無処置群と 3 wt%ポビドンヨード軟膏群と比較して、有意な新生血管数を示した。