

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15186

研究課題名(和文)化膿創傷の治癒を早める創傷被覆材 - 特に褥瘡の治癒を目指して

研究課題名(英文)Development of wound dressing which accelerates healing of suppurative wound

研究代表者

宮崎 孔志 (Miyazaki, Kohji)

京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：60254322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：湿潤タイプの創傷被覆材が開発され治癒が早まったが、化膿した創傷には適用できない。抗菌剤を配合した創傷被覆材も開発されているが、抗菌剤の細胞毒性により治癒が遅くなる。我々は、病原菌を殺菌せずに毒素産生のみを抑制でき、細胞毒性を示さない抑制剤を開発した。そこで、免疫不全のヘアレスマウスの化膿創傷に、創傷被覆材を3 mM抑制剤水溶液に浸漬し風乾したものを貼付し、治癒効果を検証した。その結果、貼付3日後から有意に化膿創傷の治癒が早まった。つまり、治癒の促進と感染抑制を両立する創傷被覆材が開発できた。

研究成果の概要(英文)：Wound healing is hastened by the wound dressing of wet type. But this type cannot be applied to suppurative wound. Although a wound dressing containing antimicrobial agent is developed, wound healing is delayed because of its cytotoxicity. We found an inhibitor, which depresses toxin production by pathogenic bacteria without bactericidal activity. This compound does not exhibit cytotoxicity. Therefore, the wound dressing contained this inhibitor was prepared by soaking in 3 mM solution of the inhibitor and air drying. This dressing was plastered to the suppurative wound of immunodeficient hairless mouse, and its healing effect was examined. As the result, after 3 days from plaster, healing of suppurative wound was notably improved. Then both of enhancement of wound healing and depression of infection are achieved.

研究分野：病原性細菌学

キーワード：創傷被覆材 化膿創傷 治癒効果

1. 研究開始当初の背景

近年、湿潤タイプの創傷被覆材が開発され、創傷の治癒が早まったが、その一方で感染またはその疑いのある創傷には適用できない。抗菌剤を配合したものも市販されているが、抗菌剤は細胞毒性が高く、上皮細胞がダメージを受け治癒が遅くなる。つまり、治癒の促進と感染抑制の両立が課題となっている。

2. 研究の目的

治癒の促進と感染抑制を両立する創傷被覆材の開発が目的である。そのため、細胞毒性が低く、感染を抑制できる物質を創傷被覆材に配合できれば、上記課題を解決できる。我々は、病原細菌を殺菌せずにその毒素産生のみを抑制する物質（抑制剤）を開発しており、濃度によっては細胞毒性も低い。そこで、この抑制剤を配合した創傷被覆材を、化膿モデルマウスを用いて効果の検証を行うのが目的である。

3. 研究の方法

(1) 化膿に関与している主要細菌である黄色ブドウ球菌や化膿連鎖球菌を抑え、有用な皮膚常在菌である表皮ブドウ球菌に影響しない抑制剤の濃度を検証した。

(2) ヘアレスマウスに創傷（直径 6 mm）を作出し、黄色ブドウ球菌を接種して化膿創傷を確立させた。市販の湿潤タイプの創傷被覆材に抑制剤を浸み込ませたものを、創傷部位に貼付し効果の検証を行った。試験は 7 日間実施し、1 日 1 回被覆材の交換を行い、その際、創傷部位の大きさを測定した。比較として、市販の被覆材と Ag 配合被覆材も用いた。試験 7 日目に、創傷部位を採取し病理組織学的に分析した。

(3) 免疫不全ヘアレスマウスを用いて、同様にして化膿創傷を作出した。抑制剤を結合させた繊維をフィルムに配合させたもの、および絆創膏タイプの創傷被覆材を抑制剤溶液に浸漬し風乾させたものを、創傷部位に貼付し、その治癒効果を検証した。

4. 研究成果

(1) 皮膚の化膿に関与する黄色ブドウ球菌および化膿連鎖球菌の増殖を抑制でき、皮膚バリア機能に有益な細菌である表皮ブドウ球菌の増殖を抑制しない最小生育阻止濃度（MIC）を求めたところ、各細菌での MIC 濃度は、黄色ブドウ球菌で 2 mM、化膿連鎖球菌で 1.5 mM であり、表皮ブドウ球菌では 4 mM でも増殖は抑制されなかった。したがって、用いる抑制剤の至適濃度は、2~4 mM であることが判明し、次の動物実験では 2 mM の抑制剤濃度で実験することにした。

(2) 化膿モデルヘアレスマウスで実験を行ったところ、湿潤タイプの創傷被覆材を貼付したマウスの治癒が最も早かった。この結果は、湿潤タイプの創傷被覆材の貼付

によって過剰量の浸出液が保持された結果、創傷部の組織が膨潤し、かえって治癒が遅くなったことを示唆しているのかもしれない。実際、不適切な湿潤療法による治癒の遅滞が報告されている（盛山，2010）。

また、創傷被覆材を貼付したものの間には有意な治癒効果の差が認められなかった。試験期間中の創傷部位を観察してみると、試験開始 2 日目にはいずれも化膿が治まっていた。抑制剤は化膿した創傷の治癒に効果的であり、化膿していない創傷に対しては通常の創傷被覆材と大差がないのは当然であると考えられる。マウスは感染に対する治癒能力が高く、この結果は、この種の試験には、免疫機能の正常なマウスではなく、免疫不全マウスを用いることが肝要であることを示唆している。

さらに、病理組織学的に創傷部位を分析したところ、銀処理区では上皮の重層化が不完全な部位があり、真皮から皮下組織にかけて広範囲の細胞壊死、浮腫および著しい炎症性細胞の浸潤と集簇像が認められた（図 1）。

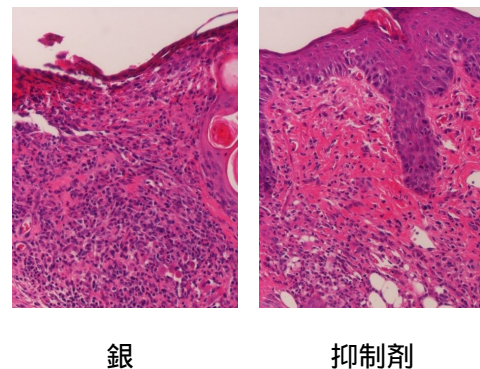


図 1 . 創傷部位の病理組織図

以上より、抗菌剤は細胞毒性が強いため、むしろ創傷治癒を遅延させていることが動物レベルでも明らかとなった。それに対し、抑制剤は細胞毒性を示さずに感染の抑制も可能であることから、新規性のある創傷被覆材を開発できる可能性が示唆された。

(3) 上記実験により、通常のヘアレスマウスでは、感染が自然に治癒してしまい、抑制剤の効果を検証するには適していなかった。そこで、免疫不全のヘアレスマウスを用い、同様に化膿創傷を作出することにした。

まず、この免疫不全マウスで、感染が持続するか検証を行った。接種する黄色ブドウ球菌の細菌数を、 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU の 4 段階にし、感染実験を行ったところ、細菌数が 10^8 CFU 以上であれば感染が成立し、 10^9 CFU でも供試動物は死亡することなく化膿状態を維持できることが確認された。そこで、これ以降の試験では、免疫不全のヘアレスマウスに 10^9 CFU の黄色ブドウ球菌を接種して実施することにした。

ヘアレスモデルマウスの化膿創傷部位に、ブランク、未処理粉末、EB 加工粉末および加工粉末を配合したフィルムを貼付し、5 日間試験を行った際の創傷治癒への効果を図 2 に示した。

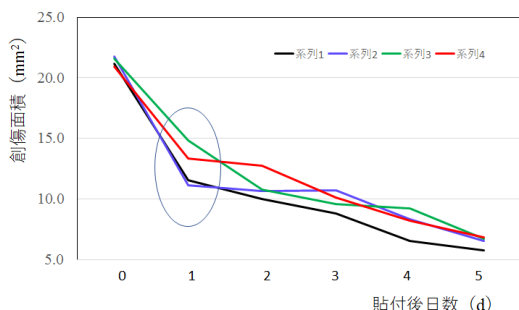


図 2 . 各種フィルムによる化膿創傷治癒効果

系列 1 : ブランク, 系列 2 : 未処理粉末,

系列 3 : EB 加工粉末, 系列 4 : エステル加工粉末

その結果、第 1 日目で最も処理による影響が大きく、ブランクおよび未処理粉末で顕著に治癒が生じていた。第 2 日目に、EB 加工粉末での創傷治癒はブランクおよび未処理粉末の治癒に追い付いてきたものの、エステル加工粉末では依然、創傷治癒の遅滞が観察された。第 3 日目を以降は、ブランクが最も治癒効果が高く、他の 3 者はほぼ同程度の治癒効果であった。つまり、リン酸基を導入した繊維を含むフィルムは、特に初期の治癒を遅らせていたことになり、おそらくリン酸基導入量が高く、上皮細胞に細胞毒性をもたらしたものと推察される。実際、試験期間中の体重変化をみると、第 1 日目で体重の減少が特にリン酸基を導入した繊維含有フィルムで高く、細胞毒性が現れていたのかもしれない。

リン酸基による細胞毒性を評価するため、抑制剤を用いて上皮細胞に対する EC50 を検証した結果、その EC50 は 0.21 wt% (約 5.7 mM) であり、濃度が高すぎると細胞毒性を示すことが明らかになった。

今回供試したフィルムではリン酸基導入量が高く、細胞毒性による結果、治癒の促進が認められなかった可能性がある。また、これらのフィルムには、抗菌作用のあるパラベンが含まれており、化膿創傷に対するリン酸基導入の効果を検証するには不適切であったかもしれない。また、パラベンはアトピー性皮膚炎の誘引物質である可能性も指摘されており (Spanier et. Al, 2014) この面からもその使用には慎重さが必要であろう。

そこで、パラベンを含まず、かつ適切なリン酸基濃度での治癒効果を検証するために、3mM の抑制剤溶液 (pH 7.0) に絆創膏タイプの創傷被覆材を浸漬した後、風乾させたものを創傷被覆材として、同様の実

験を化膿モデルマウスで行った (図 3)。

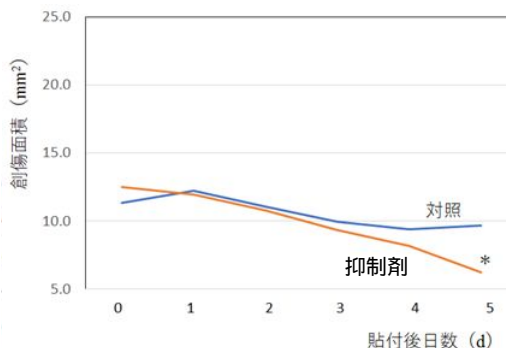


図 3 . 抑制剤を配合した絆創膏タイプの創傷被覆材での治癒効果

その結果、対照ではほとんど治癒が生じていないのに対し、抑制剤では貼付 5 日目に顕著な治癒の促進が認められた。以上のことから、リン酸基導入量を適切なレベルに保てば、リン酸基導入フィルムでも化膿創傷治癒効果が認められた可能性が高いと言えるであろう。つまり、「治癒の促進」と「感染の抑制」を両立する新規創傷被覆材の開発にほぼ成功し、これまで創傷被覆材が抱えていた問題点をブレイクスルーする技術が確立できた。

< 引用文献 >

Spanier AJ¹, Fausnight T, Camacho TF,

Braun JM. (2014). The associations of triclosan and paraben exposure with allergen sensitization and wheeze in children. Allergy Asthma Proc., 35:475-481.

盛山 吉弘 (2010). 不適切な湿潤療法による被害いわゆる“ラップ療法”の功罪. 日本皮膚科学会雑誌, 120:2187-2194.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 孔志 (MIYAZAKI, KOHJI)
京都府立大学・大学院生命環境科学研究
科・准教授
研究者番号：6 0 2 5 4 3 2 2

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()