

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K10144

研究課題名（和文）皮膚洗浄剤による創傷治癒への影響

研究課題名（英文）Effect of skin cleanser on wound healing

研究代表者

山下 寛奈（Yamashita, Kanna）

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20422751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：どのような皮膚洗浄剤が創傷治癒を妨げないのかを明らかにすることを目的に全層皮膚3次元培養モデルおよび単層培養の皮膚線維芽細胞に対する洗浄剤の影響について検討した。

3次元培養モデルに傷をつけ、毎日5分、5日間洗浄剤を作用させると、全層が溶けてしまい、切片にすることができなかった。単層線維芽細胞に洗浄剤を単回作用させた。一般向けの洗浄剤は、濃度依存的に細胞数の増加とコラーゲン量が増加した。敏感肌用洗浄剤は、細胞数は洗浄剤処理前よりも増加していたが、細胞内コラーゲン量は一般用洗浄剤より低かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創傷治癒に寄与する皮膚線維芽細胞の増殖やコラーゲン量について検討した。今回検討した洗浄剤では、細胞数と細胞内コラーゲン量に対する影響は異なる傾向があった。創傷治癒に対する洗浄剤の種類による違いについては、明確に示すことができなかった。今後、細胞数は多いがコラーゲン量が少ないことに対するより詳細な検討や、動物実験などでの生体における検討によって明確にしていく必要があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to determine whether there are differences between skin cleansers on wound healing and, if so, which ones do not interfere with wound healing. We investigated the effects of cleansing agents on a three-dimensional culture model of full-thickness skin and a single-layer dermal fibroblast culture.

When the 3D culture model was scratched and treated with detergent for 5 minutes per day for 5 days, the entire layer was dissolved and it was impossible to make sections. A monolayer of fibroblasts was exposed to a single wash of detergent. In the group treated with a skin cleanser for general, the number of cells and the amount of collagen increased in a dose-dependent manner. In the group treated with the cleanser for sensitive skin, the number of cells increased compared to before treatment with the cleanser, but the amount of intracellular collagen was lower than that of the general cleanser.

研究分野：基礎看護学

キーワード：皮膚 洗浄剤 線維芽細胞 創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

看護師は清拭または洗浄によって患者の皮膚を清潔に保つケアを行っている。一般的に、過剰脂肪酸・老廃角質・微生物などを石鹸等で洗い流すことが皮膚の生理的機能を保つために必要である。一方、潰瘍など皮膚に損傷がある場合には、洗浄剤による刺激を避けるために洗浄剤は使用せず、微温湯で流すのが定石である。びらんや潰瘍などがある部位に便などの汚染がある場合、創周囲は洗浄剤を用いて洗浄するのだが、洗浄液が創部にかかってしまう場合もあった。このような場合に、どのような洗浄剤が創傷に対し刺激が少ないのかは明白ではなかった。

創の治癒過程を検証するには、水分含有率等、体表からの計測によって差を見出すことは難しいため、皮膚組織標本を作製し形態学的に評価するなど、より詳細な検討が求められると考えた。今回は培養細胞による検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、損傷部のある皮膚に対し、どのような皮膚洗浄剤が創傷治癒を妨げないのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)細胞

初代ヒト表皮細胞および初代ヒト表皮線維芽細胞は CELLnTEC 社より購入した。使用した培地 (CnT-PR、CnT-PR-Fau、CnT-PR-FTAL5、すべて CELLnTEC 社) はすべて Ready-To-Use であり、血清等の添加は不要であった。全層皮膚 3 次元培養モデルは製品プロトコルに従い作製した。具体的には、24 穴プレートに 0.4 μ m ポアサイズのインサート(ミリポア)に線維芽細胞を播種し CnT-PR-Fau で培養後、CnT-PR で培養した表皮細胞を重層し、CnT-FTAL5 で 3 日間培養した。その後表皮細胞表面を空気層に触れさせ、12 日間培養した。また、単層ヒト線維芽細胞は CnT-PR-Fau を用いて 12 穴プレートで培養した。

(2)皮膚洗浄剤

市販されている 4 種類の液体ボディーソープを使用した。洗浄剤 A、B は一般向けに、洗浄剤 C は乾燥肌用として、洗浄剤 D および E はアトピーなどの敏感肌用として販売されていた。これら液体の皮膚洗浄剤を滅菌蒸留水で 100 倍、10³ 倍、10⁶ 倍、10⁹ 倍に希釈し、培養細胞に作用させた。

(3)洗浄剤での処理

全層皮膚 3 次元モデルの表皮および真皮の一部を生検トレパンで傷をつけた直後に、皮膚洗浄剤希釈液を表層に 1 日 5 分間作用させ、PBS による洗浄 2 回を 5 日間行った。

単層培養線維芽細胞では、12 穴プレートに 1 穴あたり 40,000 細胞を播種し、翌日に皮膚洗浄剤希釈液を 10 分間作用させ、PBS で 2 回洗浄後、培地交換せずに 6 日間培養し、gDNA 量とコラーゲン量測定に供した。

(4)gDNA 定量

gDNA の定量は DNA 定量キット (BioChain 社) を用いた。製品プロトコルに従い測定し、検量線から gDNA 量を算出した。

(5)コラーゲン定量

細胞を PBS で洗浄後 0.5M 酢酸でコラーゲンを溶出し、シリウスレッドコラーゲン検出キット (Chondrex 社) を用いた。製品プロトコルに従い、520 nm の吸光度を測定し、検量線からコラーゲン量を算出した。

4. 研究成果

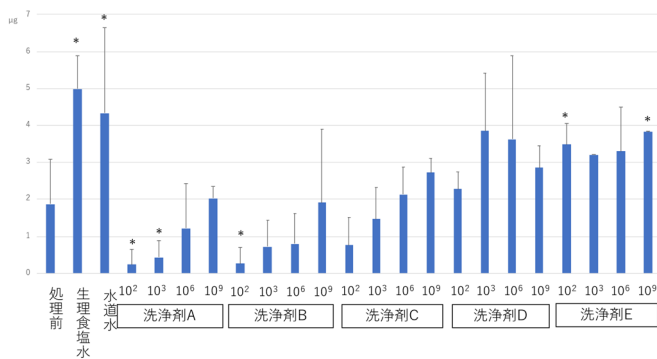
(1)全層皮膚 3 次元モデルに対する洗浄液の影響

全層皮膚 3 次元モデルに洗浄液を作用させ培養すると、全層が融解し、組織切片を作製することができなかった。したがって免疫染色等による組織学的な検討ができなかった。

3 次元皮膚培養モデルにおける洗浄剤の作用時間、日数についても検討する必要がある。

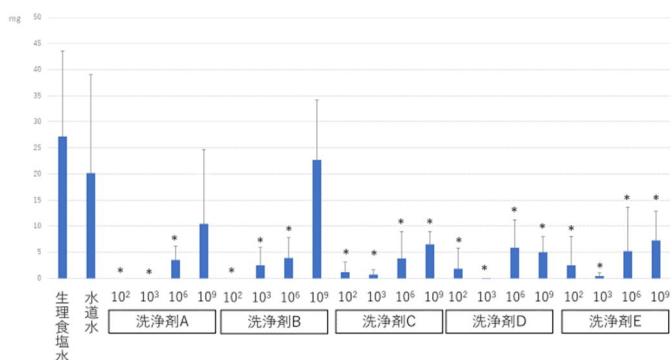
(2)単層線維芽細胞に対する洗浄液の影響

各洗浄剤希釈液を10分間線維芽細胞に作用させ、washout後に6日間培養し、gDNA量を測定した。図1は1ウエルあたりの平均gDNA量を示す。処理前のDNA量に対し生理食塩水処理では有意にDNA量が増加した。細胞が増殖することが示唆された。洗浄剤A及びBの100倍希釈では、処理前よりも有意に細胞数が減少した。洗浄剤を希釈するほどDNA量が多くなる傾向があった。



(図1) 洗浄剤を100倍、10³倍、10⁶倍、10⁹倍に希釈し、各溶液で10分間処理し、6日間培養後の1ウエルあたりの平均gDNA量を示す。エラーバーは標準偏差。*p<0.05 vs 処理前。

次に、線維芽細胞における酢酸可溶性コラーゲン量を測定した(図2)。全体として、洗浄液を希釈するほどコラーゲン量が増加する傾向がみられた。水道水での処理では生理食塩水との有意な差はなかった。洗浄剤D及びEは細胞数が増加しているにもかかわらずコラーゲン量が少なかったのは、産生したコラーゲンを細胞外へ分泌していた可能性がある。



(図2) 洗浄剤を100倍、10³倍、10⁶倍、10⁹倍に希釈し、各溶液で10分間処理し6日間培養後の1ウエルあたりの平均コラーゲン量を示す。エラーバーは標準偏差。*p<0.05 vs 生理食塩水

本研究では、線維芽細胞の細胞数とコラーゲン産生に対する皮膚洗浄剤の影響を検討した。各洗浄剤で濃度依存的な作用の傾向はみられたものの、洗浄剤間での明確な差は見出すことができなかった。本研究で用いた培地は線維芽細胞の増殖に適したものであったため、コラーゲン産生に適した培地に変更したり、細胞外に分泌したコラーゲンを測定したりするなど、さらに詳細な検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	三浦 克敏 (Miura Katsutoshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関