

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17791

研究課題名(和文) 電解水と低温プラズマを利用した新しい創傷治癒法の開発

研究課題名(英文) Novel wound healing method using electrolyzed water and low temperature plasma

研究代表者

目代 貴之(Mokudai, Takayuki)

東北大学・金属材料研究所・特任助教

研究者番号：30466544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、電気分解で得られた電解水と大気圧プラズマを使用した創傷治癒を試みた。電解水では殺菌効果が得られ、プラズマから生成される活性酸素の確認ができた。さらに、ラットを用いて皮膚欠損モデルを作製後、特定ガスを使用したプラズマで処置を行った。処置することにより治癒が早まる効果が得られた。しかしながら、再現性の検証や活性種の因果関係は不明であるため、今後の検討課題としたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創傷環境を酸性電解水で浄化して、低温プラズマ照射により細胞の活性化を促進し正常な状態へのリカバリーを促すことで創面環境を整えることを目標としていた。さらに、本技術により薬剤アレルギーをもつ患者に対しても本技術で処置できるようになることを将来展望として考えている。以上の内容より本申請書では、創傷治癒に繋がる化学と工学技術の融合による新たな治療技術の基礎研究を行えた点に関して意義あるものだと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this present study, electrolyzed water and atmospheric pressure plasma were used as new treatments for wound healing. The bactericidal effect was obtained with electrolyzed water, and the healing promoting effect was obtained by creating a rat skin defect model and treating it with plasma using a specific gas. However, there is insufficient data to establish a new model of wound healing and needs to be validated in the future.

研究分野：活性酸素研究

キーワード：創傷治癒 大気圧プラズマ 電解水 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

切り傷、火傷、外傷、床ずれによる潰瘍、血液循環不良、糖尿病などの疾患は全て皮膚の創傷の原因となり、正常な機能や皮膚の構造を一時的に損なう。身体がこれらの創傷を治癒させることができなければ慢性化し、化膿する。慢性皮膚創傷の創傷治癒促進のためには、創傷治癒を阻害する因子を取り除く Wound bed preparation (創面環境調整) と創傷治癒力を促進させるために創面を湿潤した環境に保持する Moist wound healing (湿潤環境下療法) を実践することが重要であると日本皮膚科学会ガイドラインには示されている。しかしながら、細菌感染や真菌感染を合併した汚染創については、湿潤環境を保つことで、創傷治癒を遅延させる可能性がある。近年、慢性的な皮膚感染症の難治化・慢性化の要因として Critical colonization (臨界的定着) の存在が指摘されている。Critical colonization の状態では、細菌はバイオフィームに包まれ、治癒が遅延すると考えられており慢性皮膚創傷となれば完治が難しい状態となる。排膿や悪臭を伴う明らかな感染創では消毒の抗菌作用のほうが有用になることもあり、消毒薬の効能も理解したうえで、創の状態に合わせた使い分けが必要となってくる。しかしながら、アレルギー患者などにおいては薬剤の使用は避ける必要がある。そのため、薬剤にかわる創傷環境改善方法として、NaCl 食塩水の電気分解によって得られる酸性電解水に着目した。酸性電解水は強い殺菌力を示す特性から、医療分野・歯科分野・食品分野・農業分野など様々な分野で利用されている。そこで、電解水を創面環境の清浄化に利用することを考えた。しかしながら、創面環境の早期治癒を考えた場合、酸性電解水のみでは不十分であり清浄後のケアとして創傷治癒力を促進させるための方法を考えた結果、細胞の働きを活性化させる手段として、近年研究が活発化している大気圧低温プラズマ技術に着目した。プラズマは高速電子との衝突に伴う気体分子の電離や解離により生じる反応性に富んだ粒子(電子、光、イオン、ラジカル)から構成される。低温プラズマは医療分野への応用も期待されている。また、プラズマ源から発生するラジカル種などや電気化学的刺激を含む組織表面反応が成長因子を活性化して血管新生を促進し、治癒を促進する可能性があるとの報告もあった。プラズマは使用するガスによっても発生する化学種が異なる。以上より、複合技術による創傷治癒を実現するための基礎研究として基盤技術の確立をする。

2. 研究の目的

様々な疾患により、誘発される皮膚創傷は、皮膚機能や構造を一時的に損なうことになり、身体がこれらの創傷を治癒させることができなければ慢性化し化膿する。慢性皮膚創傷の創傷治癒促進のためには、創面環境調整と湿潤環境下療法を実践することが重要である。しかしながら、細菌感染などを合併した汚染創については、湿潤環境を保つことで、創傷治癒を遅延させる可能性がある。したがって、本研究では、創傷環境改善方法として、電気分解により得られる酸性電解水の殺菌作用を用いて洗浄殺菌を行い、低温プラズマ照射による細胞活性化を行うことで、創傷面環境を改善する新しい治癒技術の構築を目的とする。

3. 研究の方法

[1] 電解水の殺菌効果の確認

創傷環境を清潔に整える方法として、電解水を利用するため、NaCl 水溶液を電気分解して電解水を作製した。性状として pH を 2-3 有効塩素濃度を 30 ppm 以下を目指して調整した。

さらに、その電解水を確認するため *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)、*Escherichia coli* (*E. coli*) を用いた。

供試菌数は 10^6 cfu/ml として、電解水に各種細菌を 15 秒接触後、それ以降の電解水の効果を無効にするため、チオ硫酸ナトリウムを添加して、その後、寒天培地に播種し 24-48 時間後のコロニーを判定した。

[2] プラズマ照射装置の開発とラジカル種の検証

創傷に処置するためにプラズマ装置を作製した(図1)。さらに、条件を検討できるように、ガス流量、印加電等を制御できよう仕様とした。またプラズマに用いるガスも変更できる仕様とした。プラズマの反応場としては水を想定しているため、プラズマ照射により生成された活性酸素種を確認した。活性酸素生成確認には、電子スピン共鳴(ESR)装置を用いた。測定法としてはDMPOをトラップ剤としたスピントラッピング法にて活性酸素種を測定した。

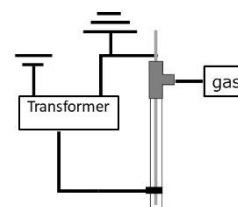


図1 装置概略図

[3] ラット全層皮膚欠損モデルと組織学的検査

ラットを使用した欠損モデル 創傷治癒効果の検証

実際に創傷に処置するため、7週齢のラットを用いて、ラット全層皮膚欠損モデルを作製した。ラット肩に1cm程度の創傷を作製した。作製日をDay 0として6日間毎日プラズマ照射を2分間行った。この際に使用したプラズマガスは活性酸素測定の結果より検討した窒素ガスプラズマとした。また、ラットの傷を2分間処置した創傷部面積をimage Jにより解析した。さらに、更に組織を取り出し組織切片を作製して染色組織学的検査を行った。

4. 研究成果

[1] 電解水の殺菌効果の確認

NaCl水溶液に電気分解して性状を確認した結果、pH 2-3、有効塩素濃度 30 ppm 以下の電解水が作製できた。この電解水に *S. aureus* に 15 秒接触させ、殺菌効果を検証した。対象として純水を用いた。接触させた時間は、15 秒と短時間であったが純水の場合は、寒天培地上にて多数コロニーが確認されたが、電解水の場合はコロニーが検出されなかった(図2)。また、*E. coli* に関しても同様な結果であった。(図3)。このことから、グラム陽性菌、陰性菌ともに本研究で用いる電解水での効果が示された。

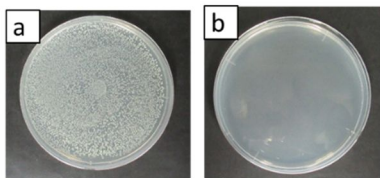


図2 *S. aureus* における a 純水と b 電解水の比較

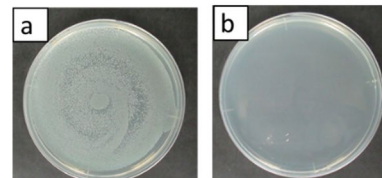


図3 *E. coli* における a 純水と b 電解水の比較

[2] プラズマ照射装置の作製と活性酸素種の検証

プラズマ装置を作製して、各種ガスを使ってプラズマ生成時の活性酸素を示した(図4) それぞれのガスプラズマと反応場である水との反応によりヒドロキシルラジカル、水素原子などが生成していることが固有の信号により確認できた。特に、アルゴンガスプラズマでは、ヒドロキシルラジカルと水素原子が確認できた。ヘリウムガスプラズマでは、主にヒドロキシルラジカル、窒素ガスの場合はヒドロキシルラジカルと水素原子が検出できた。これからそれぞれ、使用するガス種によって生成するラジカル量が異なることが確認でき、活性酸素に関しても異なることが示された。今回は特にヒドロキシルラジカルと水素原子は同程度生成されており、創傷治癒に大きく関与するNO生成も考慮し、研究計画であった次のステップの動物を使った創傷治癒における実験系においては窒素プラズマを用いることとした。

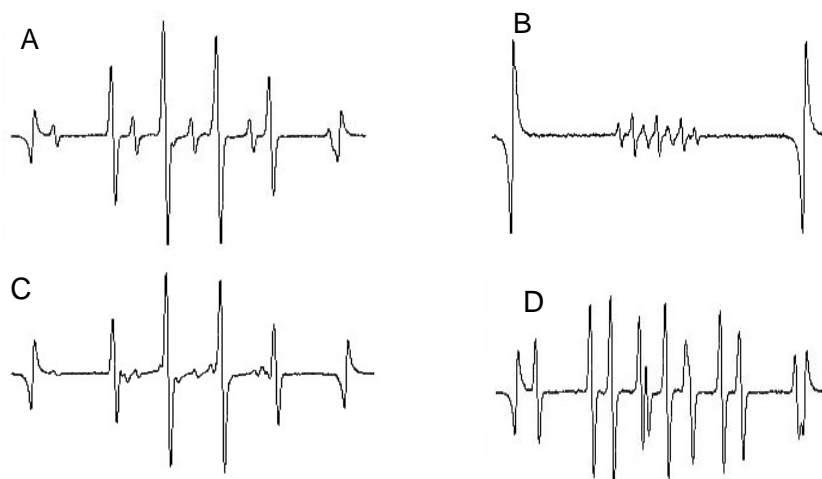


図4 A アルゴン B 窒素 C ヘリウム D 窒素

[3] ラット全層皮膚欠損モデルと組織学的検査

創傷作製日から創傷面積の経時変化を示した(図5)面積から創傷を作製後プラズマ処置後1日目では、処置ありとなしとでは変化がなかったが、処置をした2日目以降は少し変化がではじめた。ラットにおける創傷面積はプラズマ処置を行ったほうが、小さくなっていった。また、6日後では、ほぼ創傷の面積は処置ありとなしでは変化がみられない状態まで面積が小さくなっていった。

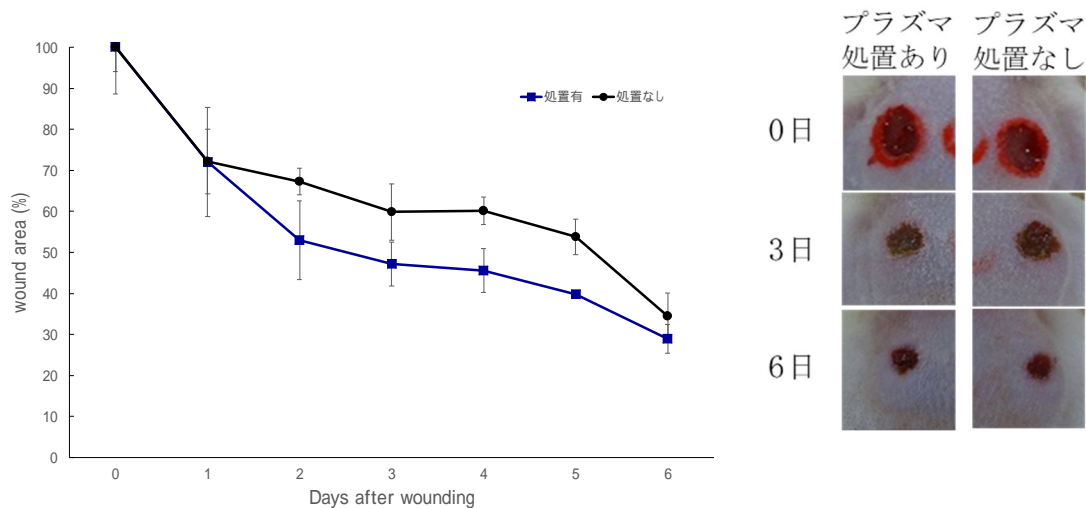


図5 プラズマ処置における創面積経時変化

さらに、組織学的検査のため、染色した結果を示す(図6)。染色はマッソントリクロム染色をおこなった。

創傷部で重要となる細胞は線維芽細胞であり、物質はコラーゲンである。一般的な創傷治癒過程は炎症期、増殖期、成熟期・再構築期を経る。炎症期では、血小板が凝縮し、創部を塞ぐ、増殖期では、表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞が増殖して、再上皮化、肉芽組織形成が起こる。成長期で、炎症細胞が減少、コラーゲンが増加し癒痕ができる。処置した組織状態の観察より、処理ありと処理無し(データ省略)では処置した方が、早い段階でコラーゲンが産生、創傷面に遊走・増殖して肉芽組織を形成がみられ、創傷治癒過程が進んでいるようであった。

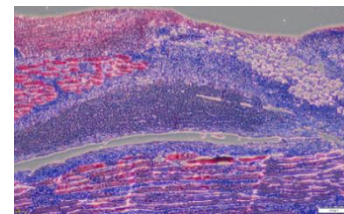


図6 プラズマ処置開始から3日後における組織状態

まとめ

本研究では創傷環境を改善する方法としての電解水を用いた殺菌検証では殺菌効果が得られた。さらに、次のステップとなる、大気圧プラズマでの検証においては、プラズマ装置を作製して、生成するラジカル種の把握、動物実験におけるプラズマ処置の検証を行うことができ、本システムで行う創傷治癒過程を構築する過程において、基礎的な知見を得ることができた。しかしながら、基盤技術確立までには研究データが不足しているため、今後より研究を進め基礎的データを収集し、発展させることにより、基盤技術の構築を行いたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyano Rei, Matsuo Hirotaka, Mokudai Takayuki, Noguchi Yoshihiko, Higo Mayuka, Nonaka Kenichi, Niwano Yoshimi, Sunazuka Toshiaki, Shiomi Kazuro, Takahashi Yoko, Omura Satoshi, Nakashima Takuji	4. 巻 129
2. 論文標題 Trichothioneic acid, a new antioxidant compound produced by the fungal strain <i>Trichoderma virens</i> FKI-7573	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 508 ~ 513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.11.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo Hirotaka, Hirose Tomoyasu, Mokudai Takayuki, Nonaka Kenichi, Niwano Yoshimi, Sunazuka Toshiaki, Takahashi Yoko, Omura Satoshi, Nakashima Takuji	4. 巻 66
2. 論文標題 Absolute structure and anti-oxidative activity of chaetochiversin C isolated from fungal strain <i>neocosmospora</i> sp. FKI-7792 by physicochemical screening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 181 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2019.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwatsu Misato, Kanetaka Hiroyasu, Mokudai Takayuki, Ogawa Toru, Kawashita Masakazu, Sasaki Keiichi	4. 巻 108
2. 論文標題 Visible light induced photocatalytic and antibacterial activity of N doped TiO ₂	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 451 ~ 459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34401	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Kanae, Yokoi Taishi, Iwatsu Misato, Furuya Maiko, Yokota Kotone, Mokudai Takayuki, Kanetaka Hiroyasu, Kawashita Masakazu	4. 巻 9
2. 論文標題 Antibacterial properties of Cu-doped TiO ₂ prepared by chemical and heat treatment of Ti metal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Asian Ceramic Societies	6. 最初と最後の頁 1448 ~ 1456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21870764.2021.1979287	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masahashi N., Mori Y., Kurishima H., Inoue H., Mokudai T., Semboshi S., Hatakeyama M., Itoi E., Hanada S.	4. 巻 543
2. 論文標題 Photoactivity of an anodized biocompatible TiNbSn alloy prepared in sodium tartrate/hydrogen peroxide aqueous solution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Surface Science	6. 最初と最後の頁 148829 ~ 148829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.apsusc.2020.148829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Shota, Zheng Yuexing, Mokudai Takayuki, Kanetaka Hiroyasu, Tachikawa Masanori, Kanzaki Makoto, Kaneko Toshiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Continuous release of O ₂ /ONOO in plasma exposed HEPES buffered saline promotes TRP channel mediated uptake of a large cation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plasma Processes and Polymers	6. 最初と最後の頁 1900257 ~ 1900257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ppap.201900257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 目代貴之 岩井邦夫 白土翠 中村圭祐 菅野太郎 庭野吉己
2. 発表標題 室内空間におけるpH調整電解水噴霧による殺菌効果
3. 学会等名 日本防菌防黴学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayuki Mokudai, Misato Iwatsu, Hiroyasu Kanetaka, Masakazu Kawashita, Keiichi Sasaki
2. 発表標題 Visible-light-induced photocatalytic activity of nitrogen-doped TiO ₂ and functionality
3. 学会等名 The 5th Symposium for the Core Research Clusters for Materials Science and Spintronics, and the 4th Symposium on International Joint Graduate Program in Materials Science (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------