

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461960

研究課題名(和文)超音波照射を用いたフリーラジカルによる創傷治癒及び創感染コントロールの検討

研究課題名(英文)Acceleration of wound healing by ultrasound activation of TiO₂ in Escherichia coli-infected wounds in mice

研究代表者

大住 幸司(Osumi, Koji)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：30296595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は低侵襲でかつ簡便な二酸化チタン・超音波法を利用した殺菌効果と創傷治癒促進効果を用い、創感染、深部感染の治療を目指すことである。Ultrasound-irradiated TiO₂ をUITと記す。非感染創ではUIT+ とUIT- で創面積に差はなかったが、CD31陽性細胞が多く見られた。感染創では創傷治癒が阻害され、CD31陽性細胞も減少することが確認された。感染創ではUITにより創傷治癒が促進され、CD31陽性細胞も増加していた。創面の菌数はUIT+ とUIT-で変化が見られず、創傷治癒の促進は血管新生促進によるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Surgical site infections continue to be a common complication affecting surgical prognosis. Reactive oxygen species (ROS) are generated by ultrasound-irradiated titanium dioxide (TiO₂) (UIT). This study investigated whether UIT can promote healing of Escherichia coli-infected wounds. We used TiO₂ and ultrasound irradiation using an ultrasonography machine at a frequency of 1.0 MHz and intensity of 0.4 W/cm². The number of cluster of differentiation 31-positive blood vessels, which are indicative of angiogenesis, was decreased by bacterial infection, and increased at the wound edges in the UIT-treated infected wounds, suggesting upregulation of neovascularization by UIT. Although UIT treatment did not decrease E. coli survival in vivo, it promoted healing of the infected wounds as evidenced by a significant decrease in the wound area in the UIT-treated mice.

研究分野：外科学

キーワード：創傷治癒 二酸化チタン 超音波

1. 研究開始当初の背景

MRSA、MDRP を代表とする多剤耐性菌の院内感染による死亡例が報告されるようになり、病棟閉鎖に追い込まれている施設も多々見られている。また、強力な毒性を示す大腸菌 O157 株による感染やレジオネラによる重症肺炎の集団発生など従来にない有害微生物による被害が大きな社会問題となっている。これらのことから、より優れた抗菌プロセスの開発が望まれている。

現在使用されている抗菌法としては、加熱や紫外線による物理的方法、塩素やアルコール、各種抗菌剤による化学的方法に大別できるが、化学的方法による殺菌では有害副産物が生成する可能性があることが一つの問題である。近年注目されている新たな抗菌法として二酸化チタン・光触媒法が挙げられる。二酸化チタンに光が当たることにより発生するフリーラジカルの酸化力を利用するものであり、幅広い抗菌スペクトルを有するとともに防汚、脱臭などさまざまな用途にも適用することが可能なことから幅広い分野での研究開発が行われている。フリーラジカルは消毒や殺菌に広く使われている塩素や次亜塩素酸、過酸化水素、オゾンなどより遙かに強い酸化力を持つとされている。しかし、紫外線や二酸化チタン・光触媒法による抗菌法では汚濁などにより水溶液中への光の透過性が低下した場合、抗菌効果が大きく低下することが問題となる。また、二酸化チタン・光触媒法では生成されるフリーラジカルが多い反面、超音波と比較し低波長の光自身の細胞障害性が懸念されるため、従来の物理的方法、化学的方法ともに生体への応用が困難である。

近年、金沢大学清水宣明教授らにより、光の代わりに超音波を利用する方法、二酸化チタン・超音波照射法が見出された(図1)。二酸化チタンは触媒として働いて自身は変化しないため、原理的には半永久的に使

用でき、また、二酸化チタンは安全無害な物質であるため生体には非常に安全であることが特徴である。また、超音波自身の細胞障害性が低いことも考え合わせると、二酸化チタン・超音波照射法は生体の感染治療にはより適したものであると考えられる。

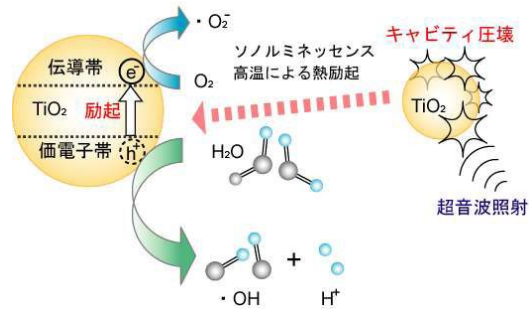


図1 二酸化チタン・超音波照射法概念図

反応性の高いフリーラジカルはその生存期間が数十ナノ秒と極端に短い特徴がある。そのため、二酸化チタン・超音波照射法の抗菌効果は二酸化チタン表面に局限される。二酸化チタンを目的物質に直接接触させる必要があるが、感染創に直接チタンを塗布し超音波を当てることは可能であり、深部感染には二酸化チタンを含有した液体を注入することにより、感染部位に直接チタンを触れさせることができる。また、超音波は光と比べ、浸透距離が長いことが特徴であるため、光の到達しない範囲での二酸化チタン・超音波照射法による抗菌効果は生体において大いに効果が期待できる。また、二酸化チタン・超音波照射法での創傷治癒に関しては、殺菌だけではなく、創傷治癒を促進する因子が関与していることも考えられている。我々は大腸菌によるマウス創感染モデルを有している。その感染モデルを用い、二酸化チタン・超音波照射法による創感染に対する治療効果に関しての予備実験は始まっており、現在までのところ二酸化チタン・超音波照射法により感染創の改善効果が期待される結果が得られている。しかし創面の大腸菌数減少は明らかではなかったため、感染創の改善効果の原

理に関しては殺菌だけによるものではなく、治癒を促進している何らかの因子が関与していることが予想される。免疫染色などを用いその原理を解明することは、感染を伴わない虚血性皮膚潰瘍などの治療にも応用が期待でき、興味深い。

2. 研究の目的

本研究の目的は低侵襲でかつ簡便な二酸化チタン・超音波法を利用したフリーラジカルや免疫賦活作用による殺菌効果と創傷治癒促進効果を用い、創感染、深部感染の治療を目指すとともに、チタンを封入したドレーンを用い、ドレーン刺入部感染の予防法を確立し、感染を伴わない虚血性皮膚潰瘍などの治療への応用も視野に入れそのメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

in vitro における超音波の条件設定では、まず伊藤超短波の US-710 (1MHz) を用いて、二酸化チタンナノ粒子によってフリーラジカルが発生することを確認した。次に 1.5×10^8 CFU/mL、3ml を用いて超音波そのもののみでは大腸菌の生存に影響のない超音波の照射条件の探索を行った。

創感染モデルは 6 週齢 BALB/cAnNCrICrIj マウスの背部の皮膚全層を切除し、筋層に大腸菌に 2 時間浸したバイクリルを 3 針縫合後、皮膚を閉鎖し大腸菌を繁殖させることによって作製した。創面に 5mg/ml の二酸化チタンを 100 μ l 塗布し、伊藤超短波の US-710 (1MHz) を用いて超音波を照射した。1、3、5、7 日目に創のサイズを測定し、1.術後創感染 (-) TiO₂ (-) US (-) 2.術後創感染 (+) TiO₂ (-) US (-) 3.術後創感染 (+) TiO₂ (-) US (+) 4.術後創感染 (+) TiO₂ (+) US (-) 5.術後創感染 (+) TiO₂ (+), US (+) の 5 群で総面積の比較を行い、7 日後の皮膚を採取して免疫染色を行った。

4. 研究成果

Ultrasound-irradiated TiO₂ を UIT と記す。最適な超音波照射量を決定するため大腸菌に in vitro において 0.25, 0.5, 0.75, and 1.0 W/cm² 10 分間超音波照射したところ、0.75 と 1.0 W/cm² での生存率はそれぞれ 40.0% と 2.6% であった (図 2A)。 ≤ 0.5 W/cm² 以下が超音波のみで影響のない照射量と考えられ、以後の実験では 0.4 W/cm² を採用した。また、30 秒と 10 分の UIT では、大腸菌の生存率に差がなかった (図 2B)。PET シートに二酸化チタンを結合させたものに、超音波を照射し、ROS の発生を確認した (図 2C)。

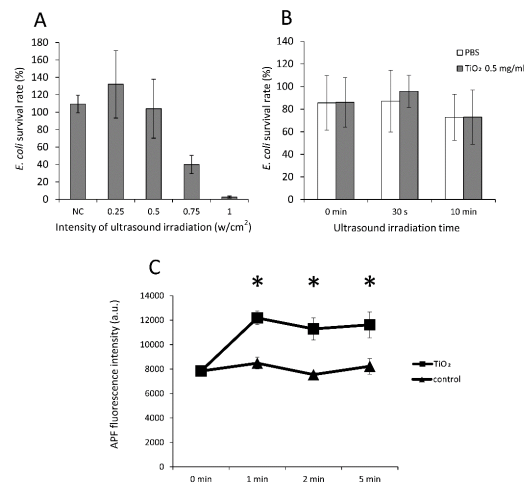


図 2

非感染創では初日の創面積は 340.8 ± 43.9 mm²、7 日目は UIT+ と UIT- でそれぞれ $27.9 \pm 9.4\%$ と $32.5 \pm 6.7\%$ で差はなかった (図 3A)。しかし CD31 陽性細胞は UIT+ (65.9 ± 5.2) で UIT- (5.8 ± 8.4) より多かった (< 0.05) (図 3B)。

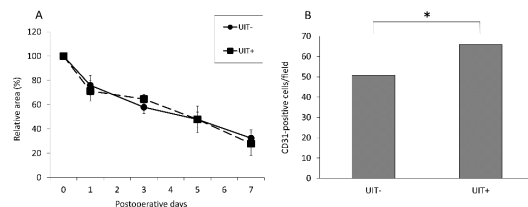


図 3

非感染創と感染創の比較では初日の創面積は $256.8 \pm 35.6 \text{ mm}^2$ で、7 日目はそれぞれ $32.5\% \pm 6.7\%$ と $74.6\% \pm 15.4\%$ で感染により創傷治癒が阻害され (図 4A)、CD31 陽性細胞も減少することが確認された。(図 4B)。

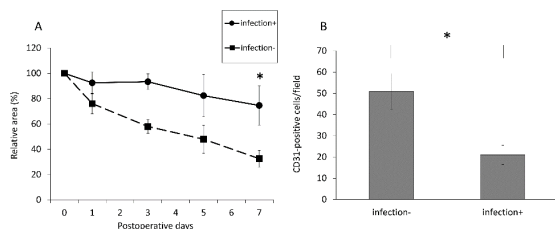


図 4

感染創では初日の創面積は $255.0 \pm 48.3 \text{ mm}^2$ 、7 日目では UIT+ $34.8\% \pm 13.3\%$ 、UIT- で $74.6\% \pm 15.4\%$ と創傷治癒が促進され (図 5A)、CD31 陽性細胞も増加していた (図 5B)。

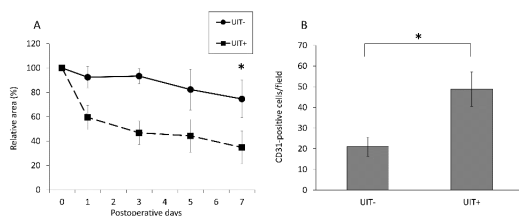


図 5

創面の菌数は UIT+ と UIT- で変化が見られず、創傷治癒の促進は血管新生促進によるものと考えられた。

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〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大住 幸司 (Koji Osumi)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号: 30296595

(2) 研究分担者

板野 理 (Osamu Itano)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 90265827

尾原 秀明 (Hideaki Obara)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 20276265

松田 祐子 (Sachiko Matsuda)
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号: 90534537

(3) 連携研究者

なし