

3.分担研究報告

課題 2

バイオフィーム感染を伴う創における創傷管理、 脂肪酸カリウム洗淨の有用性の検討

- ・福岡大学 医学部寄付研究連携形成外科学 創傷再生学講座 教授 秋田 定伯 (責)
- ・シャボン玉石けん株式会社 代表取締役社長 森田 隼人

Kawahara T, Takita M, Masunaga A, Morita H, Tsukatani T, Nakazawa K, Go D, Akita S. Fatty Acid Potassium Had Beneficial Bactericidal Effects and Removed *Staphylococcus aureus* Biofilms while Exhibiting Reduced Cytotoxicity towards Mouse Fibroblasts and Human Keratinocytes. Int J Mol Sci. 2019 Jan 14;20(2). pii: E312. doi: 10.3390/ijms20020312.

【はじめに】

創傷がもたらす医療費コストの増大は社会問題化しており、中でも慢性期褥瘡、糖尿病性足潰瘍など慢性創傷は70%の患者が1年以内に再発・再燃し、機能上のみならず生活の質にも影響が及んでいる。中でも下肢慢性創傷は重篤化することが多く、特に糖尿病性足潰瘍 (DFU) は費用が多額になりがちで、疾患数が増大している。創傷はしばしば細菌感染し、中でも黄色ブドウ球菌はバイオフィーム形成することで知られているが、患者のみならず周囲の医療従事者にも感染するため、医療施設での感染原因となる。またクロストリジウム・ディフィシル菌 (*Clostridium difficile*) は芽胞形成するため一般の抗菌剤投与に治療抵抗性を持つ。一方で外科手術の合併症である外科手術部位感染 (Surgical site infection, SSI) がひとたび引き起こると、入院期間の延長や医療費コストの増大に繋がるため、事前の抗菌剤を用いた洗淨またはシャワーが推奨されている。眼瞼手術の洗淨においてベビーシャンプーを用いるとポピドンヨードまたはイソプロピルアルコールと同等の効果があると前向き、ランダム化試験で報告されており、クロルヘキシジングルコネート (CHG) を用いた局所洗淨が、中央輸液ルート感染、術後感染、バンコマイシン抵抗性腸炎 (Vancomycin-resistant enterococci, VRE) またはメチシリン抵抗性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 感染を軽減化すると報告されているが、洗淨剤の効果と安全性についてシステマティックレビューでは検討されていない。CHG の効果は抗菌剤単独との比較で検討されており、CHG と入浴、CHG と他の洗淨剤 (例えば石けん) の術後感染に対する影響では CHG の利用が必ずしも効果的ではないとの結論となっている。また外科集中室では、毎日の石けんを用いた洗淨が中央輸液ライン感染に対して CHG と同様効果を示しており、また CHG は MRSA への効果はないことが報告されて

いる。消毒と MRSA、バイオフィルム形成 MRSA など病原体の除去は、感染防止に重要であり、今回、防腐剤、保存剤、添加物などを含まない無添加石けんの重要構成成分である脂肪酸カリウムが MRSA などの病原体除去性能と正常細胞への低傷害性を示すかを検討したので報告する。

【方法】

1. 溶液

ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸及びグルタルアルデヒドは Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) 社から購入した。カプリル酸、カプリン酸、リノール酸、ラウリル硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム、リン差水素二ナトリウム十二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4)、塩化カリウム、水酸化カリウム、塩酸、塩化マンガン(II)四水和物 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、硫酸鉄七水和物 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、寒天、クリスタルバイオレット、Hanks 液 (Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (+))、99.5%エタノールは富士フィルム和光純薬 (FUJIFILM WAKO pure chemical corporation) (大阪、日本) から購入した。ラウリルエーテル硫酸ナトリウムは日本油脂 (東京、日本) から購入した。Dulbecco リン酸緩衝液 (Dulbecco' s phosphate-buffered saline, D-PBS(+))の調製試薬 (100 倍 Mg, Ca)、ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum) は各々ナカライテスク (京都、日本)、サーモフィッシュヤーサイエンティフィック社 (東京、日本) から購入した。ウェルパス® (0.2%アルコール基材の消毒薬) は丸石製薬 (大阪、日本) から購入した。

2. 細胞毒性試験に使用する洗浄剤

8 種の脂肪酸、カプリル酸カリウム (C8K)、カプリン酸カリウム (C10K)、ラウリン酸カリウム (C12K)、ミリスチン酸カリウム (C14K)、パルミチン酸カリウム (C16K)、ステアリン酸カリウム (C18K)、オレイン酸カリウム (C18:1K)、リノール酸カリウム (C18:2K) と合成洗浄剤としてラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) とラウリル硫酸ナトリウム (SLS) を細胞毒性試験に使用した。

カルシウム (Ca) 及びマグネシウム (Mg) を含有する D-PBS (+) または HBSS (+) 緩衝液を脂肪酸溶液調製に使用した。8 種の脂肪酸塩 (0.5 mM) は全ての各々の脂肪酸を水酸化カリウムと D-PBS (+) または HBSS (+) 緩衝液で 80 °C で溶解し、水酸化カリウムを添加して pH 10.4 に調整した。ラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) とラウリル硫酸ナトリウム (SLS) (0.5 mM) は D-PBS (+) または HBSS (+) 緩衝液で希釈して最終 pH は 7.7 に調整した。

3. 殺菌試験に使用する洗浄剤

オレイン酸カリウム (C18:1K) を殺菌試験に使用した。オレイン酸 (315 mmol) と純水を加温攪拌し、等モル量の水酸化カリウムを添加し、80 °Cで1時間加温する事で、オレイン酸をオレイン酸カリウム (C18:1K) に転換させた。最終的に 315 mM の水溶液に水酸化カリウムを添加して、pH を 10.4 に調整した。アルコール基材の消毒液は添付書通りに使用した。

4. バイオフィーム除去試験に使用した洗浄剤

カプリル酸カリウム (C8K)、カプリン酸カリウム (C10K)、ラウリン酸カリウム (C12K)、オレイン酸カリウム (C18:1K)、リノール酸カリウム (C18:2K) と合成洗浄剤としてラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) とラウリル硫酸ナトリウム (SLS) をバイオフィーム除去試験に使用した。

使用した脂肪酸塩は全て 31.2 mM であり、脂肪酸と水酸化カリウムを 80 °Cの純水と混和して調製し、その後水酸化カリウムを用いて pH を 10.4 に調整した。ラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) とラウリル硫酸ナトリウム (SLS) は各々 31.2 mM であり、純水で希釈して調製した。

最終的にラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) の pH は 4.2、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) の pH は 7.0 となった。

5. 細胞培養

マウス永久繊維芽細胞株、BALB/3T3 Clone A31 (JCRB Cell Bank、東京、日本 JRB9005) は、DMEM 溶液 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) に 10%ウシ胎児血清、100 U/mL ペニシリン (Meiji Seika ファルマ、東京、日本)、100 μ g/mL ストレプトマイシン (Meiji Seika ファルマ、東京、日本) を添加したもので培養した。ヒト初代ケラチノサイト細胞、NHEK-Ad (Lorenza Japan Ltd., 東京、日本) は、KBM-Gold 培地 (Lorenza Japan) で培養した。96-ウェル Nunc MicroWell microplate (サーモフィッシャーサイエンティフィック) に 1×10^4 ずつ、5%CO₂ 37 °Cで BALB/3T3 細胞は 24 時間、NHEK-Ad 細胞は 48 時間培養した。

6. 細胞毒性試験

LDH 溶出率と細胞生存率を合わせて、細胞毒性を検討した。BALB/3T3 細胞は 100 μ L/ウェルで 24 時間培養後、0.5 mM の試験脂肪酸カリウム及び対照として、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) とラウリル硫酸ナトリウム (SLS) で室温にて 5 分間処理し、未処理対照として、D-PBS(+) 処理の細胞が用いられた。

各ウェルから、LDH 溶出率アッセイのために溶液を採取し、培地で 5 回洗浄後 24 時間培養した。培養後、BALB/3T3 細胞は培地で 5 回洗浄し、細胞生存率を測定した (図 1)。

NHEK-Ad 細胞は 100 μ L/ウェルで 48 時間培養し、0.5 mM のカプリル酸カリウム

(C8K)、ラウリン酸カリウム (C12K)、オレイン酸カリウム (C18:1K)、リノール酸カリウム (C18:2K) 及び対照として、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) とラウリル硫酸ナトリウム (SLS) で 5 分間室温にて処理した、HBSS(+)培地で処理した細胞を未処理対照とした。試験群及び対照群とも LDH 溶出率アッセイの溶液採取後、3 回培地で洗浄し、細胞生存率を測定した (図 2)。LDH 溶出率及び細胞生存率測定は、各々細胞毒性 LDH アッセイキット-WST (同仁化学研究所、熊本、日本) と細胞計測キット-8 (同仁化学研究所、熊本、日本) を用いた。

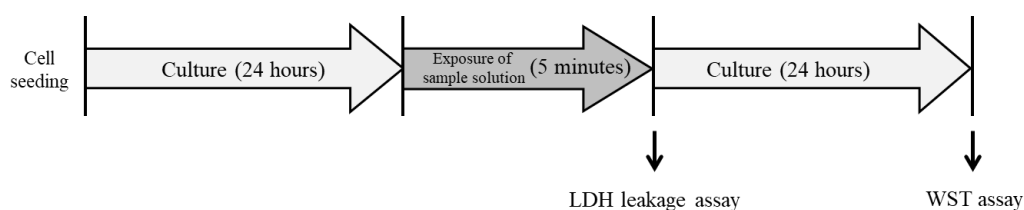


図 1 BALB/3T3 細胞毒性試験

BALB/3T3 細胞は DMEM 培地で 24 時間培養後に、1 ウェルあたり 100 μ L ずつの各々の溶液で 5 分間処理実験した。各ウェルから LDH 溶出率アッセイ用に溶液を採取後、更に 24 時間培養後 WST-8 アッセイで細胞生存率を測定した。

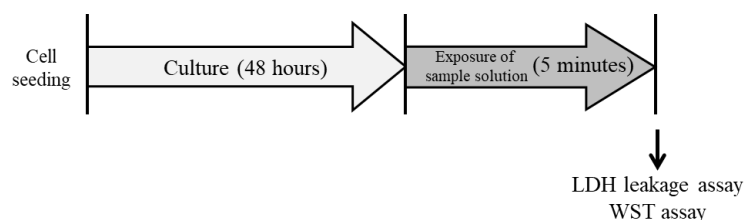


図 2 NHEK-Ad 細胞毒性試験

NHEK-Ad 細胞は KGM-Gold 培地で 48 時間培養後に、1 ウェルあたり 100 μ L ずつの各々の溶液で 5 分間処理実験した。各ウェルから LDH 溶出率アッセイ用に溶液を採取後、直ちに WST-8 アッセイで細胞生存率を測定した。

7. 細胞懸濁液の準備

大腸菌、NBRC3972、黄色ブドウ球菌、NBRC12732、セレウス菌、NBRC15305、は製品評価技術基盤機構 (東京、日本) から購入し、クロストリジウム・ディフィシル、ATCC9689、は関東化学株式会社 (東京、日本) から購入した。

大腸菌と黄色ブドウ球菌はソイビーンカゼインダイジェスト培地 (SCDA 日水製薬株式会社、東京、日本) 上で 30-35 $^{\circ}$ C で、18-24 時間培養した。コロニーのいくつかは、トリプチケースソイブロス (TSB、ビオメリュージャパン、東京、日本) 10 mL に取り込み、35 $^{\circ}$ C で 18-24 時間攪拌培養した。各々の細菌の懸濁液は純水を加え 10^7 - 10^8

CFU/mL に希釈した。

セレウス菌とクロストリジウム・ディフィシルの培地は、784 mL のイオン交換水を 32 g のトリプチケースソイ寒天培地 (TSA、ビオメリュージャパン) に添加して調製し、オートクレーブ滅菌後 50°C で維持した。次いで、0.306 g の塩化マンガン(II) 四水和物、2.5 g の硫酸マグネシウム七水和物、0.003 g の硫酸鉄七水和物を 0.01 mol/L 塩酸 100 mL に溶かした溶液 8 mL と、1.5 g 塩化カルシウム二水和物を 0.01 mol/L 塩酸 100 mL に溶かした溶液 8 mL を添加して混合した。セレウス菌とクロストリジウム・ディフィシルは 30–35 °C で芽胞が出現するまで分離培養し、その後、純水を加え懸濁液は細菌スプレッダーで拡散させて調製した。懸濁液は 75 °C、15 分間加温し、その後急激に冷却した後、純水で 10^7 – 10^8 CFU/mL に希釈した。

8. 殺菌試験

殺菌試験は、室温で 20 mL のオレイン酸カリウムまたはアルコール消毒液と 0.2 mL の細菌懸濁液を混合して実施した。混合後 1, 5, 10 分後に検体を採取し、100 倍量のソイカゼインダイジェストレンチンポリソルベート培地 (SCDLP) (栄研化学株式会社、東京、日本) で中和希釈した。10 倍希釈の大腸菌、黄色ブドウ球菌、セレウス菌はソイビーンカゼインダイジェスト培地 (SCDA) 上で 30–35 °C、40–48 時間培養した。10 倍希釈のクロストリジウム・ディフィシルはコロンビア寒天培地プレート上で 30–35 °C、48–72 時間培養した。コロニー数は CFU/mL と表現し、殺菌活性は、純水処理の場合と比較した log CFU の減少量で計測した。

9. バイオフィーム形成

MRSA (OJ-1, ATCC No. BAA-2856™) は自見至郎博士 (福岡大学病態構造系総研) から譲渡され、傾斜トリプチケースソイ寒天培地 (TSA) で 37 °C、24 時間培養した。コロニーのいくつかは、トリプチケースソイブロス (TSB) を用いて 600 nm の吸光度が 0.1 となるよう希釈し、1 mL の調製した懸濁液を、12 ウェル培養プレート (Corning Inc., Corning, New York, USA) で 37 °C、24 時間培養し、バイオフィームを形成させた。得られたバイオフィームを生理食塩水で洗浄し、浮遊細胞を除去した。

10. バイオフィーム除去試験

バイオフィーム除去率を計測するため、1 mL の試験検体をバイオフィームに室温で 1 分間接触させた。浮遊細胞を除去するため、生理食塩水で 3 回洗浄した後、ウェル内のバイオフィームを 0.1 %クリスタルバイオレットで 1 時間染色した後、生理食塩水で 2 度洗浄した。エタノールで脱色後、残留したバイオフィームを、SynergyH4 ハイブリッドマルチモードマイクロプレートリーダー (BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA) を用いて 570 nm の吸光度で定量した。

バイオフィルム除去率は以下の公式で求めた（全て吸光度）。

$$\text{バイオフィルム除去率(\%)} = \frac{(\text{対照-ブランク}) - (\text{実験-ブランク})}{(\text{対照-ブランク})} \times 100$$

11. 走査電顕でのバイオフィルム構造

培養皿（Corning 社）から 8 mm×8 mm 大の試験片を採取し、滅菌試験片を 12 ウェル培養プレートに移植し、調製した細菌懸濁液（1.5 mL）を各ウェルに添加し、37 °C、24 時間培養してバイオフィルムを形成させた。バイオフィルム除去試験を、この試験片を用いて上記の方法で実施した。バイオフィルムを生理食塩水で洗浄し、緩く接着した細胞を除去した。2.0%グルタルアルデヒド溶液を用いて、4 °C、2 時間固定した。更にバイオフィルムを、アルコール濃度を徐々に上昇させ 99.5%にして脱水し、一晚空気乾燥させ、白金/パラジウムイオンコートして走査電顕観察した。走査電顕はミニスコープ TM-1000（Hitachi、東京、日本）を用いた。

12. 統計解析

データは平均±標準偏差で示した。LDH 溶出率アッセイと WST-8 アッセイには反復分散分析を用い、バイオフィルム除去試験には Student t 検定を用いた。p<0.05 を統計学的有意とした。

【結果】

1. 脂肪酸カリウムと合成洗剤との構造上の比較

本研究では、種々の脂肪酸カリウムと、対照品の合成洗剤として、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム（SLES）とラウリル硫酸ナトリウム（SLS）を用いた（図 3）。

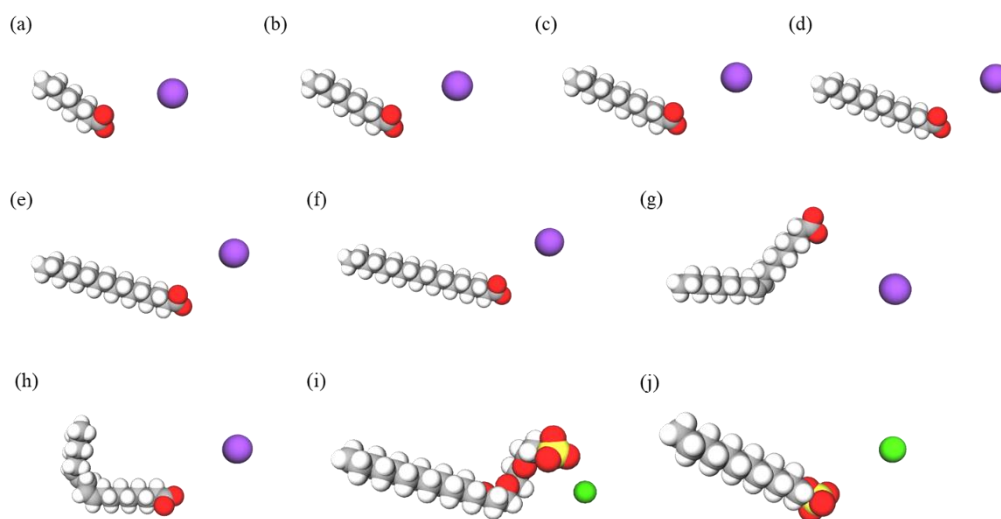


図3 脂肪酸カリウムと合成洗剤の分子構造

a) カプリル酸カリウム (C8K)、b) カプリン酸カリウム (C10K)、c) ラウリン酸カリウム (C12K)、d) ミリスチン酸カリウム (C14K)、e) パルミチン酸カリウム (C16K)、f) ステアリン酸カリウム (C18K)、g) オレイン酸カリウム (C18:1K)、h) リノール酸カリウム (C18:2K)、i) SLES、j) SLS。炭素鎖はグレー、水素は白、硫酸は赤、カリウムイオンは紫、ナトリウムイオンは緑で示した。

2. 細胞毒性試験

細胞毒性試験として、乳酸脱水素酵素 (LDH) 溶出率アッセイを実施し、細胞生存率はテトラゾリウムアッセイ (WST-8 アッセイ) で測定した。

2-1. LDH 溶出率

5 分間の脂肪酸カリウム処理の BALB/3T3 細胞は、SLES または SLS 処理の BALB/3T3 細胞と比較して、未処理対照との百分率比で有意に低い LDH 溶出率を示した (カプリル酸カリウム (C8K) は $104.1 \pm 3.3\%$ 、カプリン酸カリウム (C10K) は $100.2 \pm 3.3\%$ 、ラウリン酸カリウム (C12K) は $103.9 \pm 3.5\%$ 、ミリスチン酸カリウム (C14K) は $104.9 \pm 3.6\%$ 、パルミチン酸カリウム (C16K) は $105.8 \pm 3.2\%$ 、ステアリン酸カリウム (C18K) は $111.0 \pm 3.3\%$ 、オレイン酸カリウム (C18:1K) は $108.9 \pm 10.2\%$ 、リノール酸カリウム (C18:2K) は $107.0 \pm 3.2\%$ であり、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) は $720.6 \pm 45.8\%$ 、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) は $523.4 \pm 61.4\%$ であった (試験脂肪酸カリウムと SLES 及び SLS は全て $p < 0.01$) (図 4)。

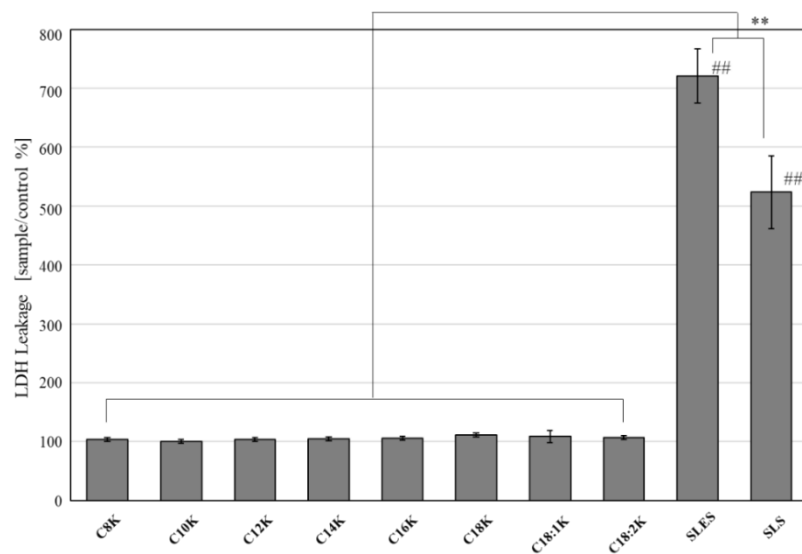


図4 BALB/3T3細胞のLDH溶出率

5分間処理直後のBALB/3T3細胞のLDH溶出率を、未処理対照との百分率比で、脂肪酸カリウム、SLES、SLSで比較した。 $** p < 0.01$, $##$ 未処理対照に対して $p < 0.01$ 。

5分間の脂肪酸カリウム処理のNHEK-Ad細胞は、SLES処理のNHEK-Ad細胞と比較して、未処理対照との百分率比で有意に低いLDH溶出率を示した(カプリル酸カリウム(C8K)は $49.2 \pm 7.4\%$ 、ラウリン酸カリウム(C12K)は $75.3 \pm 8.4\%$ 、オレイン酸カリウム(C18:1K)は $116.6 \pm 23.4\%$ 、リノール酸カリウム(C18:2K)は $58.5 \pm 8.6\%$ であり、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム(SLES)は $442.3 \pm 15.5\%$ 、ラウリル硫酸ナトリウム(SLS)は $96.5 \pm 9.5\%$ であった(試験脂肪酸カリウムとSLESは全て $p < 0.01$))(図5)。

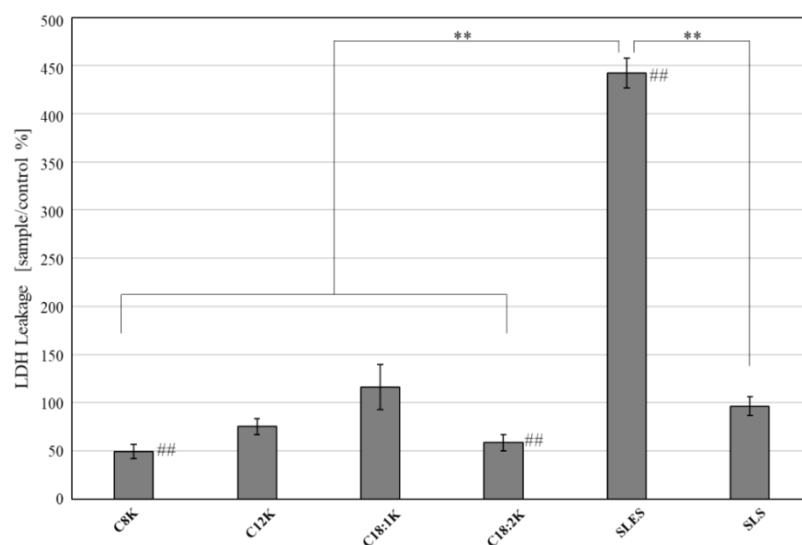


図5 NHEK-Ad細胞のLDH溶出率

5 分間処理直後の NHEK-Ad 細胞の LDH 溶出率を、未処理対照との百分率比で、脂肪酸カリウム、SLES、SLS で比較した。****** $p < 0.01$, **##** 未処理対照に対して $p < 0.01$ 。

2-2. 細胞生存率

WST-8 アッセイでは、24 時間の培養後、5 分間の脂肪酸カリウム処理の BALB/3T3 細胞は、SLES または SLS 処理の BALB/3T3 細胞と比較して、未処理対照との百分率比で有意に高い細胞生存率を示した（カプリル酸カリウム (C8K) は $114.4 \pm 8.7\%$ 、カプリン酸カリウム (C10K) は $109.9 \pm 12.7\%$ 、ラウリン酸カリウム (C12K) は $111.5 \pm 10.7\%$ 、ミリスチン酸カリウム (C14K) は $111.5 \pm 12.0\%$ 、パルミチン酸カリウム (C16K) は $104.8 \pm 15.4\%$ 、ステアリン酸カリウム (C18K) は $102.0 \pm 10.7\%$ 、オレイン酸カリウム (C18:1K) は $102.8 \pm 13.4\%$ 、リノール酸カリウム (C18:2K) は $108.0 \pm 10.6\%$ であり、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) は $30.1 \pm 4.8\%$ 、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) は $18.1 \pm 0.6\%$ であった（試験脂肪酸カリウムと SLES 及び SLS は全て $p < 0.01$ ）（図 6）。

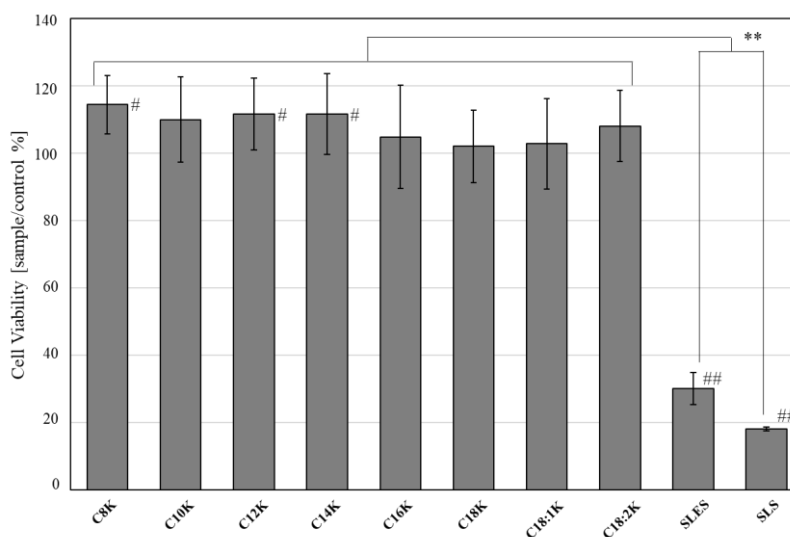


図 6 BALB/3T3 細胞の細胞生存率

5 分間処理後に 24 時間培養した BALB/3T3 細胞の生存率を、未処理対照との百分率比で、脂肪酸カリウム、SLES、SLS で比較した。****** $p < 0.01$, **#** 未処理対照に対して $p < 0.05$, **##** 未処理対照に対して $p < 0.01$ 。

48 時間の培養後、5 分間の脂肪酸カリウム処理の NHEK-Ad 細胞は、SLES または SLS 処理の NHEK-Ad 細胞と比較して、未処理対照との百分率比で有意に高い細胞生存率を示した（カプリル酸カリウム (C8K) は $92.8 \pm 13.7\%$ 、ラウリン酸カリウム (C12K) は $95.9 \pm 7.1\%$ 、オレイン酸カリウム (C18:1K) は $110.7 \pm 8.1\%$ 、リノール酸カリウム (C18:2K) は $92.9 \pm 11.3\%$ であり、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) は $31.5 \pm 1.3\%$ 、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) は $56.0 \pm 6.4\%$ であった（試験脂肪酸カリウム

と SLES 及び SLS は全て $p < 0.01$) (図 7)。

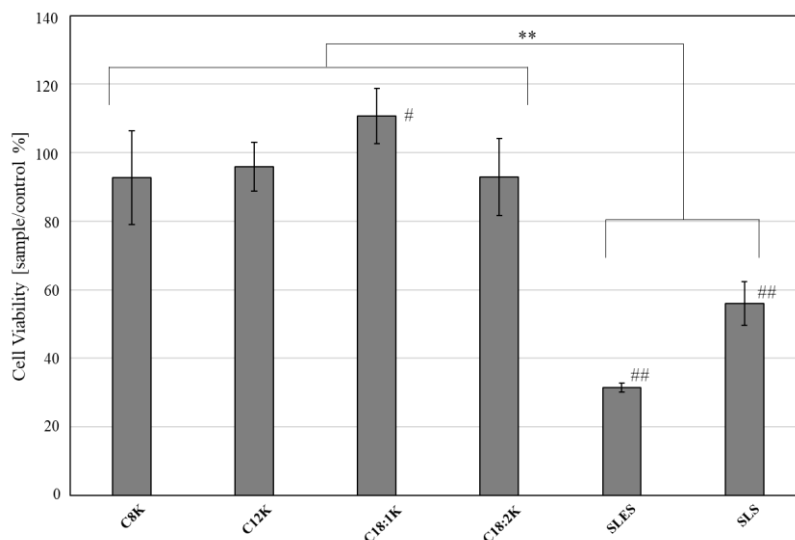


図 7 NHEK-Ad 細胞の細胞生存率

5 分間処理直後の NHEK-Ad 細胞の生存率を、未処理対照との百分率比で、脂肪酸カリウム、SLES、SLS で比較した。 $** p < 0.01$, # 未処理対照に対して $p < 0.05$, ## 未処理対照に対して $p < 0.01$ 。

3. 殺菌試験

脂肪酸カリウム (特にオレイン酸カリウム (C18:1K)) とアルコール基材の消毒剤とを細菌懸濁液を用いて、10 分間試験した。

黄色ブドウ球菌に対しては、オレイン酸カリウムはアルコール基材の消毒剤と比較して、1 分間では殺菌率が有意に低かった (1.7 ± 0.9 対 $>4.5 \pm 0.3$ log コロニー形成ユニット (CFU) /mL, $p < 0.05$)。しかし、5 分間~10 分間では脂肪酸カリウムもアルコール基材消毒剤も同様の殺菌効果を示した。

セレウス菌に対しては、オレイン酸カリウムもアルコール基材の消毒剤も 1 分間~10 分間で同様の殺菌効果を示した (≤ 0.3 log CFU/mL)。

クロストリジウム・ディフィシルに対しては、オレイン酸カリウムはアルコール基材の消毒剤と比較して、一貫して有意に高い殺菌効果を有した (1 分では $>2.4 \pm 0.5$ 対 0.4 ± 0.2 , $p < 0.05$; 5 分では $>2.4 \pm 0.5$ 対 0.5 ± 0.3 , $p < 0.05$; 10 分では $>2.4 \pm 0.5$ 対 0.5 ± 0.2 , $p < 0.01$) (表 1)。

表 1 オレイン酸カリウムとアルコール系消毒剤の殺菌効果

抗菌テストは 0.2 mL の各細菌の懸濁液を 20 mL のそれぞれの試験物質と混合して実施した。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。

| | C18:1K (log(CFU/mL)) | | | Alcohol disinfectant (log(CFU/mL)) | | |
|------------------------------|----------------------|-------------|--------------|------------------------------------|------------|------------|
| | 1 min | 5 min | 10 min | 1 min | 5 min | 10 min |
| <i>Escherichia coli</i> | 3.3 (0.4) | >4.3 (0.2) | >4.3 (0.2) | >4.3 (0.2) | >4.3 (0.2) | >4.3 (0.2) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1.7 (0.9) * | >4.4 (0.1) | >4.4 (0.2) | >4.5 (0.3) | >4.4 (0.3) | >4.4 (0.2) |
| <i>Bacillus cereus</i> | 0.2 (0.2) | 0.2 (0.3) | 0.3 (0.3) | 0.1 (0.2) | 0.2 (0.3) | 0.2 (0.4) |
| <i>Clostridium difficile</i> | >2.4 (0.5)* | >2.4 (0.5)* | >2.4 (0.5)** | 0.4 (0.2) | 0.5 (0.3) | 0.5 (0.2) |

4. バイオフィーム形成 MRSA への効果

4-1 クリスタルバイオレットアッセイ

バイオフィームに以下 5 種類の脂肪酸（カプリル酸カリウム (C8K)、カプリン酸カリウム (C10K)、ラウリン酸カリウム (C12K)、オレイン酸カリウム (C18:1K)、リノール酸カリウム (C18:2K)）またはラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES)、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) を 1 分間暴露させた後、0.1%クリスタルバイオレットで染色して定量した。対照との百分率比で、オレイン酸カリウム (C18:1K) は $90.3 \pm 2.9\%$ であり、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES、 $74.8 \pm 9.7\%$, $p < 0.01$) やラウリル硫酸ナトリウム (SLS、 $78.0 \pm 7.7\%$, $p < 0.05$) よりも有意にバイオフィーム形成 MRSA 除去能が高かった。また、カプリル酸カリウム (C8K) は $89.3 \pm 3.3\%$ であり、SLES ($p < 0.01$) や SLS ($p < 0.05$) よりも有意にバイオフィーム形成 MRSA 除去能が高かった (図 8)。

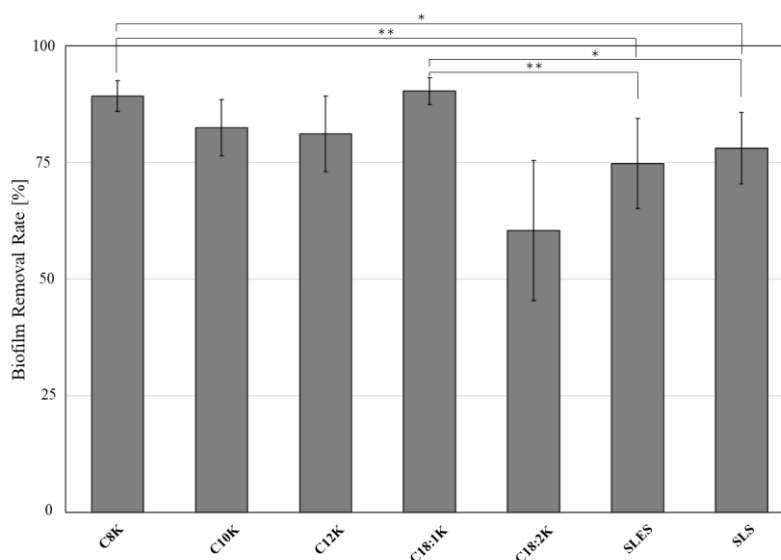


図 8 バイオフィーム形成 MRSA 除去率

バイオフィーム形成 MRSA, OJ-1, の除去率を、未処理対照との百分率比で、脂肪酸カリウム、SLES、SLS で比較した。バイオフィーム形成したものを各処理に 1 分間暴露し、ウェルに残留したバイオフィームを 0.1%クリスタルバイオレットで染色し、570 nm の吸光度によりマイクロプレートリーダーで定量化した。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。

4-2 オレイン酸カリウム (C18:1K) 処理後の電顕像

24 時間培養後に形成された MRSA のバイオフィルムに、1 分間のオレイン酸カリウム (C18:1K) 処理をすると、走査電顕像ではバイオフィルムがほぼ完全に消失した (図 9)。

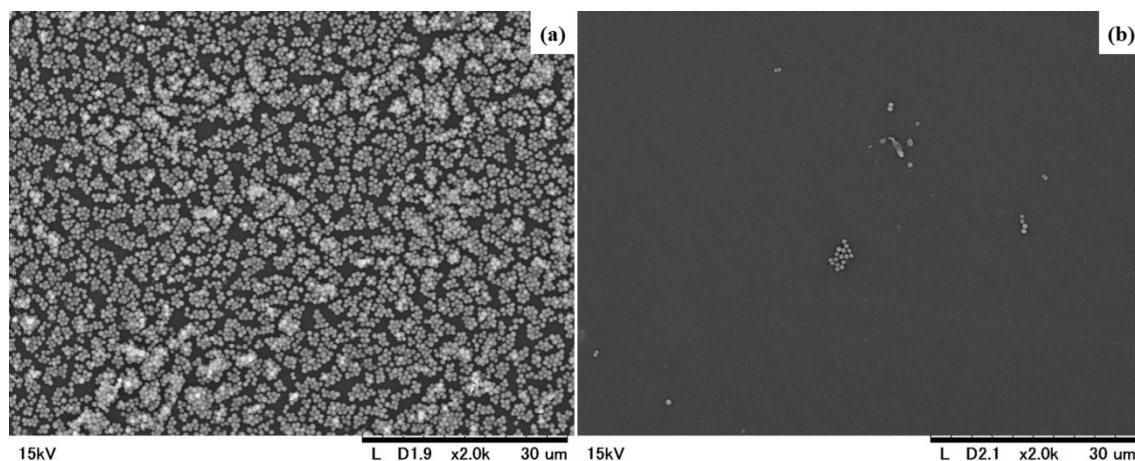


図 9 処理前後の電顕像

(a) 未処理の像、(b) オレイン酸カリウム (C18:1K) 処理した像。37 °C、24 時間培養後に形成された MRSA のバイオフィルム像はオレイン酸カリウム (C18:1K) での 1 分間処理でほぼ完全に消失した。

【討論】

消毒剤、殺菌剤は二次耐性を引き起こし効果が無くなることがあるため、創感染の治療には有効な方法を考慮すべきである。生体適合性、非イオン性、完全水溶性のポリマー基材ドレッシングは緑膿菌などのグラム陰性菌に直接作用し、創傷治癒を促進する。特に、脂質ベースの緑膿菌と黄色ブドウ球菌の外膜に作用して、代謝活性を低下させバイオフィルム構成成分である膜糖タンパクを攻撃する。

共焦点レーザー顕微鏡では、同じ基材ベースの創傷ドレッシングが 1%スルファジアジン銀、消毒剤無添加で、CDC (Center for Disease Control and Prevention) 産出器、フィルターバイオフィルム、及びチャンバースライドで、黄色ブドウ球菌や MRSA のバイオフィルムの破壊と脱着を引き起こしていることが観察された。我々のデータでは、48 時間の*大腸菌*、*黄色ブドウ球菌*、*セレウス菌*の培養後、オレイン酸カリウム及び対照 (消毒用アルコール) で 10 分間処理すると、オレイン酸カリウム及び消毒用アルコール共に同程度の細菌除去効果を示した。*大腸菌*と*黄色ブドウ球菌*は両方の処理で、4log 減少し、*セレウス菌*は両方の処理に耐性があった。*セレウス菌*は芽胞を産生しており、乏血小板血漿、多血小板血漿、血小板ゲル、血小板溶解生体材料から作成した洗浄剤に対してさえも耐性を持つ。

クロストリジウム・ディフィシルに対しては、オレイン酸カリウムは 1 分処理で 2.4log 細菌減少を引き起こしたが、消毒用アルコールでは 0.4log 減少に過ぎなかった。

小児重症熱傷では、クロストリジウム・ディフィシル関連の下痢が、入院患者の致死率を 5 倍に高める。熱傷面積に対する入院期間は延長し、下痢によりアシドーシスを引き起こす。よって、オレイン酸カリウムを用いた洗浄が消毒アルコールよりもクロストリジウム・ディフィシル感染の場合は有効であろうと思われる。

in vitro の脱細胞マウス皮膚モデルでは、洗浄剤不使用、非イオン洗浄剤、陰性イオン洗浄剤と比較すると、硫酸グリコサミノグリカンの量はイオン性洗浄剤でのみ低下した ($p < 0.05$)。洗浄剤不使用法と比較して洗浄剤法は全て、機械的足場強度とエラスチン量を減少させた ($p < 0.05$)。洗浄剤不使用、非イオン合成洗浄剤、陰イオン洗浄剤では足場強度と細胞外マトリクス量を低下させ、これは遺残した組織に悪影響を与える。我々の研究では、陰イオン洗浄剤である脂肪酸カリウムはマウス線維芽細胞及びヒトケラチノサイトに対して、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) と比較して、24 時間、48 時間の培養後の細胞傷害性が有意に低かった。マウス線維芽細胞とヒトケラチノサイトは WST-8 アッセイと LDH 溶出率アッセイでの評価をしており、この手法はヒトグリオーマ細胞 (U87)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) でも有用である。マウス線維芽細胞では、脂肪酸カリウムはラウリル硫酸ナトリウム (SLS) と比較して細胞生存性が有意に高かった。一方初代ヒトケラチノサイトでは、カプリル酸カリウム (C8K)、ラウリン酸カリウム (C12K)、オレイン酸カリウム (C18:1K)、リノール酸カリウム (C18:2K) の脂肪酸カリウムは、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) より有意に細胞生存性は高かったが、LDH 溶出率アッセイでは有意差は認められなかった。ヒトケラチノサイト (NCTC2455 細胞株) とラウリル硫酸ナトリウム (SLS) は光アレルギー試験で見られるように相互作用が起こると考えられる。

アメリカ軍の外傷における症例対照研究では複数菌感染が感染継続の重要な因子であると報告されており、種々の細菌から産生されるバイオフィームが創感染の継続に重要であるとされている。臨床例から分離した MRSA の一種 (ATCC, BAA-2856、それまでの呼称で OJ-1) は、マウス皮膚チップモデルでバンコマイシン耐性を示した上に、病原性の強いバイオフィームを産生し、マウスクッパー細胞内で生存可能であった。今回の BAA-2856 株を用いたバイオフィーム除去試験では、オレイン酸カリウム (C18:1K) のバイオフィーム除去率は、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) と比較して 15% ($p < 0.01$)、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) と比較して 12% ($p < 0.05$) の差があり、有意に効果的であった。他の脂肪酸カリウムではカプリル酸カリウム (C8K) がラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES)、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) と比較して有意にバイオフィーム除去率が高く、オレイン酸カリウムのみならず脂肪酸カリウムがラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES)、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) と

比較して有用であると考えられる。

以前の報告でラウリル硫酸ナトリウム (SLS) が表皮ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌に対してオレイン酸や塩化ベンザルコニウムと同等に筋皮膚創傷に有用であったとの報告がある。一方、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) を原料として含有するシャワーゲルは吸引水疱モデルで一過性に炎症を抑制し、細菌増殖を抑制するものの、化粧品の原料でもあり、細胞毒性を指摘されている。0.1 mg/mL の臨界ミセル濃度以下の濃度では、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) はコラーゲン融解酵素活性にほぼ影響を与えないが、皮膚に浸透して皮膚刺激を引き起こすとされている。In vivo 試験において、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) 処理の繰り返しが表皮下での蓄積を引き起こした。これら合成陰イオン洗浄剤と異なり、脂肪酸カリウムとオレイン酸ナトリウムの毒性は、自然界の川を模した系では変化する。すなわち硬水におけるオレイン酸ナトリウムの沈降は陽イオン依存性の無毒化であり、これは金属石けんを形成する。オレイン酸塩、パルミチン酸塩の毒性は、ラウリン酸塩、ミリスチン酸塩の 1/10 である。細胞培養に川の水や水道水を使用した場合、全脂肪酸の致死濃度は、超純水を用いた場合と比べ、30–100 倍の高値となり、毒性が低下した。

よって、脂肪酸カリウム的一种であるオレイン酸カリウムは、創洗浄に有用であり、殺菌性があり、MRSA 除去能を有し、宿主細胞には毒性が低く、環境にも優しい性質であると言える。

【結論】

無添加石けんの成分である脂肪酸カリウム的一种、オレイン酸カリウムは、MRSA を含む複数の細菌を殺菌可能であり、バイオフィーム形成 MRSA の除去にも効果的であった。正常な宿主細胞に対する影響の観点では、LDH 溶出率及び細胞生存率は、合成洗浄剤であるラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) やラウリル硫酸ナトリウム (SLS) と比較して、有意に細胞傷害性が低い結果となった。よって、オレイン酸カリウムは創傷洗浄剤として費用対効果が高いと考えられる。

参考文献

1. Sen, C.K.; Gordillo, G.M.; Roy, S.; Kirsner, R.; Lambert, L.; Hunt, T.K.; Gottrup, F.; Gurtner, G.C.; Longaker, M.T. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen.* **2009**, *17*, 763-771. [[CrossRef](#)]
2. Richmond, N.A.; Maderal, A.D.; Vivas, A.C. Evidence based management of common chronic lower extremity ulcers. *Dermatol. Ther.* **2013**, *26*, 187-196. [[CrossRef](#)]
3. Rice, J.B.; Desai, U.; Cummings, A.K.; Birnbaum, H.G.; Skornicki, M.; Parsons, N.B. Burden of diabetic foot ulcers for medicare and private insurers. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 651-658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Garcia, G.A.; Nguyen, C.V.; Yonkers, M.A.; Tao, J.P. Baby Shampoo Versus Povidone-Iodine or Isopropyl Alcohol in Reducing Eyelid Skin Bacterial Load. *Ophthalmic Plast. Reconstr. Surg.* **2018**, *34*, 43-48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Karki, S.; Cheng, A.C. Impact of non-rinse skin cleansing with chlorhexidine gluconate on prevention of healthcare-associated infections and colonization with multi-resistant organisms: A systematic review. *J. Hosp. Infect.* **2012**, *82*, 71-84. [[CrossRef](#)]
6. Webster, J.; Osborne, S. Preoperative bathing or showering with skin antiseptics to prevent surgical site infection. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, CD004985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Popovich, K.J.; Hota, B.; Hayes, R.; Weinstein, R.A.; Hayden, M.K. Daily skin cleansing with chlorhexidine did not reduce the rate of central-line associated bloodstream infection in a surgical intensive care unit. *Intensive Care Med.* **2010**, *36*, 854-858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Vali, L. ; Davies, S.E. ; Lai, L.L. ; Dave, J. ; Amyes, S.G. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, 61, 524-532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Nherera, L.M. ; Woodmansey, E. ; Trueman, P. ; Gibbons, G.W. Estimating the Clinical Outcomes and Cost Differences Between Standard Care with and without Cadexomer Iodine in the Management of Chronic Venous Leg Ulcers Using a Markov Model. *Ostomy Wound Manag.* **2016**, 62, 26-40. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 312 13 of 14
10. Das Ghatak, P. ; Mathew-Steiner, S.S. ; Pandey, P. ; Roy, S. ; Sen, C.K. A surfactant polymer dressing potentiates antimicrobial efficacy in biofilm disruption. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 873. [[CrossRef](#)]
11. Percival, S.L. ; Mayer, D. ; Salisbury, A.M. Efficacy of a surfactant-based wound dressing on biofilm control. *Wound Repair Regen.* **2017**, 25, 767-773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Burnouf, T. ; Chou, M.L. ; Wu, Y.W. ; Su, C.Y. ; Lee, L.W. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion* **2013**, 53, 138-146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Finnerty, C.C. ; Herndon, D.N. ; Lee, J.O. ; Rodriguez, N.A. ; Al-Haj, I.H. ; Wurzer, P. ; Calhoun, B.R. ; Jeschke, M.G. Morbidity and mortality in severely burned children with *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Surgery* **2016**, 159, 1631-1637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Farrokhi, A. ; Pakyari, M. ; Nabai, L. ; Pourghadiri, A. ; Hartwell, R. ; Jalili, R. ; Ghahary, A. Evaluation of Detergent-Free and Detergent-Based Methods for Decellularization of Murine Skin. *Tissue Eng. Part A* **2018**, 24, 955-967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Li, N. ; Zhang, W. ; Khan, M. ; Lin, L. ; Lin, J.M. MoS₂-LA PEI nanocomposite

- carrier for real-time imaging of ATP metabolism in glioma stem cells co-cultured with endothelial cells on a microfluidic system. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 99, 142-149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Galbiati, V.; Martínez, V.; Bianchi, S.; Mitjans, M.; Corsini, E. Establishment of an in vitro photoallergy test using NCTC2544 cells and IL-18 production. *Toxicol. In Vitro* **2013**, 27, 103-110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Akers, K.S.; Mend, K.; Cheatle, K.A.; Zera, W.C.; Yu, X.; Beckius, M.L.; Aggarwal, D.; Li, P.; Sanchez, C.J.; Wenke, J.C.; et al. Biofilms and persistent wound infections in United States military trauma patients: A case-control analysis. *BMC Infect. Dis.* **2014**, 14, 190. [[CrossRef](#)]
18. Makino, T.; Jimi, S.; Oyama, T.; Nakano, Y.; Hamamoto, K.; Mamishin, K.; Yahiro, T.; Hara, S.; Takata, T.; Ohjimi, H. Infection mechanism of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* on indwelling foreign materials in mice. *Int. Wound J.* **2015**, 12, 122-131. [[CrossRef](#)]
19. Jimi, S.; Miyazaki, M.; Takata, T.; Ohjimi, H.; Akita, S.; Hara, S. Increased drug resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms formed on a mouse dermal chip model. *J. Med. Microbiol.* **2017**, 66, 542-550. [[CrossRef](#)]
20. Oyama, T.; Miyazaki, M.; Yoshimura, M.; Takata, T.; Ohjimi, H.; Jimi, S. Biofilm-Forming Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Survive in Kupffer Cells and Exhibit High Virulence in Mice. *Toxins* **2016**, 8, 198. [[CrossRef](#)]
21. Anglen, J.O.; Gainor, B.J.; Simpson, W.A.; Christensen, G. The use of detergent irrigation for musculoskeletal wounds. *Int. Orthop.* **2003**, 27, 40-46.
22. Amouroux, I.; Pesando, D.; Noël, H.; Girard, J.P. Mechanisms of cytotoxicity by cosmetic ingredients in sea urchin eggs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, 36, 28-37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Larsen, H.F. ; Ahlström, M.G. ; Gjerdrum, L.M.R. ; Mogensen, M. ; Ghathian, K. ; Calum, H. ; Sørensen, A.L. ; Forman, J.L. ; Vandeven, M. ; Holerca, M.N. ; et al. Noninvasive measurement of reepithelialization and microvasculature of suction-blister wounds with benchmarking to histology. *Wound Repair Regen.* **2017**, 25, 984-993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Jovanovic, A. ; Ermis, R. ; Mewaldt, R. ; Shi, L. ; Carson, D. The Influence of Metal Salts, Surfactants, and Wound Care Products on Enzymatic Activity of Collagenase. *Wounds* **2012**, 24, 242-253. [[PubMed](#)]
25. Patil, S. ; Singh, P. ; Sarasour, K. ; Maibach, H. Quantification the Wound Debriding Enzyme of sodium lauryl sulfate penetration into the skin and underlying tissue after topical application—Pharmacological and toxicological implications. *J. Pharm. Sci.* **1995**, 84, 1240-1244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kadono, T. ; Uezu, K. ; Kosaka, T. ; Kawano, T. Altered toxicities of fatty acid salts in green paramecia cultured in different waters. *Z. Naturforsch. C* **2006**, 61, 541-547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Arokiyaraj, S. ; Arasu, M.V. ; Vincent, S. ; Prakash, N.U. ; Choi, S.H. ; Oh, Y.K. ; Choi, K.C. ; Kim, K.H. Rapid green synthesis of silver nanoparticles from *Chrysanthemum indicum* L and its antibacterial and cytotoxic effects: An in vitro study. *Int. J. Nanomed.* **2014**, 9, 379-388. [[CrossRef](#)]
28. Kovary, K. ; Louvain, T.S. ; Costa e Silva, M.C. ; Albano, F. ; Pires, B.B. ; Laranja, G.A. ; Lage, C.L. ; Felzenszwalb, I. Biochemical behaviour of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species. *Br. J. Nutr.* **2001**, 85, 431-440. [[CrossRef](#)]
29. Akhtar, M.J. ; Ahamed, M. ; Fareed, M. ; Alrokayan, S.A. ; Kumar, S. Protective effect of sulphoraphane against oxidative stress mediated toxicity induced by CuO nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts BALB 3T3. *J. Toxicol. Sci.* **2012**, 37, 139-148. [[CrossRef](#)]
30. Minnich, K.E. ; Stolarick, R. ; Wilkins, R.G. ; Chilson, G. ; Pritt, S.L. ;

- Unverdorben, M. The effect of a wound care solution containing polyhexanide and betaine on bacterial counts: Results of an in vitro study. *OstomyWound Manag.* **2012**, 58, 32-36.
31. Bauer, J.; Siala, W.; Tulkens, P.M.; Van Bambeke, F. A combined pharmacodynamic quantitative and qualitative model reveals the potent activity of daptomycin and delafloxacin against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, 57, 2726-2737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Presterl, E.; Suchomel, M.; Eder, M.; Reichmann, S.; Lassnigg, A.; Graninger, W.; Rotter, M. Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, 60, 417-420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Qi, X.; Poernomo, G.; Wang, K.; Chen, Y.; Chan-Park, M.B.; Xu, R.; Chang, M.W. Covalent immobilization of nisin on multi-walled carbon nanotubes: Superior antimicrobial and anti-biofilm properties. *Nanoscale* **2011**, 3, 1874-1880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]