

Development of biomarkers for the Wound Fluid RT-PCR method to detect critically colonized and infected wounds

その他のタイトル	滲出液RT-PCR法によるクリティカルコロナイゼーション及び感染創傷検出のためのバイオマーカーの開発
学位授与年月日	2014-03-24
URL	http://doi.org/10.15083/00007026

審査の結果の要旨

氏名 浅田 真弓

本研究は、近年問題となっている、炎症徴候を伴わずに治癒遅延するクリティカルコロナイゼーション及び感染創傷の客観的同定指標を得るため、学位申請者が動物実験で確立済みである「滲出液 RT-PCR 法：滲出液に含まれる細胞を対象とした RT-PCR 法」の臨床応用を目指した基礎研究並びに臨床研究である。クリティカルコロナイゼーションは特有の臨床徴候を示さず、「最適なケアにも関わらず 2 週間以上治癒傾向が認められない」創傷とされる。本研究において、本来早期の臨床的介入を必要とするクリティカルコロナイゼーション及び感染創傷検出のためのバイオマーカーを開発するため、下記のように動物実験及び臨床研究より結果を得、臨床的に有用なバイオマーカーを同定することができた。

1. クリティカルコロナイゼーション動物モデルの確立を試みた結果、既に学位申請者が確立している動物モデルの細菌負荷条件を調節することにより、定義通り、炎症徴候を伴わない治癒遅延を示す妥当なモデルを確立し得た。これにより、慢性創傷の感染の概念である、infection continuum (汚染、定着、クリティカルコロナイゼーション、感染)のそれぞれに対応する一連の動物モデルが得られ、それぞれの滲出液中細胞の網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、クリティカルコロナイゼーション及び感染のみで高発現を示すマーカー候補遺伝子を絞り込むことが可能な状況となった。
2. 当該モデルの組織学的解析から、クリティカルコロナイゼーションでは、肉眼的に発赤・腫脹などの炎症徴候は認めないが、皮下組織に特徴的な好中球の浸潤と凝集像を認め、走査型電子顕微鏡解析では、創底に菌体外多糖体に覆われた菌体が確認された。これまで病態生理が十分に明らかとなっていない、クリティカルコロナイゼーションについて、バイオフィームに関連する炎症が皮下組織で持続している可能性が示唆された。
3. 対照群、定着群、クリティカルコロナイゼーション群、感染群の 4 群の動物モデルについて、滲出液中細胞群のポピュレーションを明らかにするため、創作成後 2 日から 6 日の全血及び滲出液中の免疫担当細胞について、フローサイトメトリーで細胞数を明らかにした。その結果、全血中には感染群でリンパ球が存在するが、滲出液中では検出されないことが分かった。一方、顆粒球は感染群で他群に比べ有意に多く、組織学的解析結果と一致していた。これらの結果から、滲出液中での細胞群の分布が著しく偏っていることはなかったため、滲出液中の全細胞を用いて DNA マイクロアレイを行うことを決定した。
4. 4 群の動物モデルを作製し、それぞれの滲出液を回収し、フローサイトメトリーで細菌由来の細胞を除き、宿主の細胞のみをソーティングした。各サンプル 1×10^6 個の細胞

ペレットから total RNA を抽出後、各群について 5 または 6 サンプルずつをプールし、DNA マイクロアレイ (Whole Rat Genome Oligo Microarray 4x44K v3, Agilent) を施行し、創傷滲出液中細胞のクリティカルコロナイゼーション及び感染関連の網羅的遺伝子発現データが得られた。

5. 得られたマイクロアレイデータから、クリティカルコロナイゼーション及び感染群のみで高発現する遺伝子を 550 同定し、感染群の対照群に対する発現比が高い順にソートしたマーカー候補遺伝子のリストを得た。臨床研究において、慢性創傷の滲出液が染み込んだガーゼから total RNA を抽出し、このリストの上位から順に real-time RT-PCR で発現量を定量し、18S rRNA と *HPRT1* の内部標準を用いた補正を行った ΔCt 法で群間比較した。

6. 臨床の創傷は 1 週間に 1 回、4 週間連続して観察することにより、専門家による臨床的判断、創面スワブ (Levine 法) による細菌数、創面積変化による定義から、臨床的転帰を判断し、明らかに分類可能な正常治癒群 ($n=4$)、クリティカルコロナイゼーション群 ($n=3$)、感染群 ($n=4$) についてマーカー候補遺伝子の発現量を比較した。マーカー候補遺伝子による正常治癒とそれ以外を区別する感度・特異度を算出した結果、*NPPB*、*ITGB6*、*CPNE4*、*EML5*、*ITSN1* 遺伝子について感度・特異度共に 100%を示した。

以上、本論文は創傷を非侵襲的にアセスメントできる「滲出液 RT-PCR 法」の臨床応用を念頭に、基礎研究から臨床研究までを実施し、臨床で使用可能なクリティカルコロナイゼーション及び感染創傷バイオマーカーを開発した。本研究はこれまで臨床徴候がないために、2 週間以上の治癒遅延を確認しなければ同定できなかったクリティカルコロナイゼーションの早期同定を可能にするのみならず、今後、得られたマーカー遺伝子の感染現象における役割に関する研究を行うことによって、病態生理が明らかとなっていないクリティカルコロナイゼーション創傷の理解について重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。