

論文の内容の要旨

論文題目 Development of a pressure ulcer assessment method based on peroxidase and alkaline phosphatase activity detected by wound blotting

(創面ブロットィングによるペルオキシダーゼおよびアルカリフォスファターゼ活性の検出に基づく褥瘡アセスメント手法の開発)

氏名 北村 言

序章

褥瘡は持続する外力によって生じる皮膚および皮下組織の損傷である。欠損が皮下組織に及ぶ全層欠損褥瘡では治癒までに数か月以上かかることもあり、治療期間の短縮は重要な課題である。

褥瘡管理では全身と創のアセスメントに基づいて処置の選択がなされる。創のアセスメントは、臨床では肉眼的所見に基づくアセスメントが主要であり、深達度や創サイズ、滲出液量などから創の状態を捉える。しかし、高齢者では炎症徴候が肉眼的には認められないことがあり、より適したタイミングで適した治療・ケアを選択する為には、創部組織内部の病態の理解が必須である。

組織の病態を把握できる方法として組織生検があるが、その侵襲性から長期にわたって繰り返しアセスメントする必要がある褥瘡には適していない。近年、非侵襲的に採取できる創滲出液中のタンパク質解析が創部組織の病態を反映することが報告されている。つまり滲出液中タンパク質が創アセスメント指標となり得るが、解析に要する時間や特殊な機器の必要性からベッドサイドでのリアルタイムなアセスメントへの応用は難しい。

本研究は、ベッドサイドで簡便かつリアルタイムに検出できる点から、創面ブロットィングによるペルオキシダーゼ (PO) 活性とアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の検出に着目した。先行研究にてこれらの酵素活性が褥瘡滲出液から検出できることは明らかとなっているが、そのシグナルがどのような創の病態を反映しているかは不明である。そこで本研究はまず、創面ブロットィングによる PO および ALP 活性検出により非侵襲的な病態アセスメントが可能となることを目指し、ラットの皮膚の創傷を用いて、創面ブロットィングにより検出される PO および ALP 活性シグナルが反映する創の組織学的病態を解明した (第 1 章)。次に、創面ブロットィングを用いた PO および ALP 活性シグナルによる創の病態アセスメント手法が臨床の褥瘡へ適応可能であるかその外的妥当性を検証した (第 2 章)。

第 1 章

背景

本章は創面ブロットィングで検出される PO および ALP 活性シグナルの由来を明らかにし、

PO および ALP 活性シグナルが反映する創の組織学的病態を解明する。

創滲出液中に存在しうる PO として、好中球・単球に存在するミエロペルオキシダーゼ (MPO)、血清中のグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 3 が考えられる。ALP は様々な細胞に存在するが、皮膚の創傷治癒過程では肉芽組織で強く検出されると報告されている。異なる病態にある創を用いて PO および ALP 活性が創面ブロッティングでどのようなシグナルを示し、そのとき創部組織のどこで PO および ALP 活性があるかを見ることで滲出液中の PO および ALP 活性の由来を明らかにし、さらにシグナルが反映する創部組織学的病態を明らかにする。

方法

雄性 SD ラット (10 週齢、6 か月齢) の背部皮膚に直径 2.5cm の全層欠損創を作製し、創洗浄、ドレッシング交換を組織採取または創閉鎖まで連日行った。

創面ブロッティングによる滲出液採取および創部組織の採取を創作製後日数 (PWD) 1、4、7、10 日に実施した。創面ブロッティングで採取した滲出液中 PO および ALP 活性は化学発光を用いて可視化した。組織は創中央で 2 分割し、一方から固定後パラフィン切片を、他方から未固定凍結切片を作製した。パラフィン切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびマッソン・トリクローム (MT) 染色に供し、創部組織の形態学的特徴を観察した。未固定凍結切片では創部組織における PO および ALP 活性を化学発色基質を用いて検出し、薄切後に後固定した切片を用いて MPO と GPx3 の局在を免疫組織化学にて検出した。

創面ブロッティングで検出した PO および ALP 活性シグナルに基づき創を群分けし、創部組織所見を網羅し各群内で共通する所見を抽出した。

さらに、創面ブロッティングにより肉眼では捉えられない創部組織の反応を捉えられることを確認するため、DESIGN ツールの炎症/感染得点と壊死組織得点について酵素活性シグナルに基づき群分けされた創のグループ間で比較した。

結果

創の肉眼所見では、若齢ラットは PWD4 頃にスラフが消失し、PWD4-10 で創収縮を認め、PWD11 で創が治癒した。高齢ラットは若齢ラットに比べスラフ消失、創収縮、創閉鎖が遅延した。HE、MT 染色では、PWD1、4 で炎症性細胞浸潤が多く、PWD7 で線維芽細胞様細胞を多く認めた。

創面ブロッティングで検出した PO 活性シグナルは、基質との反応直後に強いシグナルを呈し、2 分間の反応時間において滲出液付着部分のシグナルが消失し周囲にシグナルが広がるものを認めた (以下、リングシグナルとする)。若齢ラットでは PWD1 で、高齢ラットでは PWD1、4 でリングシグナルの創が多かった。創部組織では PO 活性は炎症性細胞、細胞破砕物周辺で見られ同部位に MPO を認めた。GPx3 は血管、コラーゲン線維に検出されたが PO 活性は認めなかった。

リングシグナルと非リングシグナルの創で組織所見を比較したところ、リングシグナルで細

胞の変性、壊死、破砕物が多く観察され、PO の分泌または逸脱を認める創が有意に多かった ($p<0.001$)。

ALP 活性シグナルは、PWD に関わらず創底に認められた。ALP 活性シグナルの輝度は PWD1 から 7 へ上昇し、PWD10 で低下した。創部組織では ALP 活性は炎症性細胞および細胞破砕物周辺、線維芽細胞様細胞で検出された。創面ブロッティングで検出された ALP 活性シグナル輝度が高い創で共通する組織所見は認めなかった。

PO 活性シグナル解析により、炎症徴候を検出できるか、壊死組織を伴う創において強い炎症から肉芽増殖への移行をアセスメントできるか、の 2 点を検討するため、DESIGN ツールの感染/炎症得点 (0 点: 炎症兆候なし— 3 点: 全身的影響あり) および壊死組織得点 (0 点: 壊死組織なし— 2 点: 硬く厚い密着した壊死組織あり) をリングシグナルと非リングシグナルの創で比較した。感染/炎症得点は非リングシグナルの創に比べリングシグナルの創で得点が高い創が多かった。壊死組織得点は 2 群間で同程度であった。

考察

滲出液中の強い PO 活性は創面ブロッティングでリングシグナルとして検出される。PO は、炎症性細胞から逸脱または分泌される MPO に由来することが明らかとなり、損傷した創部組織を除去しようとする強い炎症反映を示していると考えられる。創面ブロッティングによる PO 活性解析により、肉眼では捉えられない組織での炎症反応および肉芽増殖への移行をアセスメントできることが示唆された。創面ブロッティングで検出される ALP 活性シグナル単独で創の病態をアセスメントすることは困難であり、他の酵素活性をマーカーとして組み合わせることで病態を把握できる可能性がある。

第二章

背景

本章では、創面ブロッティングによる PO 活性検出が、非侵襲的な褥瘡の病態アセスメント手法として確立することを目指し、第 1 章の結果が臨床の褥瘡アセスメントにも適応可能かその外的妥当性を検証した。本章の目的は、創面ブロッティングで検出される PO 活性シグナルがリングパターンの創は非リングパターンの創に比べ、DESIGN の感染/炎症得点が高いものが多いこと、壊死組織得点には差が認められないことを示すことである。

方法

本章は横断研究で、2014 年 7 月から 2016 年 8 月に一大学病院褥瘡回診チームでフォローされた患者を対象とし、適格基準を「皮下組織に及ぶ皮膚欠損を有する 65 歳以上の褥瘡患者のうち創面ブロッティングが実施された創」、除外基準を「創底全体の滲出液が採取できなかった創」とした。

滲出液を創面ブロッティングで採取し、PO 活性を化学発光を用いて検出した。PO 活性シグ

ナルは、シグナルが創底部になく創縁から周囲に広がるリングシグナルと創底にシグナルを認める非リングシグナルに分類した。2 群間で感染/炎症得点、壊死組織得点を比較した。

結果

解析対象は 62 サンプル（リングシグナル 30、非リングシグナル 32）となった。リングシグナルを呈する創では非リングシグナルに比べ、感染/炎症得点が高い創の割合が有意に多かった ($p=0.016$)。2 群間で壊死組織得点に優位な差は認めなかった ($p=0.258$)。

考察

褥瘡患者から得た浸出液を用いた創面プロットティングによる PO 活性解析においても、第 1 章と同様の結果が得られた。このことより、創面プロットティングを用いた PO 解析による炎症反応のアセスメントは、臨床における褥瘡アセスメントにも適応可能であることが示された。創面プロットティングを用いた PO 活性解析により、非侵襲的に、リアルタイムに、創組織における強い炎症反応を検出可能となり、創に適した治療の選択につながる。

結論

創面プロットティングで検出された PO 活性リングシグナルは、創部での炎症性細胞からの MPO の分泌または逸脱に由来しており、異物除去に伴う強い炎症反応を反映することが示唆された。リングシグナルの検出により、肉眼では捉えられない組織内部の炎症反応の検出および肉芽増殖への移行が同定できることが示唆された。臨床における褥瘡を対象とした研究においてもこれを支持する結果が得られたことから、創面プロットティングによる PO 活性検出は、ベッドサイドでリアルタイムにかつ非侵襲的に褥瘡組織内部の病態をアセスメントできる手法となり得ることが示された。これにより従来の肉眼所見に基づくアセスメントに比べ、より適したタイミングで適した治療・ケアを選択できる可能性があり早期治癒が望める。