

論文の内容の要旨

論文題目 Healing process of incontinence-associated dermatitis and promoting effect of acylated homoserine lactone on its healing in rats

(ラットにおける失禁関連皮膚炎の治癒過程とアシル化ホモセリンラクトンの治癒促進効果)

氏名 麦田 裕子

第1章：研究背景

失禁を有する患者の深刻な問題のひとつに失禁関連皮膚炎 (incontinence-associated dermatitis: IAD) がある。IAD は痛みや搔痒感等の不快感を伴うことによる患者の QOL 低下、細菌感染や褥瘡発生のリスクを有するため、早期に治癒を目指すことが求められる。しかし IAD の病態生理はこれまで認識されておらず、効果的な治療的介入が不明であった。

我々は、IAD の発生には皮膚浸軟及び便中成分として消化酵素及び細菌が関与していると仮説を立て、便暴露を伴う皮膚浸軟をラットに再現し病態生理学的検討を行ってきた。その結果、皮膚浸軟はバリア機能を低下させ高分子の経皮的侵入を促進することが示された。タンパク質分解酵素と細菌の作用が加わった皮膚浸軟では、肉眼的には表皮剥離を伴わないにも関わらず、組織学的には真皮層における細菌凝集塊を伴う著しい組織損傷を認めた。これらの結果より、浸軟皮膚では肉眼的な表皮剥離を伴うことなく消化酵素及び細菌が経皮的侵入し組織内部で損傷を生じるといふ IAD 発生機序が示唆された。

本研究では、IAD に対する治療的介入のコンセプト抽出のために不足している検討として、IAD 発生における脂質分解酵素の影響 (第2章)、IAD の治癒過程 (第3章) を検討した。それらの結果より治療的介入法のコンセプトを抽出し、考案した介入法の IAD 治癒効果を検証した (第4章)。

第2章：IAD 発生における脂質分解酵素の影響

【目的】 脂質分解酵素が皮膚バリア機能低下及び組織損傷に及ぼす影響の検討

【方法】 雄性6か月齢SDラットの除毛3日後背部皮膚を用いて、まず *ex vivo* 実験で皮膚浸軟 (M)、タンパク質分解酵素 (P)、脂質分解酵素 (L) の3要素の単体及び組み合わせの影響を検証した。採皮したラット背部皮膚に、水分含有アガロースゲルを2時間貼付し皮膚浸軟を再現し

た。次いで消化酵素含有アガロースゲルを 15 分貼付し消化酵素処理を実施し、直後に組織を固定し組織学的所見 (HE 染色) を解析した。次に *in vivo* 実験で皮膚浸軟 (M) 下における消化酵素 2 種類 (P、L) の単体及び組み合わせの影響を検証した。水分あるいは消化酵素溶液含有アガロースゲルを 4 時間貼付し、アガロースゲル除去 30 分後に肉眼的所見、経表皮水分蒸散量、角質水分量を確認した。皮膚処理 24 時間後に肉眼的所見の観察及び組織採取をし、組織学的所見 (HE 染色)、及び経皮的侵入した高分子 (FITC 標識 dextran) の組織内局在を解析した。

【結果】 *ex vivo* 実験における組織学的解析の結果、PM 群及び PLM 群においてのみ、真皮内における赤血球の血管外漏出を認め、PLM 群では PM 群よりも赤血球の血管外漏出がより深層に観察された。*in vivo* 実験の結果、肉眼的所見としては、PLM 群において皮膚処理 24 時間後にわずかな点状の発赤を認めた。経表皮水分蒸散量の値は、対照群と比較して皮膚浸軟を伴う群において上昇した。組織学的所見では、真皮内における赤血球の血管外漏出が PM 群及び PLM 群で認められ、特に PLM 群ではより深層に観察されるという、*ex vivo* 実験と同様の結果であった。高分子の組織内局在は、消化酵素の影響が加わった皮膚浸軟において表皮内で陽性シグナルを認めた。

【考察】 真皮層内における赤血球の血管外漏出は、消化酵素により血管壁が分解されたという組織損傷の指標と考えられる。脂質分解酵素が加わった皮膚浸軟では赤血球の血管外漏出は認めなかったことから、脂質分解酵素そのものは組織損傷に影響を及ぼさないと考えられる。PM 群よりも PLM 群で赤血球の血管外漏出が広範囲に確認されたことから、脂質分解酵素は皮膚バリア機能低下を促すことでタンパク質分解酵素の経皮的侵入が加速し、組織損傷の程度を悪化させることが示唆された。以上より脂質分解酵素は皮膚バリア機能低下要因として IAD 発生を加速させると考えられる。IAD の要因モデルとしては皮膚浸軟、タンパク質分解酵素、細菌を皮膚処理に用いることが妥当であり、バリア機能低下要因は可能な限りコントロールすることがモデルの安定性のために求められるため、以降の実験では皮膚浸軟、タンパク質分解酵素、細菌を IAD モデル作製処理として使用した。

第 3 章 : IAD の治癒過程

【目的】 IAD モデルラットで認められる細菌凝集塊を伴う組織損傷の治癒過程の検討

【方法】 雄性 6 か月齢 SD ラットの除毛 3 日後背部皮膚に、消化酵素含有アガロースゲルを 4 時間貼付、30 分の風乾後、更に緑膿菌懸濁液を含んだろ紙を 30 分貼付し IAD を再現した。治癒までの経時的な肉眼的観察、及び皮膚処理 1、3、5、7 日後において組織採取を実施し、組織学的所見 (HE 染色)、細菌 (抗緑膿菌染色)、Cytokeratin (CK) パターン (抗 CK1/2、10、14 染

色)、細胞増殖 (抗 Ki67 染色)、基底膜構成成分 (抗 Laminin : LMN、Fibronectin : FN 染色) の局在を解析した。

【結果】肉眼的所見として、皮膚処理 3 日後まで発赤が拡大・増強し、その後発赤は改善し 7 日後には治癒した。組織学的所見として、皮膚処理 1 日後には先行研究と同様に真皮内における細菌凝集塊を伴う組織損傷が認められ、悪化と改善の切替点である処理 3 日後には、組織損傷部の直下において表皮様組織が毛包から伸長する所見が認められた。処理 3 日後に認めた毛包より伸長する表皮様組織を詳細に検討したところ、角化細胞 (CK1/2 陽性) から構成されていること、分化角化細胞 (CK10 陽性) はまばらに分布しているが、未分化角化細胞 (CK14 陽性) は表皮様組織内下層に分布しており増殖活性 (Ki67 陽性) を有すること、表皮様組織の下層に基底膜構成成分 (LMN、FN 陽性) の弱い陽性シグナルが局在することを確認した。

【考察】IAD モデルラットにおける細菌凝集塊を伴う組織損傷は、皮膚処理 3 日後に認めた毛包からの表皮様組織の伸長により分断、排除される可能性が示唆された。表皮様組織の構成細胞の局在は、開放創の治癒過程における上皮化に準ずるものであり、表皮様組織の伸長における角化細胞遊走の貢献が示唆された。また、表皮様組織における基底膜は未成熟であることが示唆された。以上より、角化細胞の遊走促進および基底膜の改善により IAD が重症化する前に治癒へ転向できる可能性が示唆された。

第 4 章 : IAD に対する治療的介入の効果

【背景】アシル化ホモセリンラクトン (AHL) のひとつである N- (3-オキシドデカノイル) -L-ホモセリンラクトン (3-oxo-C12-HSL) は、角化細胞遊走促進能および基底膜改善能を有することが報告されている。一方で常在菌である緑膿菌のクオラムセンシング分子として毒性因子発現を促進する。失禁患者の会陰部皮膚に緑膿菌の存在が報告されていることから、3-oxo-C12-HSL を IAD の治療的ケアとして適用するのは困難である。AHL にはアシル鎖長の異なる分子種が存在するが、それらの角化細胞遊走能は不明である。

【目的】アシル鎖長の異なる様々な AHL (3-oxo-C8-HSL、3-oxo-C10-HSL、3-oxo-C14-HSL) のうち角化細胞遊走促進能を有する分子種の同定、及びその AHL の IAD 治癒効果の検証

【方法】*in vitro* 実験において AHL の角化細胞遊走能を検証した。ラット表皮角化細胞株をスクラッチアッセイに供した。スクラッチ直後に細胞培養液を各 AHL (1 μ M) 及び溶媒 (DMSO) を含む培養液に交換した。0、24、48、72 時間後にスクラッチ創部を撮影、創面積減少率を算出し、処理群と対照群を Dunnett 検定にて比較した。次に *in vivo* 実験において AHL の IAD 治癒効果を検証した。雄性 6 か月齢 SD ラットの除毛 3 日後背部皮膚の左右両側に、第 3 章と同様の方

法で IAD を再現した。皮膚処理 1 日後に肉眼的発赤が生じているのを確認した後、左右一方に AHL 溶液 (10 μ M)、反対側に溶媒 (0.1% DMSO) をガーゼに含ませ 24 時間貼付した。治癒までの経時的な肉眼的所見の観察、及び皮膚処理 2 日後に組織採取を実施し、組織学的所見 (HE 染色)、細菌 (抗緑膿菌染色)、基底膜構成成分 (抗 LMN、FN 染色) の局在を解析した。

【結果】スクラッチ 72 時間後において、溶媒群と比較して面積減少率が有意に大きい処理群は、3-oxo-C8-HSL、3-oxo-C12-HSL、3-oxo-C14-HSL 群であった。3-oxo-C14-HSL を IAD に塗布した *in vivo* 実験では、肉眼的所見上の悪化と改善の切替点が AHL 群の方が溶媒群よりも早かった。皮膚処理 2 日後の組織学的解析より、表皮様組織により組織損傷部が排除される所見は AHL 群、溶媒群いずれでも認められ、特に AHL 群では排除された組織損傷部内に緑膿菌シグナルを認めない部分があった。AHL 群では表皮様組織の下層に基底膜構成成分 (LMN、FN 陽性) の強い陽性シグナルを認めた。

【考察】3-oxo-C8-HSL、3-oxo-C14-HSL は、皮膚常在菌や創感染起因菌のクオラムセンシング分子として報告されておらず、IAD 治癒促進剤として応用できる可能性が示された。3-oxo-C14-HSL を IAD 発生後に塗布した結果、肉眼的所見の経過より AHL は IAD が重症化する前に治癒へと転換できる可能性が示された。組織学的解析で認められた、表皮様組織により排除された組織損傷部内において緑膿菌を認めないという結果は、AHL による組織損傷部の治癒促進を示唆していると考えられる。

結論

IAD 発生における脂質分解酵素の影響を検証した結果、脂質分解酵素は皮膚バリア機能低下要因として IAD 発生を加速させることが示唆された。皮膚浸軟、タンパク質分解酵素、細菌の 3 要素を発生要因として用いた IAD モデルラットにおける真皮内の組織損傷は、毛包から伸長する表皮様組織により排除されること、また表皮様組織の伸長は角化細胞の遊走が貢献していることが示唆された。IAD 発生後に 3-oxo-C14-HSL を塗布することにより、IAD が重症化する前に治癒へ転向できる可能性が示された。

臨床における IAD に対する治療的介入として、毛包からの表皮様組織の伸長促進という、病態に基づく新たなコンセプトを導入した介入法が効果的と考えられる。さらに AHL が IAD の治癒促進に効果を有する可能性が示唆された。今後のさらなる介入法の開発により、IAD の病態に基づいた効果的な治療が可能となると期待できる。