

博士論文（要約）

Development of a biomarker for adrenocorticotrophic
hormone-induced mechanical hypersensitivity using a
full-thickness cutaneous wound model

(全層欠損創モデルを用いた副腎皮質刺激ホルモン誘導
機械的痛覚過敏のバイオマーカー開発)

後藤 大地

論文の内容の要旨

論文題目

Development of a biomarker for adrenocorticotrophic hormone-induced mechanical hypersensitivity using a full-thickness cutaneous wound model

(全層欠損創モデルを用いた副腎皮質刺激ホルモン誘導機械的痛覚過敏のバイオマーカー開発)

氏名 後藤大地

序文

創部痛は QOL を脅かすだけでなく創傷治癒を阻害するため、適切な評価と管理が必要である。しかしその痛みは傷の状態はもちろん、精神状態や外部の環境、これまでの経験などにより大きく変化するため、特に自らの状態を表現することに困難のある認知レベルが低下した高齢患者では評価が難しい。したがって、客観的な創部痛評価方法の開発が本邦における喫緊の課題である。

著者は修士課程において赤外線サーモグラフィを用いた創部痛評価方法の研究に取り組んだ。しかし、温度変化を伴わない痛みへの対応が難しいことがわかった。次に著者は、創部より非侵襲的に採取できる滲出液を生化学的に解析し、炎症と関連するタンパク質の濃度が創部痛と中程度の相関を示し、滲出液の生化学的解析が客観的創部痛評価法に应用できることを明らかにした。しかし、より高い相関を得るためには、痛みの発生源である炎症だけでなく、患者が痛みを知覚したことを反映するバイオマーカーを探索することが必須であると着想した。

本稿の目的は、動物実験を用いて創部痛の知覚を反映する創部痛バイオマーカーを探索することであった。第 1 章では全層欠損創モデルラットに対する機械的痛覚閾値評価法を確立した。そして、創部痛知覚によるストレス反応が創傷局所に与える影響を観察するため、第 2 章では、その反応を模した副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の局所投与を用い、機械的痛覚閾値の変化に関連する因子の観察を行い、滲出液中の創部痛バイオマーカーの候補を検討した。

第 1 章:全層欠損創モデルラットにおける機械的痛覚閾値測定法の確立 –von Frey test の適応可能性–

背景

von Frey test (VFT) は齧歯類の機械的痛覚閾値を測定する方法の一つであり、一般的には閾値の指標となる逃避行動を観察しやすい後肢の足底部に対して使用する。よって、創を背部に作製する全層欠損創モデルに対する VFT の適応可能性は明らかではなかった。本章では、VFT の全層欠損創モデルラットへの適応可能性を検証した。

方法

7週齢の雄性SDラットの背部に全層欠損創を作製した。創作製後3日目と5日目の創部を組織学的解析で炎症の程度を確認しVFTを施行した。次に、創作製後3日目でモルヒネ塩酸塩、インドメタシン、あるいはそのビークルを投与しVFTを施行した。また、創作製後5日目ではモルヒネ塩酸塩、インドメタシン、 λ -カラギーナン、あるいはそのビークルを投与しVFTを施行した。

結果

組織学的解析により、創作製後5日目と比較して3日目では創部で強い炎症を示し、VFTの結果有意に低い機械的痛覚閾値が観察された ($P=0.006$)。

創作製後3日目にモルヒネ塩酸塩、インドメタシン、あるいはそのビークルを投与しVFTを施行した結果、それぞれのビークル群と比較して、モルヒネ塩酸塩群では投与2時間後で ($P=0.037$)、インドメタシン群では投与2時間後ならびに4時間後で ($P=0.037, P=0.046$) 有意に高い機械的痛覚閾値が観察された。次に、創作製後5日目にモルヒネ塩酸塩、インドメタシン、 λ -カラギーナン、あるいはそのビークルを投与しVFTを施行した結果、それぞれのビークル群と比較して、モルヒネ塩酸塩群では投与2時間ならびに4時間後 ($P=0.017, P=0.024$) で有意に高い機械的痛覚閾値が、 λ -カラギーナン群では投与2、4ならびに8時間後 ($P=0.042, P=0.08, P=0.027$) で有意に低い機械的痛覚閾値が観察された。インドメタシン群では有意な差は認めなかった。

考察

組織の炎症は機械的痛覚閾値低下と関連し、VFTはその差を検出することが出来たと考えられる。また、モルヒネ塩酸塩はオピオイド系の、インドメタシンはNSAIDs系の代表的な鎮痛薬であり、VFTは創作製後3日目における両者の効果を検出した。創作製後5日目は炎症が比較的弱いため、インドメタシンの効果も相対的に弱い可能性が高く、その薬効の差も検出しうることがわかった。さらに、創作製後5日目に λ -カラギーナンにより炎症状態を作った結果、VFTは機械的痛覚閾値の低下を検出した。

小括

VFTは全層欠損創モデルラットの機械的痛覚閾値の変化を検出することが出来た。第2章では同法を用いてACTH局所投与が機械的痛覚閾値に与える影響を観察する。

第2章：全層欠損創モデルラットにおけるACTH局所投与の影響と創部痛バイオマーカーの同定

背景

創部痛バイオマーカーの条件は痛みを知覚したことを反映することである。そこで著者は、創部痛の知覚をストレスラーと考え、ストレス反応で分泌されるACTHに着目した。ACTHの刺激により副腎皮質において合成が促進するコルチコステロンは、近年副腎だけでなく皮膚などでも合成されることがわかっている。また、コルチコステロンは痛覚閾値を低下させることが報告されているため、ACTH投与が全層欠損創モデルにおいてもコルチコステロンの合成を促し機械的痛覚閾値に影響する可能性

がある。また、ACTHは痛みの発生に関与するイオンチャネルを活性化する protein kinase (PK) A や、PKC の活性化、アラキドン酸カスケードを促進させる効果があることがわかっている。

本章では、以下4つの仮説を検証することを目的とした。

- 1) 創部への ACTH 局所投与が創部でのコルチコステロン合成を促進し、機械的痛覚閾値を低下させる。
- 2) 機械的刺激感受性の4種類のイオンチャネル (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1; transient receptor potential ankyrin 1, TRPA1; transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4; and acid-sensitive ion channel 3, ASIC 3) のアンタゴニスト投与により、ACTH 局所投与による機械的痛覚過敏は消失する。
- 3) 創部への ACTH 局所投与が TRPV1 ならびに TRPA1 を活性化する PKA、PKC の創部での活性化を促進する。
- 4) 創部への ACTH 局所投与が TRPV4 ならびに ASIC3 の活性化に関連する cytochrome P450 (CYP) スーパーファミリーの発現上昇をもたらし、アラキドン酸の代謝産物である 5,6-EET の濃度が機械的痛覚閾値と相関する。

方法

7週齢の雄性SDラットの背部に全層欠損創を作製し5日目、創部にACTH、コルチコステロン、4種類のイオンチャネルアンタゴニストのいずれか+ACTH、あるいはそれぞれビークルを投与し、VFTにて機械的痛覚閾値を測定した。値はそれぞれの対照群との群間比較を行った。創部組織ならびに血液は投与4時間後、8時間後で採取し、必組織学的解析、分子生物学的解析、生化学的解析に供した。滲出液は薬剤投与後にろ紙貼付によって回収し、LC/MS/MS解析に供した。

結果

ビークル群と比較してACTH群では、創部でのコルチコステロン濃度が有意に上昇し ($P = 0.011$)、投与後4時間後ならびに6時間後で機械的痛覚閾値が有意に低下した ($P = 0.004$, $P = 0.021$)。しかしながら、コルチコステロンの下流因子の遺伝子発現に変化は認めず、コルチコステロン群では機械的痛覚閾値の低下もなかった。

次に、4種類のアンタゴニストで処理をしたところ、ACTH局所投与による機械的痛覚過敏が消失した。特に、TRPV4アンタゴニスト+ACTH群ではビークル+ACTH群と比較して、投与2時間後ならびに4時間後で機械的痛覚閾値が有意に上昇した ($P = 0.044$, $P = 0.016$)。

次にPKA、PKCの活性化、*Cyp2b1*, *Cyp2b2*, *Cyp2b12*, *Cyp2b15*, *Cyp2e1*の発現、5,6-EETの濃度をACTH投与4時間後の組織で観察した。PKA、PKCの活性化には有意な差は認めなかったが、肉芽組織での*Cyp2b12*の発現がビークル群と比較してACTH群で有意に上昇した ($P = 0.046$)。また、滲出液中の5,6-EETは機械的痛覚閾値と負の相関を示した ($r = -0.630$)。

考察

ACTH局所投与による機械的痛覚過敏のメディエーターとしてコルチコステロンが考えられたが、本実験系ではコルチコステロンを介さない機械的痛覚過敏が観察された。今回はACTHの単回投与に

よる実験であるため、先行研究のようなコルチコステロンの反復投与による神経可塑性変化による痛覚閾値の変化は起こらなかったことが考えられる。むしろ、ACTHがCYPを介して活性化させるアラキドン酸カスケードの代謝産物である5,6-EETが関与していることが示唆された。

小括

5,6-EETが創部痛バイオマーカーを開発するため最も着目すべき物質であり、新たな創部痛ケアのターゲットである可能性が示唆された。臨床応用するため、今後バイオマーカーとしての精度を検証し、簡便に検出、定量する方法の開発が必要である。これらの研究成果を基に、創部痛ケアのターゲットとしての5,6-EETに対するメカニズムに基づく看護ケアの開発が期待される。

総合考察・結論

本稿では、看護理工学的視点に基づき創部痛研究に用いる動物モデルの機械的痛覚閾値測定法の確立、ならびにストレス反応による創部痛悪化メカニズムの解明に取り組んだ。本研究により、5,6-EETが創部痛バイオマーカー候補として示唆され、これまで成し得なかった客観的な痛み評価法の開発を前進させた。さらに、同物質はストレスの影響を受けて痛みを悪化させる可能性があるため、同物質をバイオマーカーとして応用することで、心理社会的ストレスが創部痛に与える影響を最小限にする看護ケアの実現に貢献する。