

## 論文の内容の要旨

論文題目 創傷治癒と酸素環境 ～創傷酸素分圧可変モデルの開発と応用～

氏名 佐野仁美

### 目的

創傷は炎症期、増殖期、癒痕期の過程をたどり治癒する。増殖期は上皮化、肉芽形成により欠損部が修復される時期であり、多くの血管新生がおこり治癒に必要な栄養や酸素、細胞が供給され活発に細胞分裂が起こる。低酸素環境では血管新生が促進され、サイトカインや血管内皮前駆細胞が動員されることが知られており、低酸素による血管新生促進効果を期待した酸素不透過の創傷被覆材が臨床現場で広く用いられている。その一方で、酸素は細胞活動や増殖に不可欠であり、創傷治癒過程において代謝、マトリックス新生、細胞遊走・増殖を促進することが知られている。また全身を高濃度酸素で暴露する高圧酸素療法は難治性創傷治療において高い有効性が示唆されている。低酸素環境、高酸素環境いずれが創傷治癒に至適なのか、創傷治癒における至適酸素環境は不明である。創傷治療において適切な酸素環境は重要課題であるにも関わらず未だに統一した見解が示されていない理由として、これまでの酸素が創傷に与える影響を検証した研究では、細胞や動物自体を様々な酸素環境に暴露する方法であったため、純粋に被覆下創傷周囲の酸素環境の影響を検証することはできなかったためと考えられる。

我々は創傷を異なる酸素透過度の膜で被覆することによって、創傷局所に異なる酸素環境を創出できるのではないかと考えた。問題は被覆下創傷周囲の酸素分圧を計測する方法である。酸素分圧測定には一般的に測定部位に針状のプロローブを刺入する方法やコード付きセンサーを装着する測定機器が用いられる。しかし密閉した状態を維持したまま被覆下創傷部にプロローブやセンサーを挿入し酸素分圧を測定することは不可能であった。

そこで血管内酸素分圧の測定に用いられるリン光プローブによる光学的測定に着目した。Pd ポルフィリンは励起光の照射によりリン光を発生する。本測定方法はリン光が酸素存在下で減弱することを利用し、発生したリン光の強度・寿命を測定することで酸素分圧を算出する。皮膚欠損層に Pd ポルフィリンセンサーを接着した透明膜を貼付し、外側から励起光をあてることで被覆下創傷部の酸素分圧測定が可能となると考えた。研究目的に合致する測定デバイスとして Minisensor Oxygen Meter (Fibox 3, PreSens 社)を導入し、酸素透過度の異なる透明膜を組み合わせることで、創傷局所の酸素分圧可変モデルの開発に成功した。開発したモデルを

用いて異なる酸素環境が正常創傷および難治性創傷の治癒過程に及ぼす影響を検証した。

## 方法

本実験は埼玉医科大学動物実験委員会の承認のもと(承認番;454)、日本実験動物学会が提唱する「実験動物に関する方針」に準じて行なった。実験動物は日本クレア社(東京)より入手した。

### 実験 1. 創傷酸素分圧可変モデルの開発

7-9 週齢の ddy マウス 6 匹を対象とした。麻酔器は THE UNIVENTOR 400 (ANESTHESIA<sup>®</sup>: UNITUNIVENTOR 社) を使用し、吸入麻酔はイソフルラン (エスカイン<sup>®</sup>; メルク社) を使用した。ddy マウスに対し、エアフロー 100ml/分のもとイソフルラン濃度 1.5~2.0%で麻酔を維持した。脱毛後、顕微鏡観察下に微小外科用手術器具を用いて、背部に左右対称的に直径 8mm の全層皮膚欠損創傷を作成した。創傷の一方を酸素透過膜(ポリメチルペンテン、酸素透過度:60000-65000ml/m<sup>2</sup>・24hr・1atm)、もう一方を酸素不透過膜(ポリ塩化ビニリデン、酸素透過度:40-90ml/m<sup>2</sup>・24hr・1atm)で被覆した。あらかじめ膜の内側には Pd ポルフィリンセンサーを接着した。この Pd ポルフィリンセンサーに Minisensor Oxygen Meter を用いて外側から励起光をあて、その反射光を解析することで、被覆下創傷表面の酸素分圧を経時的(被覆後 6-8 時間、3、5、7 日目)に評価した。

### 実験 2. 酸素環境が創傷治癒へ及ぼす影響の検証

正常な創傷モデルとして ddy マウス 24 匹を、難治性創傷モデルとして dbdb マウス 24 匹を対象とした。実験 1. で開発した創傷酸素分圧可変モデルを用いて、創傷面積を経時的(創傷作成直後、1、3、5、7 日目)に評価した。また 7 日目の組織を採取し、HE 染色および免疫染色(CD34)を行い、肉芽の厚さおよび肉芽中の血管密度を評価した。

#### <創傷面積の評価>

創傷面積は透明フィルム上に創傷をトレースし、スキャナー (ES 10000G<sup>®</sup>: EPSON 社) に取り込み、画像解析ソフト(beta 4.02 version; Scion Corporation, Frederick, MD, USA)を用いて算出した。創傷面積の縮小率(以下、相対創面積)を(各日目の創傷面積/創傷作成直後の創傷面積)(%)と定義し1、3、5、7 日目の創縮小率を算出した。

#### <組織学的および免疫組織学的検討>

7日目に創傷をその周辺組織と共に筋層を含めて鋭的に採取した。採取した組織は、ホルマリンフリー溶液にて固定し、パラフィン包埋した。創傷中央部を含む部位を4μmに薄切し、ヘマトキシリンエオジン染色した。Win Roof version 5.5 (Mitani Corporation, Japan) softwareを用いて組織像を得、左右の創傷縁と創傷部中央の肉芽の厚さを計測し、その平均値を肉芽の厚さとして算出した。また同部位の4μmの薄切片を、血管内皮細胞を染色する抗CD34抗体で免疫染色し、血管を識別した。染色した画像より同様の画像解析ソフトを用

いて血管内腔と肉芽の総面積を測定し、肉芽組織における血管内腔の占める割合を血管密度として算出した。

#### <統計学的評価>

酸素分圧および創傷面積の経時的変化の2群間比較には2元配置分散分析を、血管密度や肉芽の厚さの2群間比較にはPaired Student-t testを用いた。統計解析にはSPSS15.0J (IBM, USA)を用いた。P < 0.05で統計学的有意差ありと判断した。

## 結果

### 実験1.

酸素透過膜または酸素不透過膜で被覆した被覆化創傷周囲の酸素分圧の経時的変化は有意に異なり、被覆後数時間から実験終了時まで酸素透過膜で被覆した創傷は100-140mmHgと大気酸素分圧に近い酸素分圧(以下、大気圧酸素群)であったのに対し、酸素不透過膜で被覆した創傷は10-30mmHgと極端な低い酸素分圧(以下、低酸素群)であった。

### 実験2.

正常マウス：低酸素群では大気圧酸素群と比較して、有意に高い血管密度(低酸素群 vs. 大気圧酸素群:  $0.046 \pm 0.025$  vs.  $0.011 \pm 0.008$  mm<sup>2</sup>/mm<sup>2</sup>)を認めたが、有意に創縮小は遅延し(低酸素群の7日目/0日目の創傷面積 vs. 大気圧酸素群の7日目/0日目の創傷面積:  $27.6 \pm 3.47$  vs.  $11.1 \pm 1.66$  %)、肉芽組織の厚さは有意に薄かった(低酸素群 vs. 大気圧酸素群:  $491.8 \pm 243$  vs.  $2295.3 \pm 180.9$  μm)。

糖尿病マウス：低酸素群では大気圧酸素群と比較して、血管密度に有意差を認めず(低酸素群 vs. 大気圧酸素群:  $0.038 \pm 0.017$  vs.  $0.046 \pm 0.022$  mm<sup>2</sup>/mm<sup>2</sup>, p = 0.80)、有意に創縮小は遅延し(低酸素群の7日目/0日目の創傷面積 vs. 大気圧酸素群の7日目/0日目の創傷面積:  $34.1 \pm 4.98$  vs.  $20.7 \pm 3.64$ )、肉芽組織は有意に低形成(低酸素群 vs. 大気圧酸素群:  $128.7 \pm 42.4$  vs.  $225.7 \pm 54.7$  μm)であった。

## 考察

これまでの創傷と酸素環境に関する vitro の研究では創傷治癒に関わる個々の細胞増殖に最適な酸素環境を検証した報告はあるが、創傷治癒には多種多様な細胞やサイトカインが関与しているため研究結果をそのまま生体創傷における至適酸素環境としてあてはめることはできない。Vivo の研究では、実験動物そのものを低酸素環境や高酸素環境に暴露して検証した報告があるが、呼吸による酸素取り込みが強く影響するため、純粋な創周囲の酸素環境を評価したモデルとは言えない。また創傷局所に直接酸素を投与したり、酸素不透過膜で低酸素環境を創出して創傷治癒動態を検証した報告もあるが、創傷周囲の酸素濃度を測定しておらず評価不十分と言える。創傷治療において酸素環境設計は重要な課題にも関わらず、酸素環境が創傷局所に与える影響や至適酸素環境を検証した報告はない。この理由は創傷周囲の酸素環境のみを変化し得る有用なモデルが欠如しているためと考えられる。これは被覆下の酸素分圧のみを変化させ測定する方法がなかったためと考えられ

る。これは被覆下の酸素分圧のみを変化させ測定する方法がなかったためと考えられる。本研究ではリン光プローブによる光学的測定を利用した独自の実験モデルの開発し、被覆下創傷周囲の酸素分圧の評価が可能であった。また酸素透過膜、酸素不透過膜で創傷を被覆することで、大気圧酸素環境、低酸素環境を作成し得た。

酸素は生命活動に必須の要素であり、創傷治癒においても線維芽細胞増殖やコラーゲンの産生・血管新生など様々な過程で関与している。正常な皮膚において角質層は大気からの気体取り込みを防止している。近年、角質が破壊された創傷では、大気からの拡散によって創傷深部まで酸素が取り込まれることが明らかにされている。このため創傷治癒過程には大気と血液を介した酸素供給が影響を与える。

本研究では、正常マウスで低酸素環境で血管新生が促進されたが創縮小や肉芽形成が遅延した。低酸素環境では、大気からの酸素供給が障害され、大気圧酸素環境と比較して酸素不足の状態にあると考えられる。このため低酸素環境における血管新生の促進は酸素不足を補うための生体適応反応と考えられ、臨床においては酸素透過性の創傷被覆材が望ましいことが示唆された。糖尿病マウスを用いた難治性創傷モデルではこの代償的血管新生が減弱していると考えられた。臨床現場で治療に難渋する難治性創傷では、組織再生に対する患者の余力が非常に少なく、不適切な治療が治癒の遷延・増悪ひいては下肢切断に直結しかねない。本研究結果は汎用されている酸素不透過の創傷被覆材が逆効果となる可能性を示唆しており、その使用に警鐘をならすものである。