様式Ｆ－１９

# 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年　4 月　30 日現在

機関番号：11301
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23792534
研究課題名（和文）　褥瘡・難治性皮膚潰瘍の創部炎症反応機構の解明とケア技術の確立

研究課題名（英文）　The analysis of inflammatory responses and effective care in chronic wounds

研究代表者
菅野　恵美（KANNO EMI）
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10431595

研究成果の概要（和文）：全ての慢性皮膚潰瘍には細菌が存在し、炎症反応が遷延する。本研究では炎症反応を遷延させる物質の探索を中心に解析を行った。結果:創傷に緑膿菌を接種すると、受傷24時間をピークとして創部への好中球集積、TNF-α産生が高まった。この緑膿菌接種下の現象には、緑膿菌が合成する細菌間情報伝達物質*N*-(3-oxododecanoyl)-$_L$-homoserine lactoneが関与していた。以上より、慢性皮膚潰瘍の炎症遷延にも緑膿菌homoserine lactoneが関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Several bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa* exist in chronic wounds with prolonged inflammatory reaction. In the present study, using a rat model with full-thickness dermal wounds, we examined the effect of *P. aeruginosa* and quorum sensing (QS) molecules, *N*-(3-oxododecanoyl)-$_L$-homoserine lactone (3-oxo-$C_{12}$-HSL), which is produced by *P. aeruginosa*. Within 3 days, inoculation with *P. aeruginosa* or 3-oxo-$C_{12}$-HSL had accelerated local infiltration of neutrophils and tumor necrosis factor-α. These results indicate that 3-oxo-$C_{12}$-HSL may be involved in induction of inflammatory responses.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合　計 |
|---|---|---|---|
| 交付決定額 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：看護学・基礎看護学
キーワード：看護技術、創傷治癒、感染、炎症、免疫

１．研究開始当初の背景

近年の高齢社会および慢性疾患患者の増加に伴い、褥瘡や下腿潰瘍など難治性皮膚潰瘍を有する患者が急速に増加し、皮膚潰瘍の約3割が重症例であると報告されている。皮膚潰瘍の発症には局所および全身要因が複合的に関連しているため、治療には長期間を要し、莫大な医療費と精神的な忍耐力が必要とされる。皮膚潰瘍が重症化する要因のひとつとして、創部において好中球やマクロファージなど炎症性細胞の浸潤が遷延し、それらが産生するタンパク分解酵素により組織増殖が妨げられる点が挙げられる。しかしながら、創部炎症反応機構の解析は遅れており、慢性皮膚潰瘍における炎症遷延の原因をはじめ、慢性皮膚潰瘍と急性創傷にみられる炎症反応の相

違点に関しても明らかではない。

２．研究の目的

本研究では、急性創傷と慢性皮膚潰瘍の炎症期における相違点の解明を目的とした。特に、慢性皮膚潰瘍で問題となる緑膿菌感染に注目し、創部に緑膿菌が存在する状況下での炎症反応、持続した炎症を導く緑膿菌中の菌体成分に焦点をあて解析を行った。

今回注目した菌体成分は、緑膿菌間の情報伝達物質として緑膿菌が合成する *N*-(3-oxododecanoyl)-$_{L}$-homoserine lactone (3-oxo-$C_{12}$-HSL)である。これまでに、3-oxo-$C_{12}$-HSL が炎症反応に関与することは、熱傷や肺炎などの動物実験モデルを用いた実験により報告されている。

３．研究の方法

（１）情報収集

褥瘡、慢性難治性皮膚潰瘍治療の現状や課題をタイムリーに把握するため、文献検索、資料の収集を実施した。

このため、当該分野（創傷、免疫、看護技術）の学会や研究会へ参加した。

（２）実験計画・実験

ラット創傷実験動物モデルを用い、治癒過程における炎症反応を解明するための計画を立案した。

実験動物の背側皮膚に人工創を作製し、治癒過程における滲出液中の炎症性細胞、サイトカインの解析、創部皮膚組織の免疫組織学的変化を同時に解析し、創内外の関連性を検証する。創部炎症反応の解析は以下の項目について実施した。

① 炎症性細胞の集積数、形態（大学内に設置された全自動細胞解析装置を用いる）

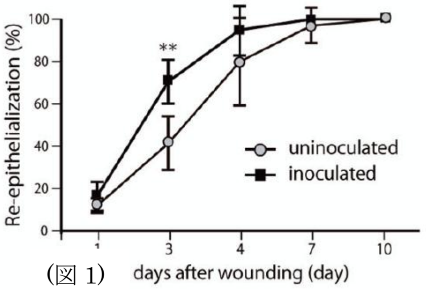
② 創傷からRNAを抽出し、創中の炎症性サイトカインの発現（リアルタイムPCR）

③ サイトカイン産生（ELISA法）

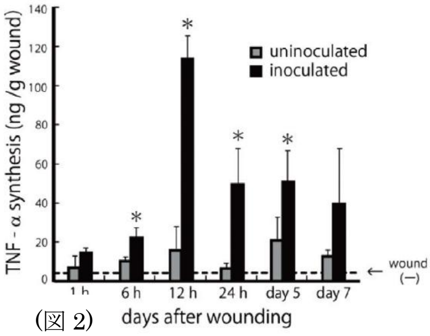
（３）国内外の関連分野にて、研究成果の発表を行い、研究の発展に努めた。

４．研究成果

（１）正常なラットに創傷を作成し、創部に緑膿菌を接種すると緑膿菌非接種のラットに比べ、初期の治癒促進を認めた（図1)。この治癒促進には創部に集積した好中球が産生するTumor necrosisi factor (TNF) －αが関与していた（図2)。

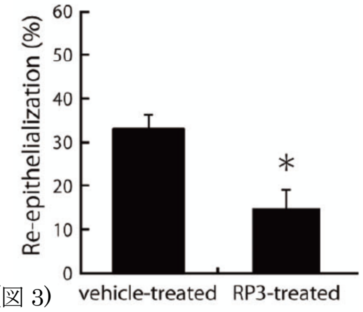


(図 1)

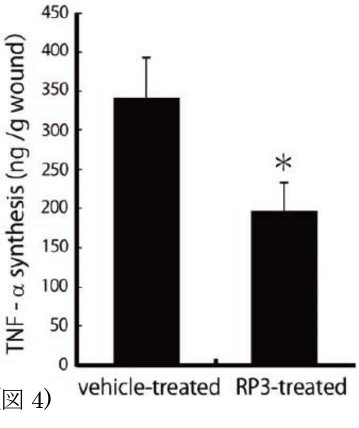


(図 2)

（２）好中球を枯渇させる抗体 RP3 により、好中球を減少させたラットに創傷を作成し、緑膿菌を接種すると、正常ラットでみられた治癒促進現象は認められず、創傷治癒が遅延した（図 3）。この好中球減少ラットでは、TNF-α産生が低下していた（図 4）。

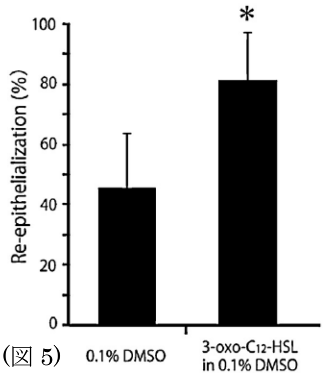


(図 3)

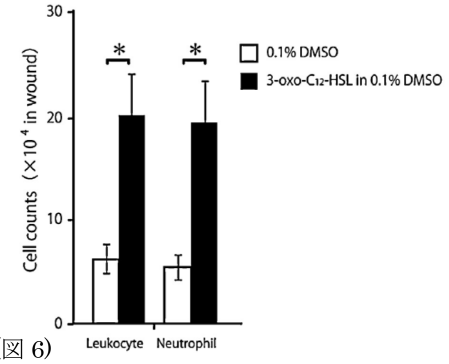


(図 4)

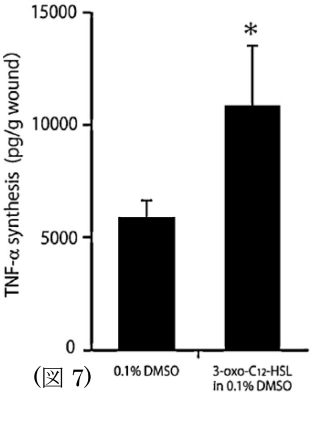
（３）正常ラットで観察された緑膿菌による治癒促進に関与する緑膿菌中の菌体成分として、クオラムセンシング分子に注目し解析を行った結果、
*N*-(3-oxododecanoyl)-$_{L}$-homoserine lactone（3-oxo-$C_{12}$-HSL）が創傷治癒促進（図5）、好中球集積促進効果（図6）、TNF-α産生促進効果（図7）を有することが明らかになった。



(図5)



(図6)



(図7)

（４）まとめと考察
以上の結果より、免疫が低下していない正常なラットでは緑膿菌はむしろ治癒を促進させるが、免疫が低下し、創部に白血球（特に好中球）が集積しない宿主では、緑膿菌により治癒が遅延することが明らかになった。このことより、創傷が慢性化する宿主では、好中球を活性化させることにより、停滞していた治癒過程が進行する可能性が考えられた。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計３件）

１．Emi Kanno, Kazuyoshi Kawakami, Shinichi Miyairi, Hiromasa Tanno, Hirono Otomaru, Arina Hatanaka, Shiori Sato, Keiko Ishii, Denso Hayashi, Nobuhito Shibuya, Yoshimichi Imai, Naomasa Gotoh, Ryoko Maruyama and Masahiro Tachi: Neutrophil-derived tumor necrosis factor-α contributes to acute wound healing promoted by *N*-(3-oxododecanoyl)-$_{L}$-homoserine lactone from *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Dermatological Science, 70: 130-138, 2013. http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.01.004
（査読：有）

２．菅野恵美，丹野寛大，館 正弘：皮膚創傷治癒過程における bFGF 産生への TNF-α の関与．日本褥瘡学会誌，14(2): 113-120, 2012.（査読：有）

３．Emi Kanno, Kazuyoshi Kawakami, Masae Ritsu, Keiko Ishii, Hiromasa Tanno, Souhachi Toriyabe, Yoshimichi Imai, Ryoko Maruyama and Masahiro Tachi. Wound healing in skin promoted by inoculation with Pseudomonas aeruginosa PAO1: the critical role of tumor necrosis factor-α secreted from infiltrating neutrophils. Wound Repair and Regeneration, 19(5): 608-621, 2011. DOI:10.1111/j.1524-475X.2011.00721.x
（査読：有）

〔学会発表〕（計５件）

1．KANNO Emi, TANNO Hiromasa, ISHII Keiko, KAWAKAMI Kazuyoshi: *N*-(3-oxododecanoyl)-$_{L}$-homoserine lactone, a quorum-sensing molecule from *Pseudomonas aeruginosa*, promotes acute wound healing. 第41回日本免疫学会学術集会, 神戸, 2012年12月5-7日

2．菅野恵美, 丹野寛大, 川上和義, 宮入伸一, 石井恵子, 丸山良子, 舘正弘: 緑膿菌クオラムセンシング分子 *N*-butanoyl-$_{L}$-homoserine lactoneが創傷治癒過程に与える影響. 第42回日本創傷治癒学会, 札幌, 2012年12月2-4日

3．Emi Kanno, Kazuyoshi Kawakami, Shinichi Miyairi, Hiromasa Tanno, Keiko Ishii, Denso Hayashi, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi: Skin wound healing promoted by a quorum-sensing moleclue, *N*-(3-Oxododecanoyl)-$_{L}$-homoserine lactone from *Pseudomonas aeruginosa*. 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies (Yokohama, Japan), September 2-6. 2012.

4．Emi Kanno, Kazuyoshi Kawakami, Shinichi Miyairi, Hiromasa Tanno, Keiko Ishii, Denso Hayashi, Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi: Skin wound healing and cytokine response promoted by a quorum-sensing moleclue from *Pseudomonas aeruginosa*. IMMUNOLOGY(Boston, USA), May 4-8. 2012.

5．菅野恵美, 川上和義, 乙丸礼乃, 石井恵子, 丹野寛大, 林殿聡, 丸山良子, 舘正弘: 緑膿菌クオラムセンシング分子による創傷治癒の促進と創部炎症反応の誘導. 第41回日本創傷治癒学会, 名古屋, 2011年12月 5-6日

〔図書〕(計2件)

1．菅野恵美, 舘正弘: 第Ⅴ章 感染症 2. 慢性感染症 Critical colonization. 市岡滋監修, 創傷のすべて. 克誠堂出版, 256-257, 2012.

2．菅野恵美, 舘正弘: 創傷ケアの基礎知識と実践, 第1 章4. 慢性創傷に関する知識, メディカ出版, 31-37, 2011.

〔その他〕
ホームページ等
http://www.snp.med.tohoku.ac.jp/

６．研究組織
(1)研究代表者
菅野　恵美 (KANNO EMI)
東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10431595

(2)研究分担者
(　　)

研究者番号：

(3)連携研究者
(　　)

研究者番号：