

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10028

研究課題名（和文）細胞死に注目した熱傷治療の新規開発

研究課題名（英文）New development of burn treatment focusing on cell death

研究代表者

松浦 喜貴（Matsuura, Yoshitaka）

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70772383

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：熱傷ラットモデルにおいて、ベタメタゾン軟膏での初期治療はburn wound progressionを予防することが示唆された。その病理組織学的検査においては細胞死の1つであるアポトーシスが熱傷との境界付近に多いことが確認はできたが、burn wound progressionとの関連は明らかなものではなかった。また、熱傷の新規治療としてシルクエラスチンスポンジを用いたの研究も行った。シルクエラスチンスポンジはコントロール群と比較して、早期の上皮化、肉芽形成、創治癒に優れ、そのメカニズムの1つとして血管新生を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

熱傷治療は、創部を早く治癒させることが救命につながるが、熱傷の進行を予防するという観点も重要である。創傷治癒を早める目的でのシルクエラスチンの使用は有用であり、また、熱傷の進行予防にはステロイドの1種であるベタメタゾン軟膏の初期使用も有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In a burn rat model, initial treatment with betamethasone ointment was suggested to prevent burn wound progression. Although histopathological examination confirmed that apoptosis, a type of cell death, was prevalent near the boundary with burn wounds, the relationship between burn wound progression and apoptosis was not clear. We also conducted research using silk elastin sponge as a new treatment for burns. Compared to the control group, the silk elastin group was superior in early epithelialization, granulation formation, and wound healing. Angiogenesis on burn wound was confirmed as one of the mechanisms under use of silk elastin.

研究分野：熱傷

キーワード：burn wound progression apoptosis silk elastin wound healing

1. 研究開始当初の背景

熱傷治療において熱傷の深さは重要であり、深さによって治療方法が異なってくる。一度、二度、三度に分けられ、一度熱傷までは保存的治療は可能であるが、二度熱傷ではデブリードマンや植皮術が必要となる。また、熱傷は深達度が深くなることもあり、burn wound progression と呼ばれる。先行研究において、真皮の主細胞である線維芽細胞を用いた *in vitro* の実験では、41℃、46℃、55℃ と温度が上昇すれば、ネクローシスが多くなった。アポトーシスについては、中間の温度ではあるが 46℃ が一番多くみられた。つまり、ネクローシスとアポトーシスが生じる温度に違いがあった。熱傷境界部を観察するモデルにおいては、熱傷温度が下がる境界にアポトーシスが多くみられた。そして、ベタメタゾンを投与することによってこのアポトーシスが減少し生細胞が多くなることを示してきた。このアポトーシス抑制効果が burn wound progression の予防につながるのであれば、新規治療としての応用できるのではないかと考えるに至った。熱傷の組織においては、熱傷中心部より凝固帯、うっ血帯、充血帯の分類が重要である。うっ血帯については、その運命は 48 時間以内に決まり 3-5 日で壊死すると言われてきた。ゆえに臨床の場では、早期のデブリードマンの有用性も示されてきた。組織の熱傷進行は、浮腫、炎症やサイトカイン、微小血管の閉塞、感染などが挙げられる。また、熱傷の組織標本においても毛包部にケラチノサイトのアポトーシスが生じることは示されているものの、アポトーシスと burn wound progression の関連はわかっていない。

熱傷治療として、新規治療材のシルクエラスチンスポンジについても注目してきた。シルクエラスチンは、シルクとエラスチンの配列を繰り返した人工のたんぱく質であり、創傷治療効果が期待できる。今までに、動物実験において皮膚欠損や褥瘡モデル、糖尿病性の難治性モデルにおいて創傷治療効果を確認してきた。肉芽形成や上皮化を促進するといった創傷治療に貢献するのみではなく、感染を抑制する効果も期待できる。そのメカニズムとして、創傷内へのマクロファージの誘導があり、報告されてきた。また、シルクエラスチンスポンジについては下肢難治性皮膚潰瘍の医師指導治療も行われ、臨床の場でも創傷治療効果を確認してきた。とくに肉芽形成が良好であった。熱傷治療においては、感染予防や感染制御が非常に重要である。熱傷が小範囲であっても、感染し敗血症となり全身への影響を与えることもある。熱傷治療は感染症との戦いであり、感染制御は救命のためにも非常に重要な側面を持つ。創傷治療促進と細菌増殖抑制効果が期待できるシルクエラスチンは熱傷治療にも有用ではないかと考えてきた。

2. 研究の目的

ラット熱傷モデルを用いて、burn wound progression の経時的観察を行い、ベタメタゾン軟膏投与しアポトーシス抑制と burn wound progression の抑制効果について検証する。

ラット熱傷モデルを用いて、新規治療材のシルクエラスチンの治療効果とその治療促進のメカニズムを検証する。

3. 研究の方法

まず、ラットに腹腔内麻酔を十分に行い、熱傷作成装置を用いてラットの背部に径 8mm の熱傷を作成した。深達性一度熱傷モデルの設定として 80℃ 4 秒、二度熱傷モデルの設定として 80℃ 10 秒を用いた。この熱傷作成装置を使用した熱傷モデルについての深さの設定は、すでに報告されているものである。深達性一度熱傷と二度熱傷モデルを用いた理由は、臨床の場では重要になるのは深さであり、時間経過して深達性一度熱傷が二度熱傷に移行することもまれではない。グルココルチコイドの一種であるベタメタゾンを含有する軟膏を毎日投与して、burn wound progression の抑制効果について検証を行った。作用としてベタメタゾンによる抗アポトーシス効果と抗炎症効果を期待するものである。熱傷直後よりベタメタゾン軟膏 0.1ml (ベタメタゾン 0.12 mg) を連日に軟膏塗布して投与し、ドレッシングした。コントロール群は毎日ワセリン軟膏を投与し同様にドレッシングを行った。そして熱傷受傷後 2 日目と 5 日目のラット皮膚熱傷部の皮膚を採取して、HE 染色の標本作製した。組織は円の中央を通る断面で作成した。組織標本において、熱傷部断面の熱傷面積を測定した。またアポトーシスをみるべくタネル法にて染色した病理組織標本も作製し、標本組織内のタネル陽性細胞(茶色に染色)をカウントして検証を行った。ベタメタゾン軟膏を使用したものをベタメタゾン群、ワセリン軟膏を用いたものをコントロール群として、熱傷面積、タネル陽性細胞について 2 群比較を行った。

同様の麻酔と熱傷作成装置を用いてラットの背部に径 8mm の熱傷を作成した。深達性一度熱傷モデルの設定として 80℃ 4 秒、二度熱傷モデルの設定として 80℃ 10 秒とした。それぞれの設定で熱傷創の早期デブリードマンを行い、直後にシルクエラスチンスポンジを貼付し、さらにフィルムドレッシングを行い、経時的に創傷治療について検証した。コントロール群として、デブリードマン後にシルクエラスチンなしでフィルムドレッシングを行ったものを用いた。このシルクエラスチン群とコントロール群との 2 群比較を行った。評価は、創収縮、上皮化長、肉芽形成面積とした。深達性一度熱傷では、5 日目と 7 日目においてマ

ク口写真での創部収縮率を計算した。計測には、イメージJを用いた。背部から採取した熱傷部の皮膚はHE染色を行い、標本での上皮化長を検証した。熱傷境界部からの伸びた上皮の長さを測定した。深達性 度熱傷において、この創部収縮と上皮化長をシルクエラスチン群とコントロール群の2群比較して解析を行った。また、 度熱傷では7日目と14日目でのマクロでの創部収縮、病理組織標本での上皮化長、肉芽形成面積について検証した。肉芽形成の範囲の最深部に目安として、膜様筋を用いた。また、 度熱傷の7日目において、血管新生をみるべく von Willebrand Factor での血管内皮を免疫染色した。創部収縮、上皮化長、肉芽形成面積、新生血数について2群比較した。

4. 研究成果

熱傷 2 日目では病理組織標本の熱傷面積では、深達性 度熱傷と 度熱傷ではベタメタゾン群とコントロール群での有意差は認めなかった。5 日目では深達性 度熱傷では2群間の有意差は認めなかったが、 度熱傷ではベタメタゾン群で有意に熱傷面積が小さかった。また、タネル法の標本では、深達性 度熱傷、 度熱傷の2日目、5日目のタネル陽性細胞数はベタメタゾン群とコントロール群では有意差は認めなかった。タネル陽性細胞が熱変性によりわかりにくいという問題もあった。そのため、タネル陽性細胞の検証が不十分となり、burn wound progression との関連を検証するには正確性と客観性に欠けると思われた。

度熱傷では、ベタメタゾンにより burn wound progression を抑制する可能性が示唆された。しかし、これは垂直方向(深部への)の広がりを抑えているのではなく、水平方向への広がりを抑えているものであった。また、アポトーシス陽性細胞の数と burn wound progression のとの関係は示すことはできなかった。

深達性 度熱傷において、創部収縮では、シルクエラスチン群ではコントロール群と比較して5日目では有意に収縮率が良かったが、7日目ではほぼ同程度に治癒していた。上皮長でも同様な結果で、5日目ではシルクエラスチン群の方が有意に良く、7日目では有意差はなかった。これは7日目では、コントロール群もシルクエラスチン群もすでに治癒しているためと考えられた。初期の段階で、シルクエラスチンは熱傷モデルの創傷治癒を促進することが示すことができた。また、 度熱傷モデルでは創部収縮は7日目でシルクエラスチン群が有意に収縮していたが、14日目では有意差は認めなかった。上皮化長では、7日目と14日目ではシルクエラスチン群の方が有意に良かった。肉芽形成においても、7日目と14日目ではシルクエラスチン群が有意に良かった。 度熱傷モデルにおいても早期の創傷治癒を促進する結果が得られた。14 日目では、コントロール群とシルクエラスチン群では同程度に治癒はしているが、シルクエラスチン群では肉芽形成が有意に多いことから瘢痕の違いを示唆しているのではないかと考えられた。また、血管内皮を染色する von Willebrand Factor 染色では、シルクエラスチン群の方が血管数は有意に多く認めた。この血管新生の多さが、早期の創傷治癒促進に寄与している可能性が考えられた。シルクエラスチン群では早期の治癒傾向を示し、そのメカニズムとして血管新生が寄与している可能性が考えられた。また、 度熱傷モデルにおいての瘢痕の違いは、興味深い結果となっており、実臨床で瘢痕抑制する可能性があり、さらなる検証が必要である。また、今回の実験では、熱傷モデルにおける感染制御に対する評価ができていない。しかし、今までの実験では in vitro と in vivo の両方でシルクエラスチンによるマクロファージ遊走が報告されてきた。褥瘡モデルにおいて、シルクエラスチンを用いることで膿瘍形成が少なくなることが示されている。これらを勘案すると、熱傷創でも十分に感染制御できる可能性があり、創傷治癒促進効果を合わせもつシルクエラスチンは有用と思われる。

研究成果は、タイトル Silk-elastin sponge is effective for burn therapy after surgical debridement で Journal of Surgical Research に論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松浦 喜貴
2. 発表標題 ベタメタゾンは熱傷深達を予防できるか～in vivo および in vitro熱傷モデルを用いた研究
3. 学会等名 日本熱傷学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------