

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2016

課題番号：23792562

研究課題名(和文)褥瘡の予後予測に関する基礎研究 - 生体高分子マーカーを活用したツール開発に向けて -

研究課題名(英文)Fundamental research on prognostic prediction of pressure ulcers

研究代表者

新井 直子 (Arai, Naoko)

帝京大学・医療技術学部・准教授

研究者番号：10432303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：褥瘡(いわゆる床ずれ)の予後予測につながる創部アセスメントに生体高分子の活用を目指し、褥瘡創部から採取した浸出液の中に含まれる、創傷治癒に関連すると考えられるタンパク質を検討し、それらの検出量と褥瘡創部の質的な状態について検討した。その結果、matrix metalloproteinase-9およびbone morphogenetic protein-6の検出量と、褥瘡創部の臨床的所見とおよびDESIGN-Rの項目に関連性を見いだすことができた。このことから、MMP-9およびBMP-6は創の質的状态を判断するために有効な高分子マーカーであり、アセスメントツールとして活用が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to utilize the biopolymer to evaluate the wound leading to prediction of the pressure ulcer prognosis, we considered proteins considered to be involved in wound healing contained in exudate collected from the wound of pressure ulcer. As a result, it was possible to find a relationship between detection amounts of matrix metalloproteinase-9 and bone morphogenetic protein-6 and some of the DESIGN-R scores. From these results, it was shown that MMP-9 and BMP-6 are effective polymeric markers for judging the qualitative state of wounds and can be used as an evaluation tool.

研究分野：看護学

キーワード：褥瘡 アセスメント MMP-9 BMP-6

## 1. 研究開始当初の背景

平成 22 年度報告の我が国の 65 歳以上の高齢者人口の割合(対総人口)は 22.7%であり、超高齢社会となっている<sup>1)</sup>。褥瘡は寝たきり高齢者や重症患者に発生する皮膚の傷害であり、慢性化しやすく、その発生は、対象者の身体的苦痛のみでなく、介護量や医療費の増加など社会・経済的な負担となる。そのため、褥瘡対策は現在の医療における重要な関心事のひとつとなり、1990 年代後半より国家レベルでの対策がなされてきた。しかし、褥瘡対策がなされている現状においても褥瘡を有する患者は少なくなく、特に在宅医療現場では褥瘡患者が多く存在している<sup>2)</sup>。皮膚欠損を伴う褥瘡はその欠損部位の深さに伴い難治性となり、治癒期間は大幅に延長する<sup>2,3)</sup>。そのため、褥瘡対策には予防に加えて発生した褥瘡の治癒促進も重要な要素であり、治癒促進には、褥瘡発生の初期段階での適切な対策が鍵となり、そのためには適切なアセスメントが必須となると考える。

現在わが国で用いられている主要な褥瘡治癒評価指標は、2008 年改訂版褥瘡経過評価用 DESIGN - R である。この評価指標の原則は治癒過程を評価するためのツールであり、治癒経過をモニタリングするために用いられるもので、現在目の前にある褥瘡の予後予測という視点に立ったものではない。

急性期の褥瘡は局所病態が不安定であり、不可逆な阻血性障害が組織のどのレベルまで及んでいるか判定することは難しい。実際臨床では、発生時は真皮までの損傷が、時間の経過と共に皮下組織を超えた深い褥瘡となることも、経験されることがある。一方、慢性化した褥瘡に対するケアの選択は、前述したツールを用いた創のアセスメントおよび全身状態のアセスメントを基に決定されるが、予後予測はできない。そのため、今見ている褥瘡が治癒に移行しているものなのか、さらに悪化する可能性があるのかを判断できず、ケア・治療が不十分または過剰となりうるケースもある。これらのことから、褥瘡を持つ患者の状態に応じ、経済的にも効率のよい、最適なケア・治療を提供するためには、急性期・慢性期どちらにあっても、褥瘡創部の適切な予後予測が鍵となると考える。加えて、医療者の経験・アセスメント能力如何に関わらず、的確なアセスメントを行うためには、誰もが簡便に創の状態を評価できるツールが必要となると考えた。なお、本研究で用いる「予後予測」とは、未来予想的な意味ではなく、今目の前にある褥瘡が改善傾向にあるか、悪化傾向にあるかを的確に「判断する」ことである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、褥瘡創部の予後予測を視野に、的確な創部アセスメントを行うためのツールとして生体高分子の活用を目指し、非侵襲的に採取可能な褥瘡の浸出液中の褥瘡

の治癒に関連していると考えられるタンパク質量と、褥瘡創部の臨床所見との関連性を明らかにすることである。

褥瘡の治癒に関連するタンパク質として、本研究ではマトリックス分解酵素 matrix metalloproteinase (MMP) -9 および-13 と、骨形成タンパク質( Bone Morphogenetic Protein , BMP) -6 を対象とした。

## 3. 研究の方法

皮膚損傷を伴う褥瘡 (NPUAP 分類 stage ~ ) を有する患者の褥瘡創面から、非侵襲的に創傷液(以後サンプルとする)を採取した。サンプルをリアルタイム PCR 法にて遺伝子発現の定量および、ウエスタンブローディング法にてタンパク質の半定量を行った。サンプル採取と同時に褥瘡創面を DESIGN - R を用いて評価した(以後創状態)。

### (1) 研究対象者

研究協力の承諾を得られた病院(研究協力施設)内での褥瘡対策チームが関わる治療・ケア対象患者のうち、研究の目的・内容を説明したうえで同意を得られた皮膚欠損を伴う褥瘡を有する患者とした。

### (2) サンプル採取方法

サンプルは、褥瘡回診時、褥瘡創周辺および創部を洗浄後、滅菌された医療用綿棒で創部を拭き取ることで回収した。採取箇所は、創底のうち最も損傷が深い箇所(深さが均一の場合は創中心): a、創縁のうち上皮化・肉芽形成が進んでいる箇所(所見に差がなければ、頭部側): b、創縁のうち治癒が遅延している箇所(所見に差がなければ、尾部側): c の 3 箇所とした。

### (3) 分析方法

#### タンパク・RNA 抽出

Ambion 社の PARIS™ ( Protein And RNA Isolation System ) を用いて、サンプルからタンパク質および RNA を抽出した。サンプル採取した綿棒の軸をカットし、Discription Buffer を 600μl 入れた後、ボルテックスで 30 秒程度攪拌した。その後、液体のみを新しいチューブに移し変え(約 450μl 程度)、さらに RNA サンプル用に 100μl をとりわけ、プロトコルに従って RNA 抽出を行った(RNA 試料)。残りの 350μl 程度はタンパク質試料とした。タンパク質試料は、分光光度計( Biochrom 社 CO7500B )にて定量を行った。

#### 遺伝子発現解析

RNA 試料から、invitrogen 社 cDNA 合成キット( SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit )を用いて cDNA を作成し、リアルタイム PCR を行い、骨形成タンパク質( Bone Morphogenetic Protein , BMP) -6 遺伝子の発現量を定量した。BMP-6 は研究者がこれまでに線維芽細胞への加圧刺激によって発現を促進されることを In Vitro で確認している遺伝子である。なお、常に発現され細胞の維持や増殖に不可欠な遺伝子で

ある GAPDH を発現量解析のコントロールとして利用した。リアルタイム PCR には、Thermal Cycler Dice® Real Time System II (TAKARA 社) を使用した。

#### ウエスタンブロット法

タンパク質試料 (各サンプル 15  $\mu$ g 等量) を用いてポリアクリルアミド電気泳動を行った後、トランスブロット Turbo システム (Bio-Rad 社) を用いてニトロセルロース膜へ転写した。転写後、マトリックス分解酵素 matrix metalloproteinase (MMP)-9, -13 および、リアルタイム PCR で変動を確認した BMP-6 の抗体を用いて、化学発光法にて検出を行った。ウエスタンブロット法による各ターゲットタンパク質の検出結果を、サンプル採取部位および創の臨床所見と照合し、創の状態に合わせて各タンパク質の検出量に差があるか、どのような傾向となっているかを確認した。

#### (4) データ解析

タンパク質分析のための電気泳動ゲル写真のバンドの濃度測定には、画像処理ソフトウェア ImageJ (アメリカ国立衛生研究所: NIH) を用いた。スタンダードの値を 1 とし、各サンプルの値はその比で示し解析を行い、有意水準 5% 以下を有意差ありとした。

#### (5) 倫理的配慮

研究対象者には、研究の目的・方法・個人が特定されない配慮を行う等を口頭と文書で提供した上で、参加を承諾した者のみを対象とした。また高齢・疾患・病状などにより意思疎通のはかれない対象の場合は、家族に同様の説明を行い、同意を得られた者のみを対象とした。なお、研究者の所属する組織の研究倫理委員会の承認後、研究協力施設の倫理審査委員会の承認を得た後に実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 遺伝子発現解析

RNA サンプルの検討結果から、BMP-6 の遺伝子発現において、遺伝子発現およびサンプル間での発現の変動を認めた。このことは、生体の創部においても BMP-6 が何らかの機能を果たしている可能性を示唆していると考えた。また、遺伝子発現によりタンパク質の発現も誘発していると考え、タンパク質分析は可能であると判断した。

### (2) タンパク質分析 (採取部位別比較)

MMP-9 において、b では他の 2 箇所 (a, c) に比して MMP-9 の発現が少ない傾向が認められるが、創によってはその傾向を認めない場合があった。BMP-6 においても、同一創内において各採取部位 (a, b, c) では検出量が異なった。また、採取部位が同一であっても、採取日 (つまり創状態) が異なるとその検出量に差を認めた。しかし、いずれの値においても創により検出量にばらつきがあり、a, b, c 各群間での平均値に有意差を認めなかった。そのため、両者ともに、質的な評価基準の検討が必要であると考えた。対象となる創面の

状態が異なった場合においても、全てのサンプルに対して同一の質的評価を行うためには、創部の写真および DESIGN-R での各項目の評価を参考に、サンプル採取部位の質的な評価 (分類) 基準を新たに検討する必要があると考えた。

以上のことから、永井ら<sup>4)</sup>の記載潰瘍学による局所所見の観察・記載内容を参考に、褥瘡創面を分類 A「肉芽発達不良部位 (壊死および不良肉芽の存在含む)」、分類 B「収縮しない創縁部位」、分類 C「良性肉芽部位」、分類 D「創部の上皮化促進状態・創縁収縮部位」、分類 E「再表皮化部位」の 5 項目に分類し、MMP-9 および BMP-6 の検出量を検討した結果、MMP-9 と BMP-6 のタンパク質発現には弱い相関を認め、褥瘡創部に存在する MMP-9 と BMP-6 のタンパク質発現量は、有意に関連していることが明らかとなった。

また、分類 A「肉芽発達不良部位 (壊死および不良肉芽の存在含む)」および分類 B「収縮しない創縁部位」では、MMP-9 と BMP-6 の両者が高いレベルでのタンパク質発現となり、分類 E「再表皮化部位」においては両者が低いレベルの発現が確認できた。その一方で、分類 C「良性肉芽部位」および分類 D「創部の上皮化促進状態・創縁収縮部位」では MMP-9 と BMP-6 での発現の傾向が異なった。分類 D「創部の上皮化促進状態・創縁収縮部位」における MMP-9 と BMP-6 の発現量には相関はなく ( $r=0.174$ )、MMP-9 の発現量が高い場合に、BMP-6 の発現量が低いとは言えないという結果となった。しかし、“MMP-9 が高いレベルかつ、BMP-6 が中程度のレベル”である傾向にはあった。

以上より、MMP-9、BMP-6 の発現が高いレベルの場合は、治癒が遅延している傾向にあると判断でき、MMP-9、BMP-6 がともに低いレベルの場合は、創傷治癒終盤であると判断できると考える。MMP-9 が高いレベルかつ BMP-6 が低～中レベルの場合は、創傷治癒が促進されていると判断できる。

なお、MMP-13 においては、検出量が微量であり、アセスメントツールへの活用には不向きであると判断した。

### (3) タンパク質分析 (DESIGN-R の得点との比較)

本邦で褥瘡創部のアセスメントに主に用いられている DESIGN-R は、褥瘡の深さ (Depth)、滲出液 (Exudate)、サイズ (Size)、炎症・感染 (Inflammation / Infection)、肉芽組織 (Granulation tissue)、壊死組織 (Necrotic tissue)、ポケット (Pocket) の各項目について数値にて評価する褥瘡治癒評価指標である。しかし、DESIGN-R の各項目の評価は、測定用具を用いずに判断するものが多く、観察者の観察力や主観に委ねられる傾向にある。そのため、DESIGN-R の評価の補足としてタンパク質量が活用できるかについて、検討した。

その結果、MMP-9 のタンパク質検出量と

DESIGN-R の各項目の得点との相関関係は，“創底”での値と，DESIGN-R の Depth(深さ：D)項目で中程度の正の相関( $r=0.43, p=0.05$ )を認め，Exudate(浸出液：E)と，Granulation tissue(肉芽組織：G)項目である程度の正の相関( $r=0.35, p<0.05$ および $r=0.31, p<0.05$ )を認めた。また，BMP-6 のタンパク質検出量と DESIGN-R の各項目の得点との相関関係は，“創底”において Poket(ポケット：P)項目との間で，ある程度の正の相関を認めた( $r=0.31, p<0.05$ )。“創縁”では，P 項目との間で弱い正の相関( $r=0.26, p<0.05$ )を認めた。

(4) タンパク質分析 (DESIGN-R での重症度での検討)

前述した DESIGN-R は，褥瘡の重症度を各項目の大文字 / 小文字で分けて表記ができる特徴がある。すなわち，小文字は軽度，大文字は重度であることを示し，褥瘡創部を経時的に比較・評価するには有用である。そのため，DESIGN-R の重症度による各タンパク質の検出量を比較検討した。

その結果，MMP-9 においては，“創底”では D 項目で，軽度(d：真皮までの損傷)より重度(D：皮下組織から深部)のほうが有意に MMP-9 の検出量が多かった( $p<0.01$ )。“創縁”では，有意な差を認めなかった。また，BMP-6 においては，“創底”において P 項目で軽度(p：なし)と重度(P：あり)の間で有意な差を認めた( $p<0.05$ )。“創縁”では，Necrotic Tissue(壊死組織：N)項目の軽度(n：なし)と重度(N：あり)の間と，P 項目の軽度(p：なし)と重度(P：あり)の間で有意な差を認めた(いずれも  $p<0.05$ )。つまり，P および N 項目では，軽度より重度のほうが BMP-6 の検出量が有意に多い結果となった。

以上のことから，MMP-9 および BMP-6 は創の質的狀態を判断するに有効な高分子マーカーであり，アセスメントツールとして活用可能であることが示唆された。

#### <引用・参考文献>

- 1) 内閣府 共生社会統括官：平成 22 年版高齢社会白書。2-4, 2010.
- 2) 日本褥瘡学会調査委員会：褥瘡対策未実施減算導入前後の褥瘡有病率とその実態についてのアンケート調査報告。日本褥瘡学会誌，8(1)，92 - 99，2006。
- 3) 関根祐介，明石貴雄，南雲珠恵，他：入院医療費包括評価制度における褥瘡治療費の現状。日本褥瘡学会誌，9(1)，50-55, 2007.
- 4) 永井弥生，磯貝善蔵，古田勝経他 (2009)。褥瘡に対する記載潰瘍学の確立とその有用性。日本褥瘡学会誌，11(2)，105-111.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

新井直子，米田雅彦：褥瘡アセスメントツール開発に向けた基礎的研究 - 生体高分子マーカーの活用を目指して - . 日本看護科学学会誌，査読有，36，138-146，2016 .

DOI : <http://doi.org/10.5630/jans.36.138>

〔学会発表〕(計 1 件)

Naoko Arai, Hisako Matsumoto, Yoshiko Takahashi, Zenzo isogai, Masahiko Yoneda : BMP-6 specifically induced by pressure force in cultured fibroblast is present in wound fluid of pressure ulcer .

4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies ,Yokohama .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

新井 直子 (NAOKO ARAI)

帝京大学医療技術学部看護学科・准教授

研究者番号：10432303