

氏 名： 新井 直子  
学位の種類：博士（看護学）  
学位記番号：看甲第6号  
学位授与年月日：平成25年3月20日  
学位授与の要件：学位規則第15条第1項該当  
論文題目：生体高分子マーカーによる褥瘡アセスメントツールに関する基礎的研究  
学位審査委員： 主査 米田 雅彦 教授  
副査 鎌倉やよい 教授  
副査 古田加代子 准教授  
副査 越川 卓 教授  
副査 小松万喜子 教授

#### 論文内容の要旨

##### 【研究背景と目的】

褥瘡は長期臥床患者などに発生する皮膚の傷害であり、その治癒は長期にわたるため、予防と共に発生した褥瘡への治癒促進が重要となる。褥瘡の治癒促進には、発生初期段階での適切な対策が鍵となり、適切なアセスメントが必須となる。現在の褥瘡のアセスメントには DESIGN-R が主に用いられているが、これは褥瘡の深さ、滲出液、サイズ、炎症・感染、肉芽組織、壊死組織の各項目を数値化し創部を評価するものである。しかし、各項目の評価・判断は、観察者の視覚に頼るものが多く、創部の判断は熟練者に頼らざるを得ない状況にある。

褥瘡創部における生体反応の詳細は完全には明らかにされていないが、関連する遺伝子やタンパク質については様々な研究がなされている。そのうち、これまでの研究によって褥瘡発生に関与する可能性を示してきた、細胞外マトリックス (ECM) を分解するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 類に着目した。MMP は、ECM を分解する機能から、創傷治癒および創傷治癒遅延どちらにも関与する生体高分子である。また、MMP 類のいくつかは褥瘡との関与は示されているものの、詳細は明らかになっていない。研究者は、発生した褥瘡が治癒に向かうか否かは MMP 量に依存する、つまり、MMP の濃度を判定することで、組織の修復（褥瘡の治癒）もしくは組織の分解（褥瘡の悪化・治癒の遅延）いずれかの方向に向かっているかを見極められる、つまり“的確なアセスメント”が可能となるのではないかと考えている。また、創部の的確なアセスメントは、予後の予測につながると考える。

そこで、褥瘡創部の的確なアセスメントおよび創部アセスメントに続く予後予測に関するツールとしての生体高分子マーカーの活用を目指し、非侵襲的に採取可能な褥瘡の浸出液中の MMP-9、MMP-13、褥瘡に関連すると考える骨形成タンパク質 (BMP) -6 のタンパク質量の分析と、褥瘡創部の臨床所見および褥瘡の経過との関連性を明らかにすることを目的に検討を行った。

## 【研究方法】

### 1. 研究対象

研究協力施設内での褥瘡対策チームが関わる患者のうち、研究の目的・内容を説明したうえで同意を得られた、皮膚損傷を伴う褥瘡を有する患者を対象とした。

### 2. データ収集方法

対象の褥瘡創面から、非侵襲的に創傷液（以後サンプルとする）を採取した。同一患者の創であっても経過により状態は異なり、創面は多様な病態を呈するため、視覚的臨床所見から、創中心（最も損傷が深い箇所）・創縁（上皮化・肉芽形成が進んでいる箇所）・創縁（治癒が遅延している箇所）の3箇所に相当するものを回収した。また、サンプル採取後に創面を確認できるよう、創部の写真を撮影した。なお、創面の状態は個人の属性や状態を反映した結果であることから、各サンプルは創面の状態を反映したものであり、独立したものとして扱うことが可能である。

対象者に関する情報としては、患者基本情報、褥瘡危険因子の評価に関する情報、褥瘡経過に関する情報、血液データ、創部の治療内容を収集した。

### 3. 分析方法

採取したサンプルよりタンパク質およびRNAを抽出した。タンパク質は、ウエスタンブロット法にてMMP-9、MMP-13、BMP-6の抗体を用いて検出を行い、検出結果を採取部位別、臨床所見別に分析した。RNAは、リアルタイムPCR法にて遺伝子発現解析を行った。得られたデータは、GraphPad InStat3（GraphPad Software社）およびSPSS for windows var.16（IBM社）を用いて解析を行った。

### 4. 倫理的配慮

本学での倫理審査の承認後（看22-37）、研究協力者に説明および協力依頼を行った。研究協力者から同意を得られた後、研究協力施設においても倫理審査の承認を得た（23-11）。

## 【結果と考察】

### 1. 対象者

研究参加の同意を得た対象者は32名であり、そのうちサンプル採取・分析が行えた対象者は26名であった。継続したサンプル採取を行えた対象者は9名であり、17名は1回の採取であった。サンプル採取総例数は42例であり、そのうち創面より3か所採取できたのは25例、2か所採取できたのは8例、1か所のみ採取となったのは9例であり、サンプル総数は100個であった。

対象者のうち約7割が男性で、平均年齢は $71.3 \pm 2.43$ 歳であり、基礎疾患には、悪性新生物が最も多く約6割を占め、心臓血管系疾患が次いで多かった。BMIの平均は $18.6 \pm 0.80$ であるが、対象者の約半数は標準基準の18.5未満であった。褥瘡発生場所は、約6割が病院内であり、4割が入院時に既に発症していた。褥瘡発生部位については、約6割は仙骨部位であり、次いで、臀部、尾骨の順に多かった。既存の全国調査と本研究での結果は相違なく、研究対象施設による対象の特異性は認めなかった。

## 2. 分子生物学的・生化学的検討（採取部位別検討）

MMP-9、BMP-6 共にタンパク質の発現量の検出が可能であったが、MMP-13 では検出できず、RNA レベルでの検討を試みた。その結果、MMP-9、BMP-6、MMP-13 いずれにおいても、同一創内の各採取部位では発現量が異なり、創状態によってタンパク質発現が異なる可能性が示唆された。しかし、サンプル採取部位が同一であっても、創の経過により質的な相違を認める場合もあり、発現量に差を認めることも多かった。その結果として発現量にばらつきが生じ、各群間での平均値に有意差を認めなかった。このことから、創部内の相対的評価ではなく、全てのサンプル採取部位に対する同一の質的分類（以後再分類）が必要であると考えた。

## 3. サンプル採取部位の再分類

再分類を行うにあたり、永井らの記載潰瘍学による局所所見の観察・記載内容を参考にし、治癒が良好な状態か否かという視点で、かつ詳細になりすぎないように配慮しながら、観察の視点をまとめた。その結果、A「肉芽発達不良部位（壊死および不良肉芽の存在含む）」、B「収縮しない創縁部位・上皮化遅延部位」、C「良性肉芽部位」、D「創部の上皮化促進状態・創縁収縮部位」、E「再表皮化部位」の5つの創面の特徴を見出せた。

## 4. 分子生物学的・生化学的検討（創状態別検討）

### 1) MMP-9

分類A～Dには有意な差はないが、分類EのMMP-9発現量は低く、特に分類A・Dと比較すると5分の1程度となるという結果となった。この結果より、高いMMP-9の発現は、十分な肉芽や上皮化を認めない急性期以降の創部では治癒遅延を示し、増殖期後半の肉芽形成が完了した後の創部および上皮化に向かう創縁では、正常な上皮形成を示していると考ええる。また、肉芽の発達の際にはMMP-9の発現は抑制される傾向にある可能性が示唆された。分類Eの低い発現は、上皮形成に関与するMMP-9の役割が完了し“創傷治癒の最終段階”を示すと考える。しかし、MMP-9の発現量だけでは、創部の質的な相違を判断することは困難である。

### 2) BMP-6

有意差を認めたのは、分類Aと分類E、分類Bと分類E、分類Bと分類Dであった。分類Cに関しては、該当件数が少ないため統計的には有意差を認めないが、分類A・Bと比して、その発現は低い傾向にあるといえる。分類A、BではBMP-6の高い発現を認め、炎症期から脱していない創ではBMP-6は高いレベルで発現することを示していると考ええる。分類DではBMP-6は中レベルの発現であり、創部の上皮化に関与する細胞の存在と正常な創傷治癒過程を示していると考えられる。分類Eでは低い発現を認め、上皮化に関与する表皮細胞の遊走が完了していること、つまり“創傷治癒の最終段階”を示していると考ええる。

### 3) MMP-9 および BMP-6 の発現量の関連性

MMP-9 および BMP-6 のタンパク質発現量の関係性について検討した結果、統計学的に有意な弱い正の相関関係が認められた。MMP-9、BMP-6 が共に高いレベルの場合は、創中心・創縁いずれにおいても、治癒が遅延している傾向にあると判断できる。MMP-9 が高いレベルかつ BMP-6 が低～中程度のレベルの場合は、創中心・創縁いずれにおいても、創傷治癒が促進されていると判断で

きる。MMP-9、BMP-6 が共に低いレベルの場合は、創傷治癒終盤であり分類 E「再表皮化部位」であると判断できると考える。このことは、MMP-9 および BMP-6 のタンパク質濃度を測定することで、創の質的狀態を判断できることを示している。

#### 4) MMP-13

分類 D、E では発現量が多く、分類 B では発現が少ない傾向にあり、高いレベルの MMP-13 の RNA 発現は、創部治癒促進状態を示す可能性があると考えられる。MMP-13 によって創状態を評価できる可能はあると考えるが、本研究ではタンパク質は検出できず、その発現は非常に少ない可能性がある。そのため、タンパク質検出方法が複雑かつ高額となりうるリスクも十分考えられ、MMP-13 を褥瘡創部の簡便なアセスメントツールに使用するには困難であると考えられる。

#### 5) 経時的検討

継続したサンプル採取を行えた対象者 9 名に対しては、臨床所見と MMP-9 および BMP-6 の発現量について検討した。その結果、多くのケースでは臨床所見と MMP-9・BMP-6 の発現量は一致しており、本研究で示した MMP-9 および BMP-6 のタンパク質発現レベルの関係性は有効であることを示唆している。

以上のことから、MMP-9 および BMP-6 のタンパク質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、褥瘡創部のアセスメントツールとして活用できると考える。また、本研究により MMP および BMP の分泌を加えた新たな褥瘡治癒モデルを提唱する。

### 論文審査結果の要旨

#### 【論文審査及び最終試験の経過】

第 7 回博士後期課程研究科会議（平成 24 年 11 月 14 日）において、予備審査合格の承認を得た新井氏の研究題目に対して、主査：米田雅彦教授、副査：鎌倉やよい教授、古田加代子准教授、越川 卓教授、小松万喜子教授の 5 名が博士後期課程学位審査委員会として選出、承認された。1 月 30 日に博士学位請求論文を審査委員会は受理し、各委員は精読の上、愛知県立大学大学院看護学研究科学位審査規程第 13 条および愛知県立大学大学院看護学研究科博士後期課程の学位に関する内規 14 条と 16 条に基づき論文審査を平成 25 年 2 月 4 日に約 1 時間行った。副論文として「培養筋管細胞は加圧刺激によってサイトカイン遺伝子を発現する」日本褥瘡学会誌（2006）8 巻 4 号 566-571 と「3 次元培養ヒト皮膚線維芽細胞は加圧負荷刺激によってアポトーシスを誘発する」日本褥瘡学会誌（2008）10 巻 4 号 520-524 の 2 報を確認した。その後、愛知県立大学大学院看護学研究科博士後期課程の学位に関する内規 17 条に基づき口頭発表および口述試験の最終試験を公開で 2 月 20 日に約 1 時間行った。論文審査および最終試験の結果を持って 2 月 20 日に博士（看護学）学位を授与するに適格かどうかの判定を行った。

### 【論文審査及び最終試験の結果】

近年、日本をはじめとする先進諸国においては、加速する高齢化、医療の高度化などにより褥瘡発生リスクが高まる中で、褥瘡対策は現在の医療における重要な関心事のひとつである。日本では国家レベルでの対策がなされてきたが、褥瘡は予防行動を積極的に行っても発生し、特に在宅医療現場においては、褥瘡を有する療養者が多く存在している。褥瘡の治癒は長期にわたるため、予防対策に加えて発生した褥瘡への治癒促進的な看護ケアも重要な要素である。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。しかし、現状では褥瘡初期の創部に関するアセスメントツールは十分とは言えず、以前の創部と比較して治癒が進んでいるのか否かの判断が中心であり、褥瘡創部の質的な評価は十分ではなく、予後の予測が行えないことが現在の褥瘡ケアの課題である。

論文提出者は、褥瘡発生機序において虚血以外の影響としてマトリックス分解酵素（MMP）の関与に焦点をあてた褥瘡発生モデルを提案した。創傷治癒の炎症から再構築されて修復されるまでの全過程の組織破壊と修復の両方に MMP は関与すると推考し、褥瘡創部から採取した創傷液の MMP 分子を分子生物学的・生化学的に検討することで、創部の適切なアセスメントにむけたツール作成に貢献できると考えた研究であった。褥瘡ケアアセスメントが持つ問題に対して、基礎的研究を持っての切り口は、的確な視点であると審査委員会では判断した。

分析対象分子としては、予備実験過程で褥瘡の浸出液中の MMP-9、MMP-13、BMP-6 に絞り込まれて、対象タンパク質の半定量、RNA 量の定量を行った。ツールとして組織から遊離する生体高分子マーカーの活用を目指したことは、創面の質的狀態を客観的なデータとして活用するのに重要かつ独創的であり、研究目的達成のための研究方法として適切であった。特に BMP-6 を対象としたことは、既存の報告には無く、新規性と独創的なところである。MMP-13 は、創面状態によって RNA レベルの発現量は創部治癒と共に増加するものの、タンパク量が微量であり、アセスメントツールとして活用するには困難であることが判明したが、検出感度を増強すれば使用出来る可能性を示したことは評価に値する。MMP-9 と BMP-6 のタンパク質の抗体を使った検出には、多大なる労力が費やされ、その結果得られた褥瘡試料での MMP-9 と BMP-6 の分析方法の確立は、この分野の今後の研究に価値あるものと思われた。MMP-9 と BMP-6 の分析は、総タンパク量で補正されているが半定量であった。ただ、論文提出者は RNA レベルで変化しない MMP および生体分子を捕まえており、今後の研究でさらなる詳細な補正は可能であると審査会では判断した。

論文提出者は研究計画に従い採取部位別にタンパク質や RNA の分析を行っていたが、統計的な解析の段階でバラツキが大きく有意差を示すことができなかつた。そこで、創面の治癒過程に基づいた質的な区別が必要であるという判断を行い、すべてのサンプル採取部位に対して、永井他（2009）の記載潰瘍学に従い創面の特徴を抜き出した。記載潰瘍学は、皮膚科専門医向けに、「残存組織」「肉芽の色調・形態・性状」「創縁の状態」「周囲の皮膚所見」という 4 つの大項目を設け、さらに細かく組織状態を区別して記述している。サンプルの創面の特徴を基に、看護師が褥瘡創面の観察で得ることの出来るキーワードでチャート化したところ 5 つの共通した創面の状態に分類することができた。その 5 つの特徴は、A「肉芽発達不良部位（壊死および不良肉芽の存

在含む)」、B「収縮しない創縁部位・上皮化遅延部位」、C「良性肉芽部位」、D「創部の上皮化促進状態・創縁収縮部位」、E「再表皮化部位」であった。判断プロセスのチャート化は、精査されれば将来的に臨床で使用する際の手助けになると考えられた。このおおぐくりな分類は、治癒に関して A から E への連続性は無いが E が最も完治に近い状態にある。本研究の目的が、将来的な臨床での看護師による褥瘡創部のアセスメントツールの開発であることを考慮すれば、詳細になりすぎない分類方法は理解できた。この分類の作業は、褥瘡ケアのエキスパートの確認による一応の妥当性を得てはいるが、記載潰瘍学に基づく創の分類の妥当性が指摘された。この指摘については、臨床で活用するための前段階として皮膚科専門医等の検証が必要ということ、論文提出者は既に理解しており、審査委員会としては今後の研究に期待したい。また、予後が明確にならない DESINE-R とは異なり、MMP-9 と BMP-6 の量的な指標による分類グループ間の動きや治癒経過としての観察などの因子を加えることで予後予測が明確になることが今後期待できると審査委員会は判断した。

幾つかの今後の課題を持ってはいるが、研究結果からの結論として、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 が共に低いレベルの場合は、創傷治癒終盤であると判断できた。さらに、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た。このように、創の質的状态の判断には、MMP-9 と BMP-6 のタンパク質は有効であり、アセスメントツールとして活用できると判明したことは、大きな成果であったと判断した。BMP-6 の過剰分泌は炎症性サイトカインと MMP-9 の過剰分泌を誘発させ、治癒遅延の悪循環に陥るという新たな知見が得られたことで、本研究により MMP および BMP の分泌を加えた新たな褥瘡治癒モデルを提唱されたことも大きな成果であったとその価値を審査委員会は認めた。

提出された論文は、背景、結果および考察において、形式も適切であると判断した。予後予測に関して、完成したものを提唱できなかつたが、これは今後の論文提出者のさらなる研究にゆだねるべきだと判断した。今回の結果をベースにしてさらなる展開が期待できる点を重要と審査委員会では判断した。

最終試験の口述試験については、発表は論理的に構成され分かりやすく、質問に対して的確に答えていた。研究の全体像についても、今後の課題も含めて、十分な理解を確認することが出来た。また、今後の研究展開についても今回の研究を基礎にしたものであり、看護研究として発展性も含めて期待できるものであった。

本学位審査委員会は、提出された学位請求論文が博士の学位を授与されるに値するものであり、かつ最終試験の結果から論文提出者の新井氏が褥瘡に関する看護専門領域において十分な学識と研究者としての能力を有するものであると確認したので、博士(看護学)学位を授与するに適格であると全員一致で判断した。