

学位論文要旨

【緒言】

創傷治療において、局所陰圧閉鎖療法(NPWT)や体外衝撃波治療(ESWT)などの機械的刺激を応用した治療法はここ10数年で重要な役割を果たすようになった。また近年では超音波機器を用いた創傷治癒促進の報告もあり、高密度収束超音波(HIFU)や非接触低周波超音波(NLFU)による創傷治療や組織再生の報告も散見される。これらの医療機器は創傷治癒促進効果が認められる一方で、熱などによる疼痛や組織侵襲、感染リスクなどが臨床的にしばしば問題となっている。今回われわれは、これら組織障害を最小限にし、効果・再現性の高い創傷治療機器の開発を目的として、phased array 型の非接触超音波発生デバイスを医療向けに応用開発した。また、本デバイスで急性創傷にどのような効果が得られるか組織学的に評価し、さらにmRNAの測定から機械刺激負荷後の創傷治癒に重要な血管新生のメカニズムの一端を考察した。

【方法】

マウス(C57BL/6J)の背部正中対称に2か所創傷を作成し、右側の創部のみ(治療側)創作成直後から3日間、非接触低周波超音波で1時間継続刺激(40 kHz, 10 Hzバースト周期, 90.6 Pa)を与え、創を時系列(0, 2, 5, 7, 9, 14日目)で上皮化まで評価した。左側の創はデバイスの設置のみで実際に刺激は加えず(コントロール側)、それぞれ創傷治癒評価に上皮化、コラーゲン産生量、新生血管量を評価・定量した。上皮化は創部を高解像度カメラで撮影した後に0日目の創を100%として、上皮化部分をImageJ で算出し上皮化面積率(%)として算出した。コラーゲン染色には4%PFAで固定(前固定)後、凍結切片を作製し、マッソントリクローム染色を行い、血管新生の評価においては検体を新鮮凍結後に4%PFA後固定(後固定)後、CD31抗体に対する免疫蛍光染色で評価した。各計測ポイントでn=5-6の検体を用い、創の中心部を含めた5-6スライド(マッソントリクローム染色: 20 μ m切片、CD-31免疫染色: 10 μ m切片)を画像処理ソフト(オリンパス、カウントアンドメジャー)で創(肉芽)全体に対する、染色領域をそれぞれ%で算出した。

【結果及び考察】

創作成直後の非接触低周波超音波刺激によって、5日目で有意に上皮化の促進がみられた(治療側: $62 \pm 27\%$, コントロール側: $30 \pm 26\%$, $p < 0.05$)。コラーゲン量は5日目以降の創部でデバイス負荷側の産生量が有意に多くなるという結果となった(治療側: $44 \pm 14\%$, コントロール側: $28 \pm 13\%$, $p < 0.05$)。また新生血管量に関しては2日目の創傷早期にデバイス負荷側で有意に上昇することを確認した(治療側: $4.6 \pm 1.7\%$, コントロール側: $2.2 \pm 1.0\%$, $p < 0.05$)。創傷早期(2日目)からの新生血管量が治療側で有意に上昇したことに着目し、われわれは当デバイスが創傷治癒における重要なファクターである可能性を考え、新鮮凍結した肉芽組織からRNAを抽出し、血管新生に重要とされるNotchシグナル伝達系関連遺伝子群(以下Notch関連遺伝子群)と転写因子を測定した。Notch関連遺伝子群は創傷期の血管新生に非常に重要であり、血管新生前駆物質の活性化を介した表皮

や真皮の修復にも関わる。また、既存の報告ではNotch遺伝子が欠損していると、異常な癒痕化から創傷治癒遅延を起こすことも知られており、創傷治癒のプロセスに非常に重要な因子であることが言える。実際にRT-PCRの結果は、2日目治療側でNotch 結合因子Dll1 ($P<0.05$)、5日目治療側でNotch1 ($P<0.05$)の順に一過性の遺伝子増加を示した。この結果は組織染色で2日目から、新生血管量が増加したことも一致した。

【結語】

本研究では、独自に開発した非接触超音波デバイスが創傷治癒過程の早期でNotch関連遺伝子を活性化したこと、創部内での新生血管量を増やしたことから、周期的圧刺激が血管新生を加速する可能性を示した。また、先行した血管新生に遅れて継時的にコラーゲン量の増加や上皮化の促進に貢献することが認められ、従来に例のない周期的圧刺激という機械的刺激を応用した創傷治療法の可能性を見出した。今後の展望として、本デバイスが血管障害を基礎とした糖尿病性潰瘍や動脈閉塞性潰瘍などの慢性潰瘍モデルにおいても奏功する可能性があり、現在実験を継続している。今後さらに、Notch関連遺伝子のノックアウトマウスなどを用いて、デバイスによって加速される血管新生に関わる詳細なメカニズムに焦点を当てて研究する予定である。