

氏 名 おおば じろう  
大場 次郎

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 317 号

学位授与年月日 令和 2 年 3 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程  
生命・臨床医学 専攻

学 位 論 文 題 目  
Ⅲ度熱傷後の全層皮膚切除部位に対する被覆材としての  
のハイパードライヒト乾燥羊膜の応用に関するマウス  
を用いた研究  
(Hyperdry human amniotic membrane application as  
a wound dressing for a full thickness skin excision  
after a third-degree burn injury)

論 文 審 査 委 員

(主査)	教 授	野口 誠
(副査)	教 授	一條 裕之
(副査)	教 授	笹原 正清
(副査)	教 授	清水 忠道
(指導教員)	教 授	奥寺 敬

## 論 文 要 旨

### 論 文 題 目

Ⅲ度熱傷後の全層皮膚切除部位に対する被覆材としてのハイパードライヒト乾燥羊膜の応用に関するマウスを用いた研究

Hyperdry human amniotic membrane application as a wound dressing for  
a full thickness skin excision after a third-degree burn injury : a study in mice

富山大学 医学薬学教育部

生命・臨床医学専攻

危機管理医学講座

大場 次郎

## (目的)

重傷熱傷患者の死因の 75 %が創感染などによる敗血症に由来する。重症熱傷患者の主な死因となる重症感染症は熱傷創部の局所感染から生じるため、創部局所の感染制御は重症熱傷の治療戦略として最重要といえる。最も深達度の深いⅢ度熱傷の局所治療としては、全身管理を行った後、なるべく早期に熱傷部位に対する全層皮膚切除を行い、同部位に植皮術を行う。しかし、植皮術を行うまでの間の全層皮膚切除部位への確立された被覆方法はない。したがって同部位に早期に良好な肉芽組織（移植床）形成を促すことが、早期植皮や閉創につながり、創部局所の感染制御に有効に働くと考える。羊膜はこれまで難治性創傷に対する有用な被覆材として知られてきた。富山大学では、羊膜を特殊な方法で乾燥・滅菌し、保存可能なハイパードライヒト乾燥羊膜 (HD-AM) として、緊急性の高い臨床例にも応用できる道を拓いた。本研究ではⅢ度熱傷受傷後の全層皮膚切除部位に対する HD-AM の有効性を検証するため、肉芽組織（移植床）形成促進効果の有無とその機序について明らかにし、重症熱傷患者の救命率向上に向けた革新的な治療技術を開発することを目的とした。





## (方法ならびに成績)

Ⅲ度熱傷受傷後の全層皮膚切除のマウスモデルを作成した。このモデルでは、熱傷深度が十分であること、さらに 7 日目でも上皮化はしないことを確認した。創部に HD-AM の上皮側を上にしたもの：HD-AM 群、対照として HD-AM を置かないもの：HD-AM(－)群の 2 群を、術後 1 日 (POD1)、4 日 (POD4)、7 日 (POD7) で全層皮膚切除部位に覆った肉芽組織の厚さを比較したところ、HD-AM 群はいずれの時期でも有意に肉芽組織が厚かった。同部位の各種成長因子、細胞遊走ケモカイン、炎症および抗炎症系サイトカインの発現を quantitative RT-PCR を用いて測定した。さらに、各種マーカーの局在を調べるため、免疫組織化学的評価を行った。結果として、HD-AM 群では肉芽組織内と HD-AM 直下に POD1 より細胞浸潤を高率に認めた。HD-AM に残存するサイトカインと足場としての機能によるものと考えられる。HD-AM 群では POD1 から PDGF の発現が有意に高かった、PDGF の分泌に血小板のみならず浸潤してきた細胞も大きく関与していたことが示唆される。これに伴い POD1 より  $\alpha$ -SMA の発現は有意に高く、POD4 から肉芽組織内に多くの線維芽細胞を増生させたと考える。さらに、POD4 では VEGF の発現がより多くみとめ、肉芽組織内により多くの血管新生像がみられた。結果として、HD-AM 群では早期に良好な肉芽組織（移植床）形成が得られた。HD-AM が早期により強く炎症期を惹起した結果、より早くかつスムーズに増殖期に移行すると考えられ、創傷治癒過程での HD-AM の作用が早期に良好な肉芽組織（移植床）形成を促す一助となったと考える。

## (総括)

HD-AM は、Ⅲ度熱傷後の全層皮膚切除部位に対する新たな創傷被覆材として有用であり、重症熱傷患者の救命率向上に向けた治療技術となり得ることが示唆された。

## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	大場 次郎
論文審査委員	職 名 (主査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 教 授	氏 名 野口 誠 笹原 正清 一條 裕之 清水 忠道	   
指導（紹介）教員	奥寺 敬		
(論文題目) Ⅲ度熱傷後の全層皮膚切除部位に対する被覆材としての ハイパードライヒト乾燥羊膜の応用に関するマウスを用いた研究 Hyperdry human amniotic membrane application as a wound dressing for a full thickness skin excision after a third-degree burn injury (論文審査の要旨)			(判定)  合格
<p>目的：重傷熱傷患者の死因の 75 %が創感染などによる敗血症に由来する。重症熱傷患者の主な死因となる重症感染症は熱傷創部の局所感染から生じるため、創部局所の感染制御は重症熱傷の治療戦略として最重要といえる。最も深達度の深いⅢ度熱傷の局所治療は、早期に熱傷部位に対する全層皮膚切除を行い同部位に植皮術を行う以外にないが、植皮術を行うまでの間の創面への確立された被覆方法はない。本研究ではⅢ度熱傷後の全層皮膚切除部位に対し、富山大学で開発したハイパードライヒト乾燥羊膜 (HD-AM)の感染防御被覆材としての有効性を検証するため、肉芽組織（移植床）形成促進効果の有無とその機序について明らかにすることを目的とした。</p> <p>方法：Ⅲ度熱傷受傷後の全層皮膚切除マウスモデルを作成した。創部に HD-AM を添付した：HD-AM(+)群、HD-AM を置かない（対照）：HD-AM(-)群の 2 群とし、術後 1 日（POD1）、4 日（POD4）、7 日（POD7）で受傷部位を採取した。組織学的、免疫組織化学的評価、および各種成長因子、細胞遊走ケモカイン、炎症および抗炎症系サイトカインの発現を quantitative RT-PCR を用いて行った。</p> <p>結果と考察：全層皮膚切除部位に形成された肉芽組織の厚さを比較したところ、HD-AM(+)群ではいずれの時期も有意に肉芽組織が厚かった。HD-AM(+)群では HD-AM 直下および切除部位底部の領域に POD1 より細胞浸潤を高率に認めた。HD-AM に残存するサイトカインと足場としての機能によるものと考えられる。成長因子(TGFβ-1)や細胞炎症ケモカイン(CXCL-5)の mRNA の発現は、POD7 において HD-AM(+)群が HD-AM(-)群よりも有意に顕著な高値を示した。VEGF は POD4 でピークを、PDGF は POD1 からすでに HD-AM(-)群よりも 2 倍以上の高値を一定して発現した。PDGF の分泌に血小板のみならず浸潤してきた細胞も大きく関与していることが示唆される。筋線維芽細胞マーカーである αSMA は POD4 では HD-AM(+)群において有意に発現量が多いものの、それ以降は 2 群間に差がなく、この結果は線維芽細胞の細胞数の増加と相関した。血管内皮マーカーである CD31 の発現</p>			



が HD-AM(+)群において経時的に増加し、かつ HD-AM(-)群より有意に高いことは、POD7 に発現が減少する HD-AM(-)群との大きな違いであった。新生血管数も同様の傾向を示し、これらの結果および肉芽形成量の経時的な増加から、HD 羊膜が良好な肉芽を形成していることが示唆された。

一方で、炎症および抗炎症に関与するサイトカインは炎症性サイトカインである IL6 は POD4 では HD-AM(+)群が有意に高いものの、この時点をピークに減少し、抗炎症サイトカインである IL-10 および COX2 は POD4 から高値を示し、HD-AM(-)群との有意差があきらかであった。M2 マクロファージのマーカーである CD163 の mRNA の発現は POD7 で HD-AM(+)群で有意に高値を示し、肉芽形成部位に瀰漫性に多数存在する組織像と相関する所見であった。

これらのことから、HD-AM の添付により、炎症が急激に強く誘導され、それに続き抗炎症サイトカインの分泌が増加するとともに、線維芽細胞の増成、新生血管の誘導が顕著となり良好な肉芽形成（移植床）が短期間で実施されたことが明らかとなった。Ⅲ度熱傷モデルを用いることで HD-AM が重傷熱傷に対し早期に良好な肉芽組織（移植床）形成を促す一助となっていることが明らかとなった。

HD-AM は、Ⅲ度熱傷受傷後の全層皮膚切除部位に対する新たな創傷被覆材として有用であり、重症熱傷患者の救命率向上に向けた治療技術となり得ることが示唆された。

#### 総括：

本研究で大場次郎君は、マウスⅢ度熱傷モデルを用い、HD-AM の重症熱傷治療における被覆材としての役割を形態学的、分子生物学的に検討した。HD-AM 群は対象と比較して、いずれの時期においても、有意に肉芽が厚いことが観察された。サイトカインなどの発現を見ると HD-AM(+)群では、TGF- $\beta$ 1、CXCL5、VEGF、PDGF が有意に高かった。炎症性サイトカイン（IL6）は POD4 では HD-AM(+)群が有意に高いものの、この時点をピークに減少し、抗炎症サイトカイン（IL-10 および COX2）が POD4 から高値を示した。筋線維芽細胞マーカー（ $\alpha$ SMA）は POD4 では HD-AM(+)群において有意に発現量が多いものの、それ以降は 2 群間に差がなくこの結果は線維芽細胞の細胞数の増加と相関した。血管内皮マーカー（CD31）の発現はいずれの時期においても、HD-AM(+)群が HD-AM(-)群より有意に高いだけでなく、POD7 においては、HD-AM(+)群では継続的に増加するが、HD-AM(-)群では対照的に減少した。新生血管数の推移も同様の傾向を示した。HD-AM が、創傷治癒過程を炎症期から増殖期に速やかに移行させ、線維芽細胞と新生血管が豊富な良好な肉芽（移植床）を早期に形成するように誘導することが明らかである。

以上のことから、HD-AM はⅢ度熱傷において有効な被覆材・足場材となり得ることが示唆された。本研究は、これまで被覆材がなかった重症熱傷に対し感染防御だけでなく、最終的な治療である植皮の生着率の向上を目指し、早期に移植床を形成する事を主眼とした点に新規性があり、臨床的発展性が期待できると考えられた。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。