

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K12074

研究課題名(和文) 深部損傷褥瘡(DTI)における炎症誘導機序の解明と治癒促進ケア技術の確立

研究課題名(英文) Elucidation of Inflammation of Mechanisms and Establishment of Healing Promoting care in DTI

研究代表者

松田 友美(Matsuda, Yumi)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：90444926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：DTIは外表所見より深層の損傷が強く重症化する。発生機序は不明で治療やケアが確立していない。研究の目的はDTIの炎症を制御する初期対応の看護ケアを確立することである。炎症機序解明の実験結果：炎症初期に好中球枯渇群は炎症性サイトカインの産生が好中球以外のマクロファージなどの炎症性細胞を介すると考えられ、対照群より炎症の発生が遅延することが明らかとなった。炎症初期の看護ケア開発：圧迫創モデルマウスに冷/温湿布を貼付し、経過を観察した。予備実験の結果から、冷/温電法の併用により、潰瘍形成の発生頻度と発現率が小さいことを見出した。炎症初期の冷/温電法が創傷の転帰に影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

深部損傷褥瘡DTIは重症化から敗血症など死に至ることもあるため、その創への初期対応による重症化抑制は有用なケアとなる。特に褥瘡は看護・介護職が第一発見者となることが多い。そのため、褥瘡の重症化を抑えることができる初期対応のケアが確立すれば、そのケアの意義と波及効果は非常に大きいと考えられる。本研究成果の初期対応のケアは薬剤等の特別なものではなく、簡便で一般的にも広く実施可能な温電法や冷電法であるため、今回の研究で有用と考えられた方法は今後の研究で臨床に応用しやすいと言える。ただし、臨床への応用にはまだ至らず、電法の時間やタイミング等追加で検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：DTI is more severe with deep injury than with external surface findings. The pathogenesis is unknown, and treatment and care have not yet been established. The purpose of this study was to establish initial response nursing care to control inflammation in DTI. Experimental results to clarify the inflammatory mechanism: In the neutrophil-depleted group, inflammatory cells other than neutrophils were thought to produce inflammatory cytokines in the early stage of inflammation, and the start of inflammation was more prolonged than in the control group. Development of nursing care for an initial response to early inflammation: cold/warm compress was applied to the compression wound model mice. We established the frequency and incidence of ulcer formation were smaller when cold/warm compress was applied in one combination. These results suggest that cold/warm compresses in the early stages of inflammation affect wound outcome.

研究分野：基礎看護学

キーワード：深部損傷褥瘡 DTI 冷電法 温電法 癒痕治癒 好中球 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

深部損傷褥瘡 (Deep Tissue Pressure Injury:

DTI) は、表層 (表皮・真皮) からの見た目より深層 (皮下組織・筋層) で損傷が著しく、損傷の程度は表層からの判定が難しい。そのため表層の色調変化だけの初期は、一見軽症褥瘡と判断されがちだが、深層には既に炎症が惹起されており、翌日以降に遅れて急激な炎症症状を呈する。組織が広汎に壊死崩壊し慢性炎症として難治化褥瘡や敗血症リスクとなり生命を脅かす。長期治療は莫大な費用と労力、患者の気力を奪い QOL が著しく低下する。DTI が起因とみられる重症度の高い褥瘡は未だ報告されており、在宅療養者が急増する将来は甚大な社会問題が予測される。DTI 初期は臨床での組織摘出はできないため、国内・外ともに組織学的報告はなく、超音波エコーやサーモグラフィー像等の創に生じた現象を描出するデータはあるものの、その組織状態の詳細は不明な点が多い。そのため炎症の発生機序は不明である。エコーで損傷を診査し DTI とわかっていても現時点では対症療法以外はない。したがって、炎症の悪化予防対策を開発するために激しい炎症誘導の機序解明と適切なケアの確立は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は DTI による炎症の悪化機序を基盤に炎症悪化を防ぐ初期対応の看護ケアを確立させることである。この目的を明らかにするため下記の 2 段階で研究する。

第一段階：炎症初期に深く関わる好中球の役割に着目し、DTI モデルにおける好中球を中心とした炎症の経過を明らかにする。

第二段階：炎症経過の観察により、炎症抑制/適正な創傷治癒過程をたどるケア介入の探索を目的として罨法の創傷治癒への影響を明らかにする。

第一段階 好中球の機能・役割を明らかにすることを目的とした。

-3. 研究の方法

1) 第一段階実験：マウス圧迫創の初期段階における好中球の役割を明らかにするため好中球を減少させた枯渇群の創傷治癒過程をコントロール群と比較検討した。

麻酔：実験介入の全行程はフォールン吸入麻酔 (導入 2L/m, 手術中 1.5L/m) 下で行った。体毛は電気バリカンを用い背部と腹壁部を剃毛した。致死方法は麻酔下での頸椎脱臼による中枢神経破壊で行った。

実験群：好中球枯渇群は anti-mouse Ly6G モノクローナル抗体 (clone: 1A8, Bio X cell)、対照群は IgG2a 抗体 (clone: C1.18.4, Bio X cell) のアイソタイプを投与した (各群 n=4)。

好中球枯渇動物モデル作製方法：圧迫創を作製する前日、および圧迫創作製後 3 日目に、枯渇群には 1A8 を、対照群には IgG2a を 300 µg/匹ずつ腹腔内投与して好中球を枯渇させた。抗体は、それぞれ 300 µg/300 µL となるように生理食塩水で希釈して投与した。本研究における好中球枯渇は、血中好中球が 3%以下に減少していることとした。

圧迫創の作製手順：腹壁を切開した後腹壁部の腹腔に磁石 (1.5mm × 10) 1 個を埋め込んだ。背側皮膚から同様の磁石 (2.0mm × 10) を 1 個つけて腹壁を縫合し、個別にケージに戻した。

6 時間の圧迫後に麻酔下で背側皮膚の磁石を除去し、実験的圧迫創モデルを作製した。

組織摘出：圧迫創作製後 0、3 時間、1、3、7 日目に心臓からの採血後に皮膚組織を摘出した。

圧迫創はその周囲の正常皮膚を含めて約 2 × 2cm で、皮下組織および深部骨格筋層 (筋層) を含めて摘出した。対照皮膚は圧迫創の対側の皮膚を摘出した。摘出組織は頭側と尾側に半分に分け、頭側を組織固定用、尾側をフローサイトメトリー解析用とした (図 1)。

フローサイトメトリー解析用の組織は、圧迫創周囲の健常組織を除去した。白血球数は屠殺時に心臓からヘパリン採血した血液を、チュルク液による赤血球溶解後、血球計算盤を用いて測定した。それぞれの白血球分画 (T 細胞, B 細胞, 好塩基球, 好酸球, 好中球) はフローサイトメトリー解析により確認した。

フローサイトメトリー解析は 2 種類の混合液を用いて行った。使用抗体は、(A) : CD3 (clone: 17A2, BD Biosciences)、CD45/B220 (clone: RA3-6B2, BioLegend)、CD193 (clone: J073E5, BioLegend)、Gr-1 (clone: RB6-8C5, BioLegend)、(B) : Siglec-F (clone: S1700L, BioLegend)、CD11b (clone: M1/70, BioLegend)、CD117 (clone: 104D2, BioLegend)、Gr-1 (clone: RB6-8C5, BioLegend) とし、FACSCanto™ (BD Biosciences) を用いて好中球枯渇を確認してフローサイトメトリーを実施した。

BD™ Cytometric Bead Array (BD™ CBA) を用いて、フローサイトメトリーによるサイトカインの多項目同時定量解析を行った。測定対象のサイトカインは、KC、MCP-1、IL-1β、IL-6、TNF とした。フローサイトメトリーの定法に従い BD FACSCanto™ を用いてフローサイトメトリー解析を行った後、FCAP Array™ v3.0

ソフトウェアを用いて多項目解析を行い、それぞれのサイトカイン量 (pg/mL) を得た。

組織学的観察標本作製：摘出した組織は、10%ホルムアルデヒド溶液で 24 時間以上固定後、常法に従い、パラフィン標本作製した。ミクロトームを用い、4 µm の薄切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、光学顕微鏡 (光顕) にて観察を行った。

組織学的観察は圧迫創部における好中球の動態の観察を中心に表皮・真皮層、皮下組織層、筋層における形態学的変化を観察した。

- 4 . 研究成果

肉眼的所見(図1)は磁石除去直後の0時間は、両群で磁石圧迫部分が凹状で暗紫色だった。3時間では、0時間で凹状であった磁石圧迫部分は平坦になり、両群で圧迫創全体は蒼白だった。両群とも創中心に近い一部分で暗赤色の発赤がみられ、枯渴群の発赤は対照群と比較してやや薄く小さかった。1日目では、対照群は創辺縁に薄い発赤が出現し、3時間と同様に創は蒼白で暗赤色の薄い発赤は継続していた。枯渴群は創辺縁に発赤がみられ、創中心に対照群と比較して強い赤褐色の発赤がみられた。創周囲が膨隆し軽度の浮腫がみられた。3日目では、対照群は1日目における創辺縁の発赤が創中心に向かって圧迫創全体へと広がり、創の一部は蒼白だった。創は頭尾方向を短径として楕円形に収縮していた。枯渴群は対照群と同様に、圧迫創全体に発赤がみられ一部が蒼白であった。発赤は創辺縁から創周囲へと広がり境界が不明瞭であり、創は円形を保ったままであった。1日目からみられた創周囲の膨隆は存続し

浮腫が増強していた。7日目では、対照群は創全体に黄褐色の凹状の痂皮を形成し、痂皮は一部剥離しており、痂皮の下では上皮化が進んでいた。創辺縁には発赤がみられ、3日目同様に、創は頭尾方向を短径とする楕円形に収縮していた。枯渴群は、対照群よりも小さな円形の痂皮を創の一部に形成し創部の発赤は強かった。強い浮腫が継続し創は円形に収縮した。創面積は両群ともに、創の作製後3時間では0時間とほぼ変わらなかった。対照群は3時間から1日目に創収縮率が大きく、以降は緩やかに収縮した。枯渴群は3時間から7日目にかけて緩やかに収縮する傾向にあった(図2)。

組織所見として全層の合計の好中球数は、対照群は3時間にピークを迎え、7日目はみられなかった。枯渴群は0時間から7日目までピークを迎えることなく低い値で推移した。3時間、1日目は対照群で有意に多く、7日目は枯渴群で有意に多かった。その表皮の基底細胞は整列せず、膨潤した核が脱核せずに残っていた。枯渴群では有棘層、顆粒層の肥厚がみられ、対照群と比較して有意な表皮の肥厚がみられた(図3)

サイトカイン：KCは、対照群は0時間でピークを迎え、その後は減少した。枯渴群は、0時間で小さなピークを迎え、3日目から増加し、7日目でピークを迎え、対照群と比較して有意に多かった。MCP-1は、対照群は1日目にピークを迎えたものの、0時間から7日目を通して低い値を示した。枯渴群は0時間から1日目までは対照群と同様に低い値であったが、3日目から増加しピークを迎えた。7日目には発現が減少するものの、対照群より多い傾向にあった。IL-1は、両群で0時間から3日目までは低い値を示すが、7日目に増加した。7日目での増加は、枯渴群でより顕著にみられた。IL-6は、両群で3時間にピークを迎え1日目は減少し、3日目に再増加した。枯渴群は3日目における再増加がより顕著で、二峰性を示した。TNFは、両群で0時間から3日目まではほぼ発現がみられず、低い値を示した。7日目には両群で発現が増加し、枯渴群は対照群と比較して顕著な増加がみられた。

考察・まとめ：好中球枯渴群つまり好中球の減少あるいは機能低下している場合は創周囲の圧迫創における好中球の創部への遊走は切開創よりも遅延し、枯渴群では対照群と比較して創傷治癒過程がより遅延したと考えられる。表皮が肥厚していたことから適正な表皮基底層細胞の脱核過程に影響し創傷治癒の異常をきたしたことが推測される。その要因の一つとして、炎症性サイトカインの経過分析から、炎症初期に好中球の遊走がない枯渴群は炎症性サイトカインの産生が好中球以外のマクロファージなどの炎症性細胞を介して行われる可能性があり、対照群と比較して炎症の発生が遅延することが明らかとなった。炎症初期に好中球が適正な機能を発揮しないと炎症反応が遅延することが示唆された。

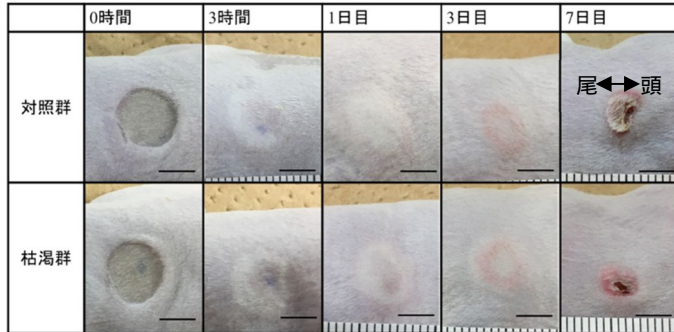


図1 各群の肉眼的観察の経時的変化 (Bar=5mm)

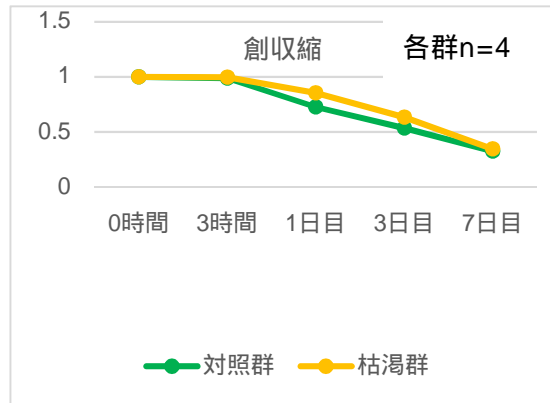


図2 創収縮 (創の作製後0時間を1とした)

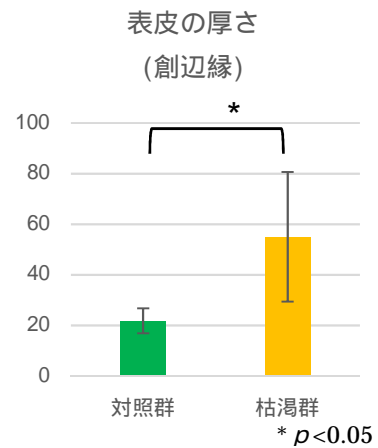


図3 7日目における創辺縁の表皮厚

第二段階：炎症抑制/適正な創傷治癒過程をたどるケア介入の検索

圧迫創の創傷治癒における電法の効果の検証を目的とした。

- 3 . 研究の方法

マウスは control 群(圧迫創作製後非治療)、電法群(圧迫解除の直後電法を実施)を設定した。肉眼的に 7 日目まで連日観察を行った。

組織学的観察および分子生物学的分析のため組織は 0 分, 30 分, 1 日, 3 日, 7 日に摘出した。定法によりパラフィン切片の作製、一般染色および免疫組織化学染色により顕微鏡観察を行った。さらに凍結組織から総 RNA を抽出後、cDNA を作製し Real-time PCR を行った。統計処理ソフト JMP (SAS Institute Inc., Tokyo) を用い、有意差検定 (有意水準 5 %) 分析を行った。

(Real-time PCR に使用したプライマー等含め方法と結果の詳細は の第一段階の研究と共に論文にて今後公表予定)

- 4 . 研究成果

予備実験の結果、冷電法群は炎症誘導が早く創縮小率が最も高いものの創は痂皮を作り痂痕化し、温電法群は炎症抑制の細胞反応を認め、創の縮小率は低いが痂皮形成と痂痕が冷電法群より小さかった。双方に利点と欠点が認められたことから

肉眼的評価では圧迫解除後創傷の初期には control 群と電法群はほとんど差異を認めなかったものの、電法群の潰瘍は発生が少なく、7 日目には電法群が有意に少なく潰瘍の大きさも有意に少ない結果が得られた。以上から、「ある」電法方法の実施により圧迫創の潰瘍出現を減少させる可能性が示唆された。

本研究の意義と可能性：褥瘡は看護職が第一発見者になる可能性が大きい。急性期創傷に対する初期対応として、簡便かつ一般的に誰でも行える方法を確立できれば深部損傷褥瘡などの重症化する褥瘡の悪化を阻止あるいは炎症軽減でき、痂痕治癒の範囲を減少させることにより皮膚機能の維持に貢献できる可能性が考えられる。

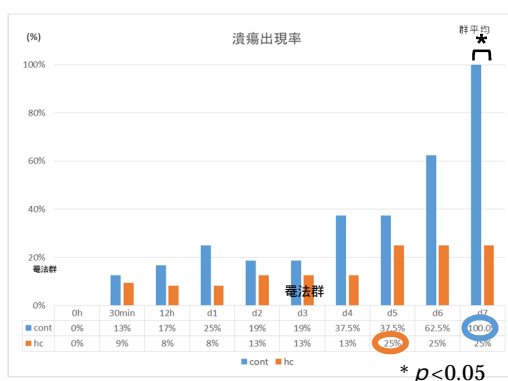


図 4 対照群と介入群の潰瘍出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土田花凜, 荒木唯, 石田陽子, 松田友美
2. 発表標題 圧迫創の創傷治癒過程において好中球枯渇が創傷治癒形態に与える影響
3. 学会等名 第21回日本褥瘡学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木唯, 土田花凜, 石田陽子, 松田友美
2. 発表標題 電法が圧迫創モデルマウスの創傷治癒に与える影響 M2マクロファージに着目して
3. 学会等名 第21回日本褥瘡学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田友美
2. 発表標題 深部損傷褥瘡(DTPI)のための看護ケア開発への挑戦
3. 学会等名 第20回日本褥瘡学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋結 進藤真由美 石田陽子 松田友美
2. 発表標題 電法が圧迫創モデルマウスの創傷治癒に与える影響 圧迫創及び創辺縁に着目して -
3. 学会等名 第21回北日本看護学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 草刈優, 石田陽子, 松田友美
2. 発表標題 糖尿病マウスの圧迫創における線維芽細胞の分布の特徴
3. 学会等名 第21回北日本看護学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 3) 徳田花凜, 相馬祐也, 草刈優, 荒木唯, 石田陽子, 松田友美
2. 発表標題 電法が圧迫創モデルマウスの創傷治癒に与える影響 好中球の浸潤時期と分布に着目して
3. 学会等名 第19回日本褥瘡学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 4) 相馬祐也, 徳田花凜, 荒木唯, 草刈優, 石田陽子, 松田友美
2. 発表標題 電法が圧迫創モデルマウスの創傷治癒に与える影響 M2マクロファージとIL-10に着目して
3. 学会等名 第19回日本褥瘡学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松田友美, 石田陽子, 小林由貴子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学出版	5. 総ページ数 12
3. 書名 WOC Nursin	

〔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
研究分担者	石田 陽子 (ISHIDA YOKO) (60322335)	山形大学・医学部・准教授 (11501)	
研究分担者	菅野 恵美 (KANNO EMI) (10431595)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	櫻田 香 (SAKURADA KAORI) (60312732)	山形大学・医学部・教授 (11501)	
研究分担者	片岡 ひとみ (KATAOKA HITOMI) (70711232)	山形大学・医学部・教授 (11501)	

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