

機関番号：17104  
 研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20560078  
 研究課題名(和文) 虚血環境模擬による皮膚細胞の経時的応答評価と物理環境調節による褥瘡遅延の検討  
 研究課題名(英文) Evaluation of time response of skin cells under artificial ischemia condition and a delay of pressure ulcer through an adjustment of physical environment  
 研究代表者  
 山田 宏 (YAMADA HIROSHI)  
 九州工業大学・大学院生命体工学研究科・教授  
 研究者番号：00220400

研究成果の概要 (和文)：単層培養したウサギ由来線維芽細胞様細胞株は酸素濃度の低下に鈍感で、二価陽イオンのない培地において温度 37℃に比べて 25℃では基質からの剥離が明らかに低下し、温度に敏感だった。骨突起部の微小血管を有する軟組織をマットレスに圧迫した有限要素解析より、軟組織が長い時間スケールで圧縮性を有すると微小血管が顕著に変形することと空気圧支持の有効性がわかった。さらに、圧力 10 kPa 程度の空気圧をポリエチレンチューブに負荷して骨突起部を支えて褥瘡を遅延されるシステムを試作した。

研究成果の概要 (英文)：Single-layered rabbit fibroblast-like cells in culture are insensitive to a reduction of oxygen and sensitive to the temperature due to the fact that a rate of detachment from the substrate decreases significantly for the cells in divalent cation free medium at 25 degrees centigrade compared to those at 37 degrees centigrade. Results from the finite element analysis for the soft tissues with microvessels near a bone prominence which is compressed onto a mattress show that the microvessels deform largely if the soft tissue is compressive over a long time scale and that an air support is valuable. To delay an occurrence of pressure ulcer, a prototype was created to support the soft tissues near a bone prominence by supplying the air with about 10 kPa to a polyethylene tube.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・機械材料・材料力学

キーワード：生体力学, 褥瘡

#### 1. 研究開始当初の背景

平成 18～19 年度の基盤研究 (C)「褥瘡発症遅延のための皮膚細胞に対するひずみ・温度・酸素分圧の複合的影響の評価」で、コラーゲンゲルに包埋した線維芽細胞様細胞株を用いた研究を行い、次の考えを持つに至った。

第一に、皮膚表面の圧迫による血行障害(虚血)が褥瘡発生の主要な環境因子であり、単に、ゲル(皮膚)の圧縮量や圧縮時間が増えるだけでは細胞の死亡率に目立った影響を与えない。また、皮膚表面のせん断変形は褥瘡発症過程における表皮層と真皮層の間の連結構造の破壊を加速する役割を果たす。

第二に、皮膚の酸素濃度は正常な爪下皮膚組織の例で3%（文献値）であり、申請者らの実験では酸素濃度を3%に下げても線維芽細胞の死亡割合は変化せず、褥瘡はさらに低い酸素濃度状態で発症し、ゲルを浸した培養液の栄養状態も細胞に影響を与えると予想される。

第三に、皮膚および皮下組織の詳細な微視的構造に関する情報が物理的環境因子の影響を検討する上で重要となるが、従来の研究では不明な点が多い。

第四に、虚血状態の持続だけでなく、血流の回復も細胞死を引き起こすことが知られており、併せて考慮すべき環境因子である。

以上のことから、制御可能な因子として着目してきた温度と変形の影響は、虚血環境下の細胞の経時的応答を調べて解明すべきであり、同時に、褥瘡遅延の方法は、微小血管内の血流維持と細胞の代謝機能維持の観点から検討すべきであると考えに至った。

## 2. 研究の目的

褥瘡は骨突出部位の軟組織が圧迫され続けて壊死する疾患で、一度、褥瘡が生じると元通りにならず、褥瘡予防は高齢化社会の緊急かつ重要な課題である。本研究の目標は褥瘡になりやすい部位の環境を調節して褥瘡の発症をできるだけ遅らせることである。そのため、本研究では皮膚内部の虚血状態を模擬し、培養皮膚細胞を死に至らず環境因子の影響を定量的に評価して褥瘡の遅延条件を見出す。また、皮膚組織の有限要素解析を行って、血管閉塞を防ぐ皮膚表面への荷重の与え方を見出す。最後に、褥瘡遅延の物理環境を与える褥瘡遅延システムの設計を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) ①正立型共焦点レーザー顕微鏡のステージ上にステージトップインキュベータを設置した。炭酸ガスボンベと窒素ガスボンベに接続されたガス混合装置をステージトップインキュベータに接続し、顕微鏡下での細胞培養・観察システムを構築し、動作確認をした。②ウサギ由来線維芽細胞様細胞株を通常の炭酸ガスインキュベータで数日間培養した後、ステージトップインキュベータに移して数時間培養し、適切な培養状態にあることを確認した。③細胞試料を炭酸ガスインキュベータに静置し、正常条件（温度 37°C、通常の酸素濃度、通常培地）で数日間培養後、ステージトップインキュベータに試料を移し、二価陽イオンの欠乏したダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水で種々の濃度に薄めたダルベッコ変法イーグル培地で1時間培養して、細胞の接着状態のタイムラプス観察を行うとともに、MitoTracker Green FM (Invitrogen,

M1514)で染色してミトコンドリアの蛍光顕微鏡観察をした。

(2) ①タイプ I コラーゲンで塗布した 35mm ディッシュにウサギ由来線維芽細胞様細胞株を播種して炭酸ガスインキュベータで単層培養し、細胞が互いに接触し始める程度に増加したところでプラスチック製密閉容器に移し、アネロバック・ケンキ5%を用いて密閉容器内を低酸素状態とし、低酸素環境下での細胞の接着性を調べた。

②骨突起部の軟組織が微小血管を有する有限要素モデルを作成し、汎用有限要素解析ソフトウェアを用いて解析を行った。すなわち、皮膚表面への圧縮負荷条件下で、皮膚組織の応力状態や血管断面の変形を調べ、血管閉塞圧力(4.3 kPa)の妥当性を検討するとともに、血流の途絶えにくい条件を探った。

(3) ①二年目に行った有限要素解析を継続・発展させ、骨突起部の褥瘡発症を遅延する条件を見出した。すなわち、これまでの軟組織の力学特性を変更して、体積変化が生じるように圧縮性の粘弾性体とし、皮膚表面への圧縮負荷条件下において皮膚組織の応力状態や血管の断面積の変化を調べた、また、褥瘡を遅延できる荷重条件を探った。

②皮膚圧迫部の褥瘡発症を遅延させるシステムを試作した。すなわち、コンピュータで空気圧を制御できる装置を用意し、褥瘡が発生しにくいように圧力範囲の空気圧とし、ポリエチレンでできた円筒を膨らませ、それで骨突起部を支持するようにした。

## 4. 研究成果

(1) ①タイプ I コラーゲンで塗布した 35mm ディッシュにウサギ由来線維芽細胞様細胞株を低濃度で播種し、細胞間接触が少ない状態で2日半だけ培養した。温度 37°Cと 25°Cの2条件と、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)100%、二価陽イオンを含まないダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水で DMEM を薄めた濃度 0.2%の DMEM と二価陽イオンを含まないダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（濃度 0%の DMEM）の3条件とを組み合わせて、ステージトップインキュベータ内での1時間にわたる細胞の形態変化を明視野で観察するとともに、一部の条件についてミトコンドリアの蛍光輝度測定を行った。培地の pH は DMEM 100%のとき 7.7 で、低濃度では 6.5 から 6.7 であり、いずれも細胞培養に適した環境にあった。DMEM が濃度 0.2%のとき、温度 37°Cでは細胞は辺縁部からはがれて球状化が進み、1時間後には元の面積の 20%から 60%までになった(図 1)。一方、温度を 25°Cに下げた条件では、進行速度が低下して元の面積の 60%か

ら 80%までにしか減少せず、細胞はく離の明瞭な遅延効果があった(図 2)。DMEM 低濃度のときの面積の時間変化率はおおむね時間とともに直線的に減少し、速度零に近づく傾向にあった。

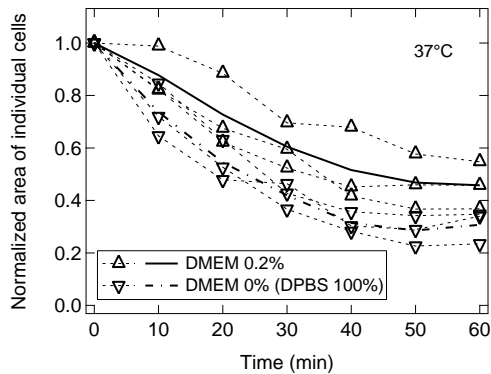


図 1 温度 37°Cでの細胞の面積変化

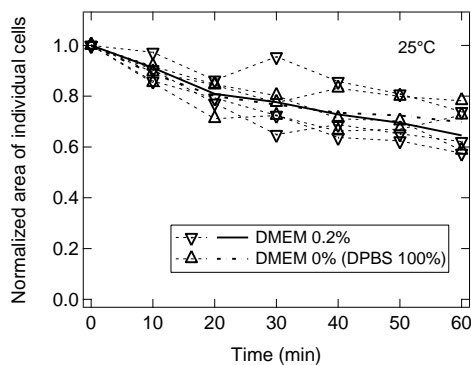
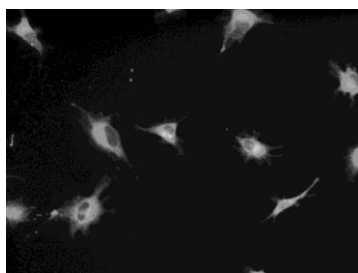
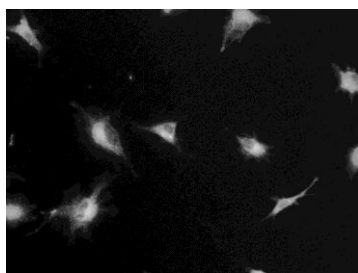


図 2 温度 25°Cでの細胞の面積変化

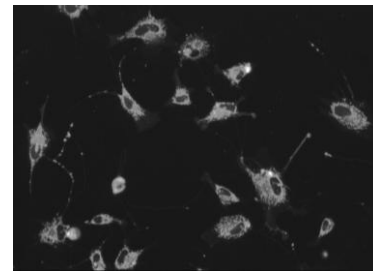


実験開始時

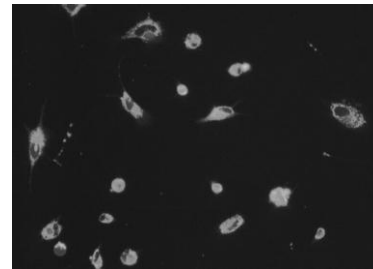


1 時間後

図 3 ミトコンドリアの蛍光染色画像 (培地 DPBS(+), 温度 37°C)



実験開始時



1 時間後

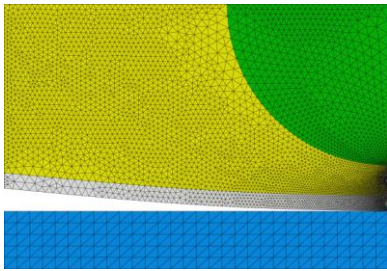
図 4 ミトコンドリアの蛍光染色画像 (培地 DPBS(-), 温度 25°C)

②細胞接着には培地中の二価陽イオンと細胞のエネルギー代謝が必要であることが知られているのに対し、ミトコンドリアの蛍光輝度の観察結果(図 3, 図 4)からはエネルギー代謝の明らかな変化は見られなかった。したがって、本実験条件での細胞のはく離は二価陽イオンの欠乏に起因した結果と解釈される。細胞死につながる変化として細胞内部で直接的に進行する死と、細胞が周辺組織に接着できなくなることをきっかけとして進行する死とが考えられるが、本実験結果から、後者の場合、1時間程度で細胞が死に至ることはなかった。

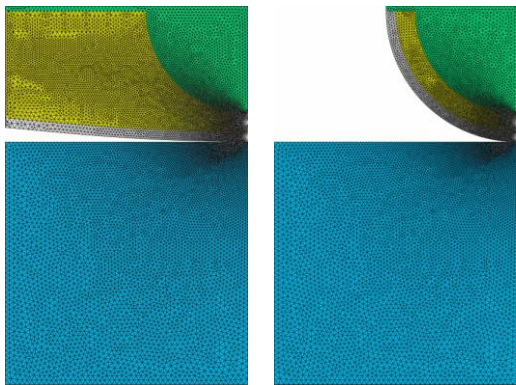
③直径 14mm のガラスボトムディッシュをカバーガラスで覆って閉鎖環境を作り、細胞の変化を観察した結果、短時間での変化は認められず、細胞はより厳しい環境にさらされないと、はく離等の変化が生じないことがわかった。

(2) ①ウサギ由来線維芽細胞様細胞株をタイプ I コラーゲンで塗布した 35mm ディッシュに播種して炭酸ガスインキュベータで単層培養し、細胞が互いに接触し始める程度に増加したところでプラスチック製密閉容器に移し、アネロパック・ケンキ 5%を用いて密閉容器内を低酸素状態とし、嫌気指示薬で確認した。温度は恒温機を利用して 37°C に保持した。細胞は 2 時間以上経過しても基質から剥がれなかった。また、室温でも同様に基質から剥がれなかった。この結果から、線維芽細胞は低酸素状態に対して強い細胞であ

ることが示された。線維芽細胞は褥瘡発症後、治癒させたときに欠損部を埋める細胞であるから、このような厳しい環境に対して耐性が強いものと判断される。



モデル1



モデル2

モデル3

図5 骨突起部の有限要素モデル。マットレス厚はモデル1が7.5 mm, モデル2と3が50 mm. 緑色が骨, 黄色が脂肪組織, 灰色が皮膚, 青色がマットレス。

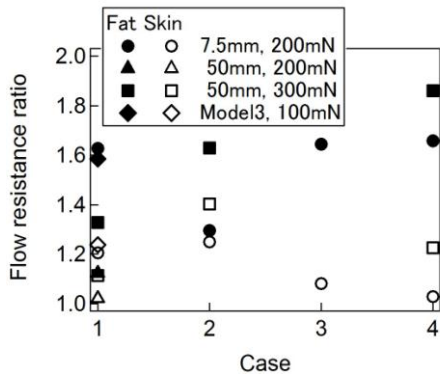


図6 微小血管の流動抵抗の変化。図中の数値はマットレスの厚さと骨上端を押す力。

②骨突起部の2次元平面ひずみ問題の有限要素解析を行った。モデルは骨, 皮膚, 脂肪組織からなる人体の一部(奥行き1 mm)と, 皮膚が接触するマットレスあるいは床からなる(図5)。皮膚と脂肪には直径8ミクロンの毛細血管を設けた。皮膚と脂肪は非圧縮等方で非線形弾性特性を記述する超弾性モ

デルを採用した。皮膚の伸展性, および, マットレスと床の選択によって, 毛細血管の断面積の減少率と, 毛細血管内のポアズイユ流れを仮定した血液の流動抵抗の減少率を調べた。その際, 血液はニュートン流体とみなした。皮膚をマットレスあるいは床に押し付ける場合の変形解析の結果, 皮膚よりも骨に近い脂肪に存在する血管のほうが断面積と流動抵抗の減少率が大きかった(図6)。また, 皮膚が高齢化に伴って硬化することによって脂肪にある血管の断面積と流動抵抗の減少が増加した。ただし, いずれの条件の場合も毛細血管の変形量は血流の明らかな現象を招くほどのものではなかった。

(3)①皮膚組織の有限要素解析を行って血管閉塞を生じさせる力学的要因を検討するとともに, 血管閉塞を防ぐ皮膚表面への荷重の与え方を調べた。すなわち, 骨突起部直下の皮膚組織と皮下組織の長時間圧迫された時の力学的性質として, 軟組織に豊富に含まれる水分の移動を超弾性体の体積減少によってモデル化し, 軟組織に見られる粘弾性特性も同時にモデル化した。有限要素モデルの形状は図5のモデル3と同じである。そして, 平面ひずみ問題として有限要素解析を実施し, マットレスと皮膚表面の間に生じる圧力を文献の実験値と同程度にして組織の応力・ひずみ状態や血管の変形度合いを調べた。その結果, 軟組織の体積減少が微細血管の変形に大きく寄与することがわかった(図7)。また, 粘弾性特性は組織が非圧縮の場合にはその効果はなく, 体積減少が生じる場合には粘弾性特性を有することで血管の変形がさらに進行した。人の身体を支えるには自重と同じ力が必要なので, この力の分散のさせ方が問題となる。

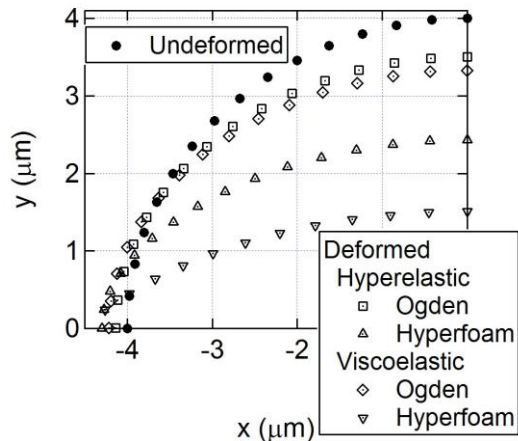


図7 皮膚・脂肪組織が種々の力学特性を有する場合の皮膚微小血管の断面積変化(四分の一円)。黒丸は変形前の形状を表す。

②上述の解析結果に基づいて、骨突起部直下を柔らかなクッションではなく空気圧で支えることで褥瘡の起こりやすい部位への過度の圧力を避け、褥瘡を遅延する荷重条件を調べた。また、褥瘡遅延の物理環境を与える褥瘡遅延システムを設計・試作した。本システムはポンプ、レギュレータ付タンク、空気圧力制御装置、空気圧パッド、コンピュータ、A/D&D/A コンバータ、これらを結ぶチューブ、及び、圧力センサからなり、コンピュータから定常及び周期的圧力波形を与えて供給圧力を15kPa以下で制御した。このような低い圧力で支えれば褥瘡の発生を遅延するのに有効と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計6件)

①山田 宏，低栄養環境下の線維芽細胞における温度に依存した基質接着性変化に関する定量的評価，日本機械学会九州支部第62期総会・講演会，2009年3月18日，九州大学

②山田 宏，線維芽細胞の基質からの剥離に及ぼす培養液成分と温度の影響に関する定量的評価，日本機械学会2009年度年次大会，2009年9月14日，岩手大学（盛岡市）

③山田 宏，細胞の異方的力学構造が変形に及ぼす影響の有限要素解析による検討，日本機械学会第22回バイオエンジニアリング講演会，2010年1月10日，岡山理科大学

④山田 宏，有限要素法による骨突起部軟組織圧迫時の毛細血管の変形解析，日本機械学会2010年度年次大会，2010年9月8日，名古屋工業大学

⑤山田 宏，皮膚とマットレスの弾性を考慮した骨突起部の微小血管の変形に関する数値解析，日本機械学会 M&M2010 材料力学カンファレンス，2010年10月11日，長岡技術科学大学

⑥山田 宏，圧迫下での軟組織の力学応答を考慮した骨突起部の微小血管の変形に関する数値解析，日本機械学会九州支部第64期総会・講演会，2011年3月17日，九州大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 宏 (YAMADA HIROSHI)

九州工業大学・

大学院生命体工学研究科・教授

研究者番号：00220400

### (2) 連携研究者

宮田 昌悟 (MIYATA SHOGO)

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号：70376515

(H20年度のみ)