

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463287

研究課題名(和文) 深部損傷褥瘡の発生機序解明による治癒促進のための看護ケア技術の確立

研究課題名(英文) Promoted Nursing Care of Wound Healing Based on Mechanisms of The Deep Tissue Injury (DTI)

研究代表者

松田 友美 (MATSUDA, YUMI)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：90444926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、深部組織損傷を伴う圧迫創モデルマウスの作製を確立し、深部損傷褥瘡(Deep tissue Injury: DTI)の発生機序を明らかにすること、およびその初期ケアとしての冷罨法および温罨法を評価することを目的とする。本研究におけるモデルの創傷治癒過程は2次治癒に相当すると考えられた。また、創傷治癒を促進するケアとして圧迫創に用いた冷罨法と温罨法は、冷罨法は表層の損傷が顕著に認められ、温罨法は表層の損傷は軽度でも深部骨格筋層の回復が他群に比較して遅延が認められた。圧迫創に対する冷罨法と温罨法は深部骨格筋を含む皮膚組織各層にそれぞれ異なる影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we evaluated the effects that cool and hot packs as an initial therapy has contributed wound healing on post-pressure induced deep tissue injury model mouse. Wound healing is similar to that of secondary intention on the model mouse. The cool group had significant tissue necrosis in the epidermis/dermis, but I though the deep skeletal muscle had been damaged, muscle cell regeneration was noted on days 5 to 7. The hot group exhibited reverse findings in the respective tissue layers, and had delayed regeneration of skeletal muscle. Applied cool or hot packs to the pressure wound were indicated different effects on each layer of the skin tissue including muscles.

研究分野：基礎看護学

キーワード：深部損傷褥瘡 DTI 冷罨法 温罨法 創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

褥瘡の中でも“ Suspected Deep Tissue Injury: sDTI ”(深部損傷褥瘡疑い)は、圧迫に起因した損傷で、初期には表皮欠損がなく暗赤褐色などの皮膚色の变化のみで予後の予測が困難なため『疑い』と称される。従来分類では初期は表皮欠損が認められないため軽症に相当し経過観察となる。しかし、DTI であれば初期の皮膚色変化に引続き急速な組織崩壊により深い褥瘡となる慢性難治性褥瘡潰瘍の一つである。治療が長期にわたるため莫大な費用と労力を要す。患者の生活の質(QOL)も低下させるために、臨床的、社会的に大きな問題となる。主に第一発見者となる看護師にとって DTI に対する適切な看護ケアの確立は喫緊の課題である。適切な看護ケアの確立のためには DTI の発生機序解明が望まれるが、初期は表皮欠損等がない DTI のためヒトの組織採取は不可能であり、組織学的・分子生物学的所見を得ることは困難である。そのため、発生機序の詳細はいまだ不明な点が多く、動物実験による報告はいくつかあるものの、臨床的な DTI の特徴を反映した動物実験モデルも確立されていない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では DTI 発生機序の解明のため皮膚圧迫動物モデルマウスを確立する。さらに看護において一般的なケアである冷却(冷電法) 加温(温電法)が創傷の発生初期および圧迫創治癒過程に与える影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) DTI を想定した深部骨格筋の組織損傷を伴う皮膚圧迫創モデルマウスの作製(DTI マウス)

(1) 申請者の先行研究で作成した圧迫創モデルラットを基盤に DTI マウス作製方法を確立する。

(2) の DTI マウスの再現性を確認する。DTI マウスの創傷治癒過程を明らかにする。

### 対象および皮膚圧迫創作製方法

**動物:** 6週齢の Jcl/ICR マウスを使用した。

**方法:** マウスは 12 時間毎の明暗サイクル、飼料・水共に自由摂取下で飼育。入荷後 1 週間馴化飼育した後に実験に供した。

**手順:** イソフルラン(イソフルラン吸入麻酔液「ファイザー」、ファイザー株式会社)吸入麻酔下(導入 2.5ℓ/分、2.0 ℓ/分維持)で、動物用電気バリカン(夏目製作所)で剃毛後、皮膚圧迫創作製処置手術を施行した。腹部をポピドンヨード(イソジン®明治製薬株式会社)で消毒後、1.5cm 切開し、創傷被覆材(ポリウレタンフィルム)で包み滅菌した直径 1cm 円柱型のネオジム磁石(φ10mm×1.5mm: 157.8mT)を腹腔内の後腹壁側に挿入し、体表から腰背部の高さで同様の磁石を着け組織を圧迫した。麻酔覚醒後、個別に飼育用ケ

ージに戻して経過観察し 6 時間圧迫した。この間自由飲食させている。6 時間後、同様に麻酔下で磁石を外した。

2) 作製した圧迫創モデルマウスの治癒過程における冷・温電法の影響を評価する

(1) 創部の組織障害を抑制し創傷悪化予防のための看護ケア開発を目的とした冷電法あるいは温電法

(2) 冷電法/温電法が有効であるか評価する。群構成

作製した DTI モデルをコントロール群(Control Group: Cont.)とし、創に冷電法を実施した群は Cool (Cooling Group: Cool) 温電法を実施した群は Heat (Heating Group: Heat) とした。それぞれの群について肉眼的、組織学的観察を実施した。

冷電法/温電法の実施方法

### 冷電法

圧迫創を作製し体表の磁石を除去後、圧迫創部に冷電法を 45 分間施行した。ガーゼに包んだ保冷剤を圧迫創に当て皮膚表面を 20±3.7 に保持した。なお、実施中はマウスの下にウォームマットを敷き温めてマウスの低体温を予防した。

### 温電法

温電法は、圧迫創を作製し体表の磁石を除去直後、圧迫創部に温電法を 45 分間施行した。ディスプレイブルゴム手袋に湯を入れ圧迫創に当て皮膚表面を 40.6±0.7 に保持した。両群共、実施中の皮膚表面温度はデジタル温度計を用いて継続的に測定した。

## 1) 2) 共通

組織の観察および組織の摘出、標本作製  
磁石除去から 3 時間後、1, 3, 5, 7 日目に組織を摘出した。肉眼的観察は創作製時刻に体表から毎日記録し体重計測も行った。

組織学的観察用の組織は、頸椎脱臼法によって致死させた後、圧迫創部分の深部骨格筋層を含めた皮膚全層を摘出し、対側の皮膚は対照として摘出した。摘出組織は、10%ホルマリン液で 24 時間以上固定後、常法に従ってエタノール、キシレンで脱水・透徹した。パラフィン包埋後、マイクロミクロトームにて 5 μm の切片を作製し光学顕微鏡で観察した。

### 組織染色

一般染色と免疫組織化学染色を実施して創傷治癒過程を評価した。

一般染色は Hematoxyline & Eosin (HE 染色), Elastica-Masson-Goldner 変法 (EM 染色) を用いた。

免疫組織化学染色は下記を実施した。

抗体: 抗 HMGB1

M2 マクロファージ (M2Mφ);

Anti-CD163/M130(CD163) (Bioss Inc.)

Anti-IL-10 (Bioss Inc.)

M2MφM2 マクロファージは組織常在型マクロファージとも言われ、抗炎症性サイトカイン IL-10 や NO 生合成を抑制するアルギナ

ーゼを産生することにより炎症性変化を抑制するといわれる。そのため、M2MφとIL-10を指標に組織学的に炎症の治癒過程を評価した。

染色方法：各切片はキシレンで脱パラフィン、エタノールにて親水処理後、0.3%過酸化水素加メタノールによって内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。一次抗体反応に際して、抗原賦活化のためクエン酸緩衝液 (pH6) に切片を入れ 95 °C で 40 分加熱処理し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて洗浄し一次抗体の抗体名 CD163 (1:500 希釈) IL-10 (1:200 希釈) を 4 °C で Over night 反応させた。反応後 PBS にて洗浄し、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗体シンプルステインマウス MAX - PO (M), (R) (ニチレイバイオサイエンス) を一次抗体反応させた当該切片にそれぞれ用い室温で 30 分間反応させた後、3,3'-ジミノベンチジン (DAB) を用いて反応時間 10 分間で発色させた。

好中球 (NP) および抗体陽性細胞の画像データ計測処理方法

染色した組織標本はデジタル CCD カメラにて撮影した。画像処理はそれぞれ以下の通りに計測した。

NP : HE 染色画像の 150×200μm<sup>2</sup> を 1 視野とし 3 視野の NP 数をフリーソフト (カチカチカウンター) を用いて数えた。なお、光顕写真は圧迫創中心の各層をそれぞれ無作為に 3 枚ずつ撮影した。1 日目、3 日目それぞれ 3 視野の NP 数の平均値の検定には、t 検定を用いた。統計処理には、エクセルを使用した。

#### 4. 研究成果

1) DTI を想定した深部骨格筋の組織損傷を伴う皮膚圧迫創モデルマウスの作製 (DTI マウス)

2) 作製した圧迫創モデルマウスの治癒過程における冷・温電法の影響を評価する

##### 肉眼的観察

3 時間：創全体に蒼白の色調変化を認めた。創面は剥離等がない。1 日目：創全体に蒼白の色調変化を認め、創の中央部にはごく薄い暗赤色の色調変化が現れた。3 日目：創全体の蒼白の色調変化に加え創の内縁に幅 1mm ほどの暗赤色の色調変化を認めた。5 日目：創全体に暗赤色の色調変化がみられ、創中央部に幅 4mm 程の薄黄色の痂皮を認めた。7 日目：創全体の暗赤色の色調変化は日ごとに創中心に集積し、創の中心部に幅 2mm ほどの薄黄色の痂皮を認めた。

##### 組織学的観察

3 時間：

Cont.—表皮は連続性を保つものの基底層の細胞が楕円または扁平に変形し、一部配列の乱れが生じていた。筋層は圧縮されていた。NP は、皮下組織や筋の血管周囲など疎性結合組織に侵入していた。圧迫創辺縁部の表皮層と真皮浅層の境界に変性した NP が認め

られた。M2Mφ は真皮浅層、真皮深層、皮下組織では散見される程度であり、筋層では、圧迫領域の創辺縁部に散在していた

Cool では真皮、皮下組織、皮筋下、深部骨格筋における IL-10 陽性細胞数が他群に比較して早期から多く顕著に認める傾向を示した。

1 日目：3 群とも基底層細胞の変形が継続していた。

Cont.では、表皮から真皮まで及び痂皮がみられ表皮の連続性が断たれていた。NP は 3 時間よりも増加し、特に創辺縁部の真皮の深層と皮下組織層に多数認められたが創中心は創辺縁部より少なかった。M2Mφ は、真皮浅層では散見される程度であった。さらに、神経束内の間隙が拡大し核の不明瞭化が認められた。

Cool では、Cont.と同様に表皮から真皮まで及び痂皮がみられた。表皮欠損は広範囲に及び、表皮の連続性が断たれていた。創中心における真皮層の線維芽細胞の核が他群に比較して多く確認された。

Heat では、痂皮を認めなかった。真皮深層、皮筋下の疎性結合組織、皮下組織、筋層では 3 時間の所見よりも増加しており、特に皮筋下の真皮深層に集積していた。3 群とも線維芽細胞 (FB) が圧迫部の真皮、特に創中心で健常皮膚に比べて減少する所見を示した。

3 日目：Cont.では、基底層が肥厚していた。Cont.では NP は各層で創全体にみられるようになり、創辺縁から創中心、特に創中心の皮筋下層、圧迫部位の筋層にも多く滲出している様子が認められた。M2Mφ は、表皮層ではほとんど認めず、真皮層では散在し、3 日目の所見よりも減少していた。1 日目よりも神経束内の間隙が拡大し、対照や前日以上に髄鞘の不明瞭化と、核の膨隆および不明瞭化が圧迫領域で認められた。

Cool では、表皮から真皮まで及び痂皮がみられ、表皮の連続性が断たれ、圧迫部の基底層は肥厚し円形の基底細胞が不規則に配列していた。痂皮下に集積していた炎症性細胞は、真皮や皮下組織で 1 日目よりも減少していた。Heat では、表皮から真皮まで及び痂皮が認められた。痂皮下では炎症性細胞が集積し浸潤が認められたが、真皮や皮下組織では散在していた。

FB は 3 群とも圧迫部の真皮で 1 日目と同様に減少が継続していた。皮下組織の結合組織では、FB が頭尾方向に流れをつくり 1 日目よりも密に分布していた。圧迫下の皮下組織は、特に Heat で浮腫を顕著に認め、筋層は、3 群のうち Heat で圧縮され菲薄したままの所見を示した。

5 日目：表皮から真皮まで及び連続性が断たれ、創部には痂皮が形成されていた。痂皮下に変性した NP が層をなして、創中心から痂皮下の辺縁に滲出していた。3 日目と

比較すると、創部全体に多数認められた NP の数は減少し、真皮深層の NP は減少していた。神経束内の間隙、神経束内の核の不明瞭化と膨隆を 3 日目と同等に観察できた。神経周膜と神経束の間隙は 3 日目よりも収縮する傾向にある所見を認めた。

7 日目：Cont. では、表皮に痂皮がみられ基底層はさらに肥厚していた。肥厚した基底層は一部の皮膚付属器官に接し、表皮から真皮まで及ぶ連続性が断たれ、創部には痂皮が形成されていた。変性した NP の存在は痂皮下に認められ、リンパ球や形質細胞も認められた。創部全体に存在していた NP は、真皮深層には認められず、皮下組織層や筋層でも同様に NP は認められなかった。M2Mφ は、真皮浅層ではほとんど認めず、真皮深層、皮筋下の疎性結合組織では散見される程度であった。皮下組織および筋層では創中心部に散在していた。各組織層で、5 日目より減少していた。神経周膜の肥厚が認められた。また、一部の神経において神経束が神経周膜と一部密着する傾向を認めた。神経束内の核は、5 日目よりは明瞭化し、一つの束内でも明瞭化した核と不明瞭化した核が混在していた。

Cool では、表皮から真皮まで及ぶ痂皮が認められ創端から剥離しかけていた。痂皮下の炎症性細胞所見は Cont. 同様であった。創中心では、死滅した炎症性細胞を含む壊死が真皮層の深部まで及んでいた。基底層は、3 日目よりもさらに肥厚し、炎症性細胞は、痂皮下の真皮や皮下組織に認められリンパ球や形質細胞が認められた。

Heat では、痂皮が脱落し表皮の連続性は回復して基底層が肥厚していた。肥厚した基底層は、一部の皮膚付属器官に接し、炎症性細胞は減少して真皮や皮下組織に散見された。FB は、Cont. と Cool の真皮で膠原繊維の流れに沿って創辺縁や連続性が回復した基底層下に散在し、痂皮下で減少する所見が継続していた。しかし、皮下組織では、頭尾方向に流れをつくり多量に集積していた。一方、Heat では、FB が膠原繊維の流れに沿って真皮全体にみられ皮下組織では頭尾方向に散在していた。Cont. と Cool の皮下組織や筋層は健全組織と同程度まで回復傾向にあったが、Heat の皮下組織に浮腫が継続し筋層は圧縮されたままの所見を示した。

圧迫創作製後の創中心の各層における NP の分布：1 日目と 3 日目の創中心の各層における NP 数の平均値±S.D. は、表皮および真皮層では 1 日目 7.6±2.9、3 日目は 14.0±2.0、皮下組織層では 1 日目 6.3±4.9、3 日目は 8.7±2.5、筋層では 1 日目 9.0±4.6、3 日目は 18.0±1.7 だった。これより標準偏差による NP の数の比較は、表皮層真皮層 ( $p>0.04$ )、筋層 ( $p>0.03$ ) において有意差がみられ、1 日目より 3 日目に NP を多い結果となった (図 1)。

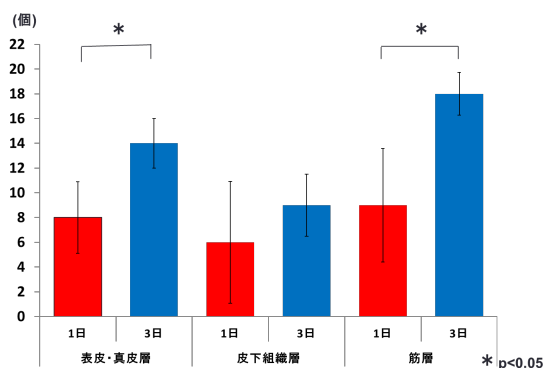


図 1 創中心の各層における NP 数の平均

以上の組織学的観察結果は各群間で同様の傾向を示していた。Cool と Heat の各組織層における損傷の程度を表にした (表 1)。

表 1 圧迫創における各組織損傷の程度

組織層	電法 経日	冷電法群		温電法群	
		3日目	7日目	3日目	7日目
表層(表皮所見)		++	+++	++	+
深層	皮下組織 浮腫の程度	+	-	++	+
	筋組織 圧縮の程度	++	+	++	++

#### 考察

NP は、一次治癒の治癒過程のなかでも炎症期の数時間から役割を果たし、受傷後 3 日目以降、早い段階でアポトーシスにより退縮し、その後創部からほとんど消失していることが報告されている。しかし、本研究の結果では、創中心の真皮層における NP の分布のピークは 3 日目であり一次治癒の先行研究と比較してピークの時期が遅延していたことから、NP の動態の影響により創の治癒が遅延していると考えられる。M2Mφ は、3 日目までは主に真皮深層、皮筋下の圧迫領域における創辺縁部に、5 日目以降では主に皮下組織、筋層の創中心部に集積し、M2Mφ の周囲では活性化した FB がみられた。創傷の治癒が進む部位が認められる一方、痂皮下では好中球やマクロファージ、形質細胞、リンパ球など炎症性細胞の存在も認められた。さらに、深部骨格筋を含む深部組織の損傷および神経線維や神経周膜の形態的变化を伴うことを明らかにした。

以上のことから、本研究で作製した DTI モデルマウスは再現性があり、NP およびマクロファージ、FB 等の動態から褥瘡など本研究における皮膚圧迫創モデルは慢性炎症所見を伴い、褥瘡など二次治癒過程に相当する臨床所見を含むモデルと考えられた。このモデルを基盤に創傷治癒過程における冷電法および温電法の影響を明らかにすることができた。

冷罨法および温罨法の影響は表1に示した通り、皮膚表層と深部組織層への影響が異なる可能性が示唆された。

#### 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)

[雑誌論文](計 1件)

1) 松田友美, 石田陽子, 高橋勇太, 片岡ひとみ, 武田利明: 圧迫による深部組織損傷を伴う慢性創傷動物モデルの作製. 日本褥瘡学会学誌. 査読有, 2016, 18巻(1号): 7-14

[学会発表](計 5件)

1) Yumi Matsuda, Noriko Bandai, Yoko Ishida, Natsuko Miura, Hitomi Kataoka, Toshiaki Takeda: Histological changes induced by cold/hot packs in pressure-related deep tissue injury mouse model for pressure ulcer. 5<sup>th</sup> CONGRESS OF WORLD UNION OF WOUND HEALING SOCIETES, 25-29 Sep.2016, FIRENZE, FORTEZZA DA BASSO, ITALY

2) 坂大典子, 高橋勇太, 新野美紀, 石田陽子, 松田友美: 圧迫創モデルマウスにおける罨法が創傷に与える影響 - 線維芽細胞の分布に着目して. 日本看護技術学会第14回学術集会, 査読有, 2015年10月17~18日愛媛県愛媛市, ひめぎんホール

3) 松田友美, 高橋勇太, 菅野恵美, 石田陽子: マウス圧迫創におけるHMGB1陽性細胞分布の特徴. 実験動物セミナー第25回研究成果発表会, 査読有, 2014年12月17日山形県山形市, 山形大学医学部

4) 坂大典子, 新野美紀, 加賀紀子, 松田友美: 圧迫創モデルマウスにおける罨法が創傷に与える影響 線維芽細胞の分布に着目して. 第4回Co-Medical研究会, 査読有, 2014年11月8日山形県山形市, 山形大学医学部

5) 松田友美, 石田陽子, 菅野恵美: マウス圧迫創におけるHMGB1陽性細胞の経時的変化. 第43回日本創傷治癒学会, 査読有, 2013年11月14日~15日大分県速見郡, 別府湾ロイヤルホテル

[図書](計 1件)

1) 松田友美, 渡辺皓: 図解ワンポイント解剖学 人体の構造と機能. 東京; サイオ出版, 2016年: 107-150

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

松田 友美 (MATSUDA YUMI)  
山形大学・医学部看護学科・准教授  
研究者番号: 90444926

##### (2)研究分担者

菅野 恵美 (KANNO EMI)  
東北大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 10431595

石田 陽子 (ISHIDA YOKO)  
山形大学・医学部看護学科・講師  
研究者番号: 60322335