

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目:基盤研究 (C)

研究期間:2007~2008

課題番号:19592492

研究課題名(和文)実験動物による褥瘡発症メカニズムの解明と褥瘡予防・治療法の開発

研究課題名(英文)Experimental pressure ulcers: analysis of the pathogenesis and development of the preventive and therapeutic procedures using animal models

研究代表者

川真田 聖一(KAWAMATA SEIICHI)

広島大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号:30127641

研究成果の概要:褥瘡の実験モデルとして、ラットの腹壁を、1) 腹膜腔内に挿入した鉄板と体表に置いた重り、または 2) 腹膜腔内と体表の磁石で圧迫した。50、100 mmHg で 2、3、4 時間圧迫し、12 時間、1、3、7 日後に試料を採取して、顕微鏡標本で傷害を評価した。圧迫時間が長いほど傷害が重くなった。また、マイクロアレイで約 3 万種類の遺伝子から発現が大きく変動するものを絞り込み、炎症に関係深いものをリアルタイム PCR で解析した。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:看護学・臨床看護学

キーワード:褥瘡・磁石・圧迫・虚血・ラット

## 1. 研究開始当初の背景

褥瘡は、自力での体位変換が困難な虚弱高齢者や身体障害者に起こりやすい。患者数が多いため、医療関係者の関心が高く、社会的に経済上の負担も大きい。褥瘡発生には、局所的要因(加齢による皮膚変化、摩擦とズレ、湿潤、皮膚疾患)、全身的要因(低栄養、やせ、加齢、基礎疾患、ステロイドなどの薬剤内服、放射線治療)、社会的要因(ケアの人手不足、経済的困難、情報不足)が複雑に作用している。このように患者の身体状態や発症に至る経過が様々であること、倫理的に試

料の採取が限定されることから、褥瘡の発生機序に関する研究は遅れており、不明な点が多い。したがって、一定の条件で実験し、組織の微細構造の変化を観察するためには、動物実験モデルの開発が必要である。

また、従来から褥瘡への対策として、予防のために体位変換と除圧の指導が、治療目的で各種医療材料を使用する試みが行われている。しかし、これらの効果に関して客観的で信頼性が高い情報は乏しく、科学的に検討する必要がある。そのためにも、動物実験モデルの開発が望まれる。

## 2. 研究の目的

本研究は、1) 褥瘡の動物実験モデルを開発すること、2) 褥瘡が発生するときの圧力と圧迫時間との関係について検討すること、3) 褥瘡発生過程でどのような遺伝子が関与するかを調べること、4) 褥瘡の予防と治療法を開発するための情報を得るための基礎研究を行うことである。

## 3. 研究の方法

本研究は、広島大学動物実験委員会の承認を得て行った。

8~9 週齢の Wistar 系雄ラットを麻酔後、腹部皮膚の毛を電気バリカンで刈り、目印として、剣状突起、肋骨弓、白線、圧迫を行う部分（剣状突起から尾側に 5mm を上端とする長方形（左右 20×上下 25mm）、下腹部の切開線（剣状突起より尾側に 60mm で左右 25mm）を、油性マジックで印を付けた（図 1）。

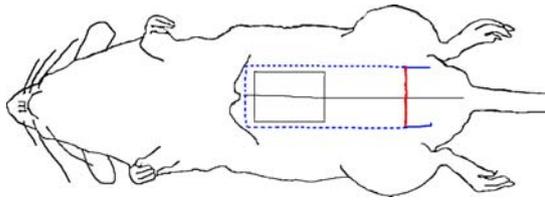


図 1. ラットの模式図。灰色部分が圧迫部。赤は切開線を示す。点線は鉄板挿入部。

### (1) 重りと鉄板を用いた圧迫

仰臥位のラット下腹部を横切開し、表面をシリコン処理した鉄板（幅 25×長さ 190×厚さ 2 mm）を水平に腹膜腔内に挿入して先端がほとんど胸骨柄に当たる位置で止め、鉄板の反対側を架台に固定して水平に調整し、鉄板上の腹壁に金属塊を載せて麻酔下に圧迫した（図 2）。金属塊は、50 と 100 mmHg に相当する鉛の角柱（底面 20 × 25 mm、高さ 60、120 mm）を鑄造して使用した。圧迫後、鉄板を抜き、開腹部を縫合した。

### (2) 磁石を用いた圧迫

表面をシリコン処理したネオジウム磁石（20 × 25 × 2 mm、表面磁束約 2,100 ガウス、西興産業、市川市）を手術で腹膜腔内に挿入し、切開部を縫合した。次に、ネオジウム磁石（20 × 25 × 5 mm、表面磁束約 3,100 ガウス、西興産業）を外部から吸着させ、体内外から磁石で腹壁を挟んだ（図 3）。圧力は、体表と外部磁石間に挟んだアクリル板や紙などの厚さ

を変えて調整した。圧迫時に麻酔有りの群と麻酔なしの 2 群で実験し、圧迫後に手術で磁石を取り出して再縫合した。



図 2. 腹壁を重りと鉄板で圧迫中のラット。W：重り、S：腹膜腔に挿入した鉄板。

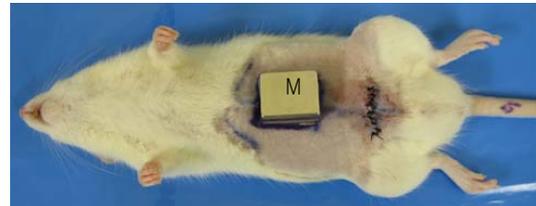


図 3. 磁石 (M) で腹壁を圧迫中のラット。写真撮影のため麻酔してある。

上記 2 種類の方法を用いて、ラットの腹壁を 50、100mmHg の圧力で、2、3、4 時間圧迫した。圧迫開始から 12 時間、1、3、7 日後に、ラットをジエチルエーテルで安楽死させ、圧迫部の腹壁を周囲の部分を含めて採取した。

### (3) 対照群

シャム手術群または無処置群の、対応する部位の腹壁を対照とした。

試料の腹壁を 2 分割して頭側を凍結し、圧迫部中央側をクリオスタットで薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色して光学顕微鏡で傷害の程度を観察した。さらに、表皮から腹筋の筋膜までの厚さが最も厚くなっている部分を中心に左右 1 mm ずつ、計 2 mm をを選び、表皮から筋膜までの厚さの平均値を算出した。

また、圧迫部中央の腹壁の表皮から皮下組織までの部分を、遺伝子発現の解析に用いた。total RNA (全リボ核酸) を抽出し、マイクロアレイ (GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array) で解析した。炎症に関連深い遺伝子 (表 1) は、RNA を逆転写後、リアルタイム PCR で増幅して解析し、 $\beta$ -actin を内部標準因子として定量した。

表 1. リアルタイム PCR で解析した遺伝子一覧

GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
INF- $\gamma$	interferon gamma
L-1 $\alpha$	Interleukin 1 alpha
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta
IL-1Ra	interleukin 1 receptor antagonist gene
IL-2	interleukin 2
IL-6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
IL-10	interleukin 10
MMP-3	matrix metalloproteinase 3
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor, beta-1
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor, alpha

#### 4. 研究成果

##### (1) 組織学的解析

皮膚-筋組織は、表層から表皮、真皮、皮筋、皮下組織、筋層、壁側腹膜で構成されていた (図 4)。圧迫によって、皮膚-皮下組織では浮腫が、筋層の深層部には壊死が観察された (図 5)。

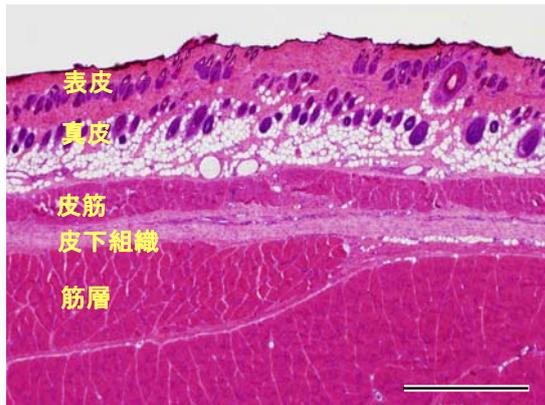


図 4. 正常な皮膚-筋組織。バー=1mm.

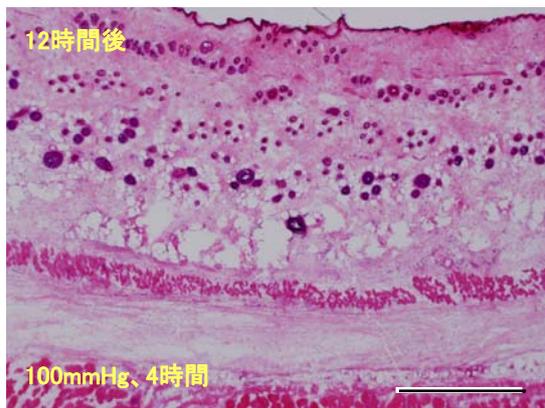


図 5. 磁石で 100mmHg で 4 時間圧迫し、圧迫開始後 12 時間の皮膚-筋組織。真皮と皮下組織が著明に腫脹している。無麻酔。バー=1mm。

皮膚の傷害度の尺度として、皮膚-皮下組織の厚さを計測した。麻酔して金属塊による圧迫では、皮膚-皮下組織は、50 mmHg で 4 時間圧迫では、1 日後に最も厚くなっていた。100 mmHg で 2、3 時間では、ほとんど変化は見られなかった。100 mmHg で 4 時間では、圧迫の 12 時間後に最も厚くなり、1 日後以降は回復に向かったが、どの場合も無処置群に比べて有意差はなかった (図 6)。

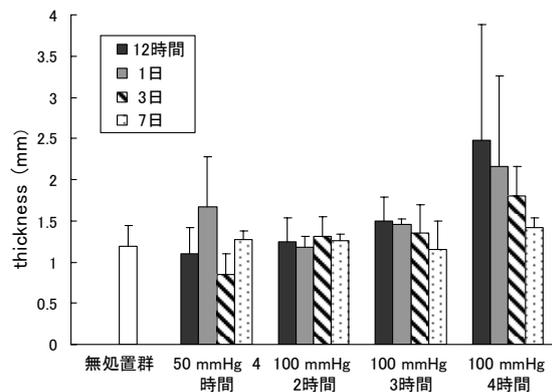


図 6. 金属塊で圧迫したときの皮膚-皮下組織の経時的厚さ変化 (麻酔あり)。

磁石を使い麻酔から覚醒した状態で圧迫すると、100 mmHg で 2 時間の圧迫を除く全ての実験群で、皮膚-皮下組織の厚さが有意に増加していた。50 mmHg で 4 時間と 100 mmHg で 2 時間の圧迫では、浮腫は 1 日後が最高で、3 日後から 7 日後にかけて軽減した。圧迫条件が厳しい 100 mmHg で 3 時間と 100 mmHg で 4 時間では、浮腫は 12 時間後に最も強く、その後は徐々に軽減した (図 7)。

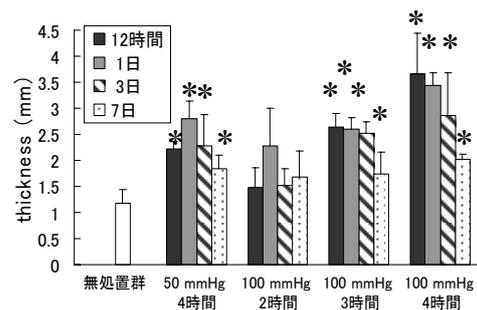


図 7. 磁石で圧迫したときの皮膚-皮下組織の経時的厚さ変化 (麻酔なし)。

\* : 無処置群に対して有意差あり。

このように、同じ圧力と時間でも重りによる圧迫と磁石による圧迫で皮膚-皮下組織の厚さが著しく異なるのは、麻酔が傷害を軽減するためと考えられた (図 8)。

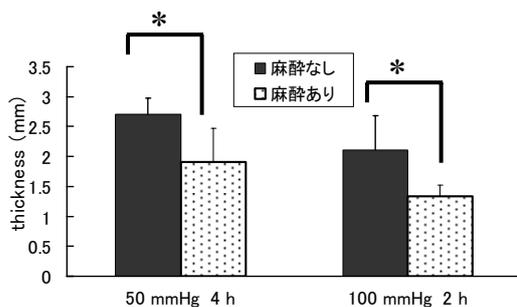


図 8. 磁石による圧迫 1 日後の皮膚-皮下組織の厚さ。圧迫時に麻酔なしが、圧迫時に麻酔ありにくらべて有意に(\*)厚い。

### (2) マイクロアレイによる解析

GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Arrayで、約 31,000 個の遺伝子発現を調べ、シャム手術群や無処置群の発現量に対する比率で圧迫群の発現量を求めた。

シャム手術群に対する発現量が 2 倍以上であった遺伝子は、圧迫 12 時間後で 4,607 個、圧迫 1 日後では 4,454 個、圧迫 3 日後では 2,368 個であった。一方、シャム手術群に対する発現量が 0.5 倍以下であった遺伝子は、圧迫 12 時間後では 5,412 個、圧迫 1 日後では 2,953 個、圧迫 3 日後では 2,927 個だった。

圧迫 12 時間後に増加していた遺伝子には、アポトーシス、炎症、酸化ストレスに対する反応、タンパク質分解、低酸素に対する反応に関わるものが多かった。圧迫 1 日後に増加していた遺伝子には、炎症、タンパク質分解に関わるものが多かった。圧迫 3 日後に増加していた遺伝子には、炎症、タンパク質分解に関わるものが多かったが、12 時間後や 1 日後よりは減っていた。圧迫後の炎症に関連した遺伝子を表 2 に示す。圧迫 12 時間後に GM-CSF、IL-1 $\beta$ 、IL1R、IL-6、IL-10、IL-11、LT- $\beta$ 、MMP-3、TIMP-1、TNF- $\alpha$  が増加していた。圧迫 1 日後には IFN- $\gamma$ 、IL-11、TGF- $\beta$  2、TGF- $\beta$  3 が増加し、IL-1 $\beta$ 、IL1Ra、IL-6、IL-10、LT- $\beta$ 、MMP-3、TIMP-1 は減少していた。圧迫 3 日後には IFN- $\gamma$ 、IL-12 が増加し、IL-4、IL-10、TGF- $\beta$  1、TIMP-1 は減少していた。

### (3) リアルタイム PCR による解析

炎症に関連した遺伝子の変化を調べた(表 3)。GM-CSF や、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL1Ra、IL-6、IL-10、MMP-3、TIMP-1、TNF- $\alpha$  が、圧迫 12 時間後に著しく増加していた。1 日後には IFN- $\gamma$  や IL-6、IL-10、MMP-3、TIMP-1 が増加し、IL-1 $\alpha$  や IL-2 は減少していた。3 日後には IFN-

$\gamma$  や IL-6、MMP-3 が増加し、IL-1 $\alpha$  や IL-2 は減少していた。

表 2. マイクロアレイ解析による炎症に関連した遺伝子の発現量の変化。

遺伝子名	12 時間	1 日	3 日
GM-CSF	8.25	1.91	0.61
IFN- $\gamma$	0.60	25.00	3.71
IL-1 $\alpha$	1.96	0.72	1.42
IL-1 $\beta$	16.95	0.24	1.23
IL1Ra	8.31	0.13	0.98
IL-2	1.08	1.22	0.60
IL-6	82.42	0.01	0.74
IL-10	38.32	0.25	0.16
MMP-3	22.18	0.06	0.61
TGF- $\beta$ 1	1.10	0.71	0.49
TIMP-1	4.83	0.36	0.40
TNF- $\alpha$	6.05	0.99	1.18

表 3. リアルタイム PCR 解析による炎症に関連した遺伝子の発現量の変化。

遺伝子名	12 時間	1 日	3 日
GM-CSF	7.85	1.71	0.60
INF- $\gamma$	2.06	2.26	4.93
IL-1 $\alpha$	1.97	0.34	0.33
IL-1 $\beta$	22.24	1.28	1.45
IL-1Ra	3.98	0.73	0.54
IL-2	0.64	0.40	0.17
IL-6	38.78	10.06	2.52
IL-10	4.36	3.95	1.07
MMP-3	9.01	12.54	2.61
TGF- $\beta$ 1	1.13	0.59	1.26
TIMP-1	2.93	3.35	1.54
TNF- $\alpha$	17.96	1.36	0.77

今回の実験では、マイクロアレイにより、持続的な圧迫後の遺伝子発現を網羅的に調査し、発現量が大きく変動する遺伝子を絞り込むことができた。炎症に関連した遺伝子の発現を調べたところ、GM-CSF や、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL1Ra、IL-6、IL-10、MMP-3、TIMP-1、TNF- $\alpha$  が増加していた。持続的な圧迫による虚血や、虚血再灌流により、炎症性サイトカインが増加し、圧迫部位に過剰に集まった炎症細胞が組織傷害を誘導したと考えられる。炎症に関連した遺伝子の関係性は複雑で、圧迫後の炎症発生のメカニズムはまだ説明が不十分である。今後さらに炎症発生を制御す

る遺伝子の同定と、発現部位や作用部位を特定することで、褥瘡の発生機序解明が進み、褥瘡予防や治癒に貢献できると考えられる。

#### 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8件)

1. Hashimoto M, Kurose T, Kawamata S, Comparison between a weight compression and a magnet compression for experimental pressure ulcers in the rat. *Histological studies and effects of anesthesia*, *Arch Histol Cytol*, in press, 査読有り
2. Kijima Y, Ishikawa M, Sunagawa T, Nakanishi K, Kamei N, Yamada K, Tanaka N, Kawamata S, Asahara T, Ochi M, Regeneration of peripheral nerve after transplantation of CD133(+) cells derived from human peripheral blood, *J Neurosurg*, 110(4): 758-767, 2009. 査読有り
3. Ichinose E, Kurose T, Daitoku D, Kawamata S, The skeletal muscle vascular supply closely correlates with the muscle fiber surface area in the rat. *Arch Histol Cytol* 71(1): 45-57, 2008. 査読有り
4. Moriyama H, Yoshimura O, Kawamata S, Takayanagi K, Kurose T, Kubota A, Hosoda M, Tobimatsu Y, Alteration in articular cartilage of rat knee joints after spinal cord injury. *Osteoarthritis Cartilage* 16(3): 392-398, 2008. 査読有り
5. Hamasaki T, Tanaka N, Kamei N, Ishida O, Yanada S, Nakanishi K, Nishida K, Oishi Y, Kawamata S, Sakai N, Ochi M, Magnetically labeled neural progenitor cells, which are localized by magnetic force, promote axon growth in organotypic cocultures. *Spine* 32(21): 2300-2305, 2007. 査読有り
6. Moriyama H, Yoshimura O, Kawamata S, Takemoto H, Saka Y, Tobimatsu Y, Alteration of knee joint connective tissues during contracture formation in spastic rats after an experimentally induced spinal cord injury. *Connect Tissue Res* 48(4):180-187, 2007. 査読有り
7. Orita Y, Yamamoto H, Kohno N, Sugihara M, Honda H, Kawamata S,

Mito S, Soe NN, Yoshizumi M, Role of osteoprotegerin in arterial calcification: development of new animal model.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(9): 2058-2064, 2007. 査読有り

8. Takemoto H, Yoshimura O, Moriyama H, Imagita H, Shirahama K, Kawamata S, Kajihara H, Tobimatsu Y, The time course and extent of motor neuron loss following spinal cord compression in rats. *広島大学保健学ジャーナル* 6(2): 111-117, 2007. 査読有り

[学会発表](計7件)

1. 川真田聖一、黒瀬智之、人体解剖見学で各種器官の大きさ概念がどう変わるか、第114回日本解剖学会総会・学術集会、2009年3月29日、岡山市
2. 川真田聖一、ホルムアルデヒド発生源であるご遺体への対策、日本解剖学会第63回中国・四国支部学術集会、2008年10月25日、出雲市
3. 黒瀬智之、橋本将和、川真田聖一、ラット褥瘡実験モデルの作製と褥瘡関連遺伝子の解析、第10回日本褥瘡学会学術集会、2008年8月29日、神戸市
4. 小澤淳也、川真田聖一、黒瀬智之、橋本将和、山岡薫、ラット脱神経筋におけるナトリウムチャンネル遺伝子発現の変化、第43回日本理学療法学術集会、2008年5月15日、福岡市
5. 黒瀬智之、橋本将和、小澤淳也、川真田聖一、褥瘡発生に関与する遺伝子の実験モデルによる解析、第43回日本理学療法学術集会、2008年5月15日、福岡市
6. 黒瀬智之、橋本将和、小澤淳也、川真田聖一、ラット褥瘡実験モデルによる発現遺伝子の解析、第113回日本解剖学会総会・学術集会、2008年3月27日、大分市
7. 橋本将和、黒瀬智之、小澤淳也、川真田聖一、ラット実験モデルによる褥瘡の組織変化、第113回日本解剖学会総会・学術集会、2008年3月27日、大分

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

川真田 聖一 (KAWAMATA SEIICHI)  
広島大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：30127641

(2) 研究分担者

広島大学・大学院保健学研究科・助教  
黒瀬 智之 (KUROSE TOMOYUKI)  
研究者番号：20363054