様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 １２ 日現在

機関番号：１１５０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2024
課題番号：２０Ｋ１０６５４

研究課題名（和文）深部損傷褥瘡における自然リンパ球の炎症調整機構を活かす看護ケア方法の開拓

研究課題名（英文）Nursing care approach via group3 innate lymphoid cells to orchestrate pressure-related wounds with deep tissue injury repair.

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）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究の目的は深部損傷褥瘡(Deep Tissue Pressure Injury: DTPI)発生機序を解明を通し適切な炎症を誘導する初期対応の看護ケア開拓である。
皮膚に創作製したマウスのILC3マーカーのRORγt陽性細胞と腸管局在との相関をみたが、創中心部のILC3局在性は確認できなかった。しかし、腸管のRORγt陽性細胞も創作製直後から増加、漸減した。腸管の細胞間結合蛋白は創傷の一時癒合の完了に関連し物理的バリア機能を担うoccludinが経日的に増加、栄養吸収に関わるclaudin2は維持された。創の治癒は腸管へ影響を与える可能性から創傷治癒を調整する看護介入の方策に応用したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究はILC3マーカーのRORγt陽性細胞の皮膚と腸管の局在と相関をみた。圧迫創中心部のILC3局在性は明確にできなかったが、皮膚の受傷は腸管の粘膜上皮細胞の結合を示す結合蛋白への影響を与えていた。特に、創傷の真皮や結合組織の修復時期以降にclaudin2が増加しており、腸管の形態・機能は創の治癒過程に必要なエネルギー吸収路が確保される可能性を明らかにした。さらに腸管粘膜上皮のILC3の免疫細胞数も増減したため、保護するケアとして創傷治癒等に必要な栄養吸収や、免疫力を上げる方策の開拓につながると言える。以上は、看護ケア上の根拠ともなり得る成果であり、学術的にも社会的にも意義があると考える。

研究成果の概要（英文）：　This study aimed to elucidate the mechanism of deep tissue pressure injury (DTPI) and to explore nursing interventions for early regulation of inflammatory responses.
We examined the localization of RORγt-positive cells, a marker of type 3 innate lymphoid cells (ILC3s), in the skin and intestinal tract of mice with pressure-induced wounds. While ILC3s were not observed at the wound center, their number in the intestine increased immediately after injury and decreased by day 3.Occludin, a tight junction protein supporting barrier integrity, showed a time-dependent increase, while claudin-2, involved in nutrient absorption, remained stable.
These findings indicate that skin wound healing may affect intestinal function, providing a basis for developing nursing interventions that modulate the healing process.

研究分野：基礎看護分野

キーワード：褥瘡　創傷治癒　DTPI　ILC3　腸管粘膜上皮細胞　細胞間結合蛋白　occludin　claudin2

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

褥瘡いわゆる「床ずれ」の有病率は、2013 年より 2018 年で 0.73%増加した(Jpn J PU, 2018)。難治性皮膚潰瘍の褥瘡治療は長期にわたり医療費を圧迫し、患者の QOL 低下も著しい。超高齢社会では重大な社会問題に直結するため、褥瘡対策はいっそう重要である。

深部損傷褥瘡(DTPI) は、難治性褥瘡の主要な原因の一つである。難治性褥瘡に移行しやすい DTPI だが、炎症が悪化せずに治癒する場合もあり炎症の調整因子は不明である。DTPI のケアは、慢性炎症による瘢痕治癒を避け皮膚本来の組織機能を多く温存できる様、炎症を早期に適正化する対応が望ましいと考えている。我々は DTPI 初期の炎症を調整する因子として自然リンパ球(innate lymphoid cell: ILC)、特に 3 型の『ILC3』に着目していた。

２．研究の目的

本研究の目的は、1) DTPI 発生初期における ILC3 の炎症調整機構と創傷治癒への影響および DTPI の ILC3 と身体組織の ILC3 との関連を明らかにすること、2) 1) の機構解明を基盤とし、DTPI の炎症を調整する初期対応の看護ケア開拓を目指すことである。

３．研究の方法

１）マウス実験方法: ILC3 マーカーの RORγt 陽性細胞の皮膚と腸管における局在をみたが、圧迫創中心部の ILC3 局在性は確認できなかった（実験 1)。そこで、まずは切開創を作製し、皮膚に比較的高い侵襲を加えたマウス個体の小腸上皮細胞におけるタイト結合の経日的な形態学的変化の解明を目的とした（実験 2)。対象のマウスを皮膚機能の個体差が少ない種に変更し、再度 RORγt 陽性細胞について、圧迫創周囲の皮膚と腸管における局在を観察した（実験 3)。

２）各実験方法

（１）実験 1: 6 **週齢の成熟雄性マウス** (Jcl/ICR) 28 **匹を用いた腹壁を切開した後腹壁部の腹腔に磁石** (1.5mm×10φ) 1 **個を埋め込んだ。背側皮膚から同様の磁石** (2.0mm×10φ) **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。圧迫創の作製後** 0、3 **時間、**1、3、7 **日目にサンプリングした。圧迫創はその周囲の正常皮膚を含めて約** 2×2cm **で摘出し、皮下組織および深部骨格筋層** (筋層) **を含めた。対照皮膚として圧迫創の対側の皮膚をサンプリングした。**

（２）実験 2: 6 **週齢の成熟雄性マウス** (Jcl/ICR)16 **匹を用いた。侵襲性が比較的高い皮膚切開創を作製した。切開創は体表から同じサイズの創を作製でき、条件を一定に揃えることが可能である、**

切開創作製後は、創の安静を図るため創部にポリウレタンフィルム被覆材を用い伸縮性テープで固定し創作製後 1 **日目に除去した。切開創作製群** (創作製群) **は** 3 **時間** (0 **日目)、**1、4 **日目にサンプリングした** (各 n=4)。**マウスにフォーレン吸入麻酔** (2L/m) **下で、創部観察後、頸椎脱臼による中枢破壊にて致死させた。切開創は、その周囲の正常皮膚を含めて約** 2×2cm **で摘出し、皮下組織および深部骨格筋層** (筋層) **を含めた。なお腸管は、胃の幽門部から肛門側への** 3cm **を十二指腸とし、小腸はそれ以降から盲腸直前までとした。小腸は** 2 **分割し、口側を空腸、肛門側を回腸と分類し摘出した。対象群は、**7-8 **週齢のマウスから同様に摘出した。**

（３）実験 3: 7 **週齢の成熟雄性マウス** (Balb/c) 16 **匹を用いた。背部中央の皮膚を磁束密度** 1176G **の磁石** (5.0mm×10φ) **で挟み圧迫創を作製した。磁石をつける位置は実験手技による個体差を減じる為、脊柱を中心に頭尾方向に皮膚を持ち上げた中央とした。**12 **時間の圧迫後に麻酔下で背部皮膚の磁石を除去した。**

３）実験共通手技

（１）免疫組織化学染色 (免疫染色)**；免疫染色には以下の** 3 **つの抗体を用いた。実験** 1 **と** 3 **では抗** ROR gamma antibody (abcam, EPR20006, ab207082)、**実験** 2 **では①タイト結合タンパク質の膜内在性マーカーの抗** occludin (Bioss Antibodies, bs-1495R, 1:400)、**②タイト結合に特異的な細胞間接着に重要な抗** claudin2 (Gene Tex, GTX54535, 1:200) **である。**

免疫染色方法は、定法で脱パラフィン後、リン酸緩衝食塩水 (PBS) **で洗浄、**3%**過酸化水素水にて** 5 **分間内因性ペルオキシダーゼ活性を失活させ、**PBS **で洗浄した。抗原性賦活化のため** 10mM **クエン酸緩衝液** (pH6.0) **にて** 40 **分間加熱処理し冷却後、**PBS **で洗浄、**3%**ウシ血清アルブミン** (BSA) **にて** 60 **分間非特異反応のブロッキング後、一次抗体として抗** occludin, **抗** claudin2 **を用い、切片は** 4℃**で一晩反応させた。一次抗体を反応させた組織を** PBS **で洗浄後、二次抗体** (**ヒストファインシンプルステインマウス** MAX-PO, **ニチレイバイオサイエンス**) **を室温で** 30 **分間反応させ、**PBS **で洗浄後、ジアミノベンチジン** (DAB) (**ペルオキシダーゼ染色** DAB **キット**, **ナカライテスク**) **にて発色させ、ヘマトキシリンにて核染色を施した。**

（２）組織学的分析方法：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を作製した。**3 ㎛の薄切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) **染色、免疫染色も施し、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細胞動態について、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。**

顕微鏡画像分析方法：切開創の組織学的観察は、切開創中心部の炎症性細胞動態の観察を中心に形態学的変化を観察した。細胞の識別基準は、病理学的に専門の細胞検査士のレクチャーを受けた者と分析した。

小腸の組織学的観察では、各組織・細胞の形態学的特徴および各群の絨毛の高さ、パネート細胞の面積、平滑筋層の厚さ、抗 occludin および抗 claudin2 の免疫染色の任意の単位面積当たりの反応面積を測定し、定量化した。絨毛は絨毛突起の頂点から陰窩直前まで、平滑筋層の厚さは陰窩直後から粘膜下層直前までとした。空腸と回腸の絨毛突起の免疫染色反応面積は、管腔側と基底層側に分けて測定した。いずれも測定には、ImageJ (NIH) 画像解析ソフトを用いて行った。
なお、全てに共通する実験方法は下記に記した。
（3）マウス実験管理; 実験に使用した全てのマウスは 1 週間馴化飼育した後に実験に供した。実験中は室温および空調が管理された 12 時間ごとの明暗サイクル環境の下で、飼料、水ともに自由に与え、手術後はマウスを個別にケージに入れて飼育した。フォーレン吸入麻酔 (導入 2L/m、OP 中 1.5L/m) 下で電気バリカンを用い背部と腹壁部の剃毛後に創を作製した。サンプリングはマウスへの侵襲を最低限にするようフォーレン吸入麻酔 (2L/m) 下で、創部を肉眼的に観察した後、頸椎脱臼による中枢破壊にて致死させた。

４．研究成果
１）実験１：ILC3 マーカーの RORγt 陽性細胞の皮膚と腸管における局在と相関をみたが、圧迫創中心部の ILC3 局在性は確認できなかった。腸管においては実験３の結果に含める。
２）実験２：
結果概要
切開層群の腸管粘膜上皮層は減少し、細胞間結合蛋白（occludin，claudin2）は物理的バリア機能を担う occludin、栄養吸収に関わる claudin2 が創傷の一次癒合の完了に関連し経日的に増減した。腸管形態は創の治癒により影響を受ける可能性を明らかにした。
創の肉眼的観察
0 日目：頭側は創閉鎖していたが、尾側で 5mm 程度の表皮および真皮の離開がみられ、創全体がうすいピンク色の発赤を呈し、出血痕が創を取り巻くように付着していたが止血していた。
1 日目：創は、0 日目と比較すると創閉鎖が進行し、発赤や腫脹も軽減していた。
4 日目：不完全な創閉鎖の部位に腫脹と発赤が一部認められたが、概ね外見上創閉鎖していた。
組織学的観察
0 日目：切開部分は表皮から真皮にまで及び、真皮深層には間隙も観察された。好中球の集中的な集積の所見はないが、創中心の真皮中層から深層や創周囲の真皮深層に好中球が多くみられた。マクロファージも創中心の真皮深層で観察されたが、好中球より少なかった。
1 日目：創中心部は表皮と真皮層の連続性が断たれた状態で、表皮の断端は真皮・皮下組織側に陥入した形態を呈し、創閉鎖は不完全だった。創中心は、薄い皮下組織の隔壁と凝固した血液で覆われ。真皮深層には間隙がみられたが、0 日目より軽減していた。創中心から創辺縁の真皮深層から皮筋にかけて、好中球とマクロファージが集積していた。特に創辺縁は、血管の外周を取り巻くように、好中球とマクロファージが多く散在し、ともに 0 日目より増加した。
4 日目：全ての個体で表皮基底層の再建過程が観察され、創が閉鎖していた。表皮基底層は肥厚がみられた。創中心の真皮層と皮筋が再生し一部に連続性が観察された。併せて、創中心の真皮深層から皮筋にかけて、リンパ球や形質細胞などを含む炎症性細胞が多く集積し、核が膨潤し活性化した線維芽細胞を多く含む肉芽組織がみられた。この肉芽組織に向かって真皮深層では帯状に好中球やマクロファージが 1 日目より多く血管外周を取り巻くように集積していた。
小腸の組織学的観察
（1）絨毛の高さ
　空腸：創作製群 0 日目の空腸絨毛は、457.73±14.43μm であり、対照群より減少した。その後、1 日目は 427.43±30.53μm、4 日目は 445.60±29.73μm であった。いずれも、0 日目　の絨毛の高さより低下していたが、対照群との有意差はなかった。
　回腸：創作製群 0 日目と 1 日目の回腸絨毛の高さは、対照群とおおむね同じ高さであった。4 日目のみ対照群より有意に低下したが ($p<0.05$)、0 日目より増加した。
（2）パネート細胞面積 (Data not shown)
　空腸：創作製群 0 日目の空腸のパネート細胞面積は、73.69±3.79μm2 であり、対照群より有意に減少した ($p<0.05$)。1 日目では、有意差はみられなかったが対照群より面積が減少した。4 日目のパネート細胞面積は、53.86±4.93μm2 であり、対照群より有意に減少した ($p<0.01$)。
　回腸：創作製群の回腸のパネート細胞は、0 日目、1 日目、4 日目ともに対照群より面積が減少したが、有意差はみられなかった。パネート細胞面積は、空腸と回腸ともに経日的に減少した。
（3）小腸平滑筋層の厚さ(Data not shown)
　空腸:空腸の平滑筋層の厚さは、0 日目 18.83±0.78μm、1 日目 18.78±0.66μm、4 日目 16.64±1.30μm であり、経日的に減少した。全ての創作製群において、対照群より減少し有意差が認められた ($p<0.01$)。
　回腸：創作製群 0 日目、1 日目の平滑筋層の厚さは、対照群より厚く、0 日目では有意差を認めた ($p<0.05$)。4 日目では、対照群より有意に減少した ($p<0.05$)。
（4） 空腸および回腸の腸上皮細胞における抗 occludin, claudin2 の反応面積
① occludin
空腸と回腸上皮細胞の抗 occludin 反応
　空腸、回腸ともに腸上皮細胞の細胞膜の境界に抗 occludin の反応が認められた。

創作製群と対照群との比較（図 1）

空腸：創作製群の空腸における管腔側は、0 日目では対照群より有意に減少した($p<0.01$)。その後増加し、4 日目では対照群より有意に増加した（$p<0.05$)。基底層側は、0 日目、1 日目、4 日目で対照群より減少した。併せて、創作製群の管腔側と基底層側ともに経日的に増加した。

ii.回腸：創作製群の回腸における管腔側は、0 日目、1 日目では、対照群よりも面積が増加した。4 日目では対照群より減少し、有意差を認めた（$p<0.05$)。基底層側では、0 日目、1 日目、4 日目で対照群より面積が減少し、1 日目、4 日目ではそれぞれ有意差を認めた（1 日目 $p<0.05$, 4 日目 $p<0.01$)。併せて、創作製群の管腔側と基底層側ともに経日的に増加した。

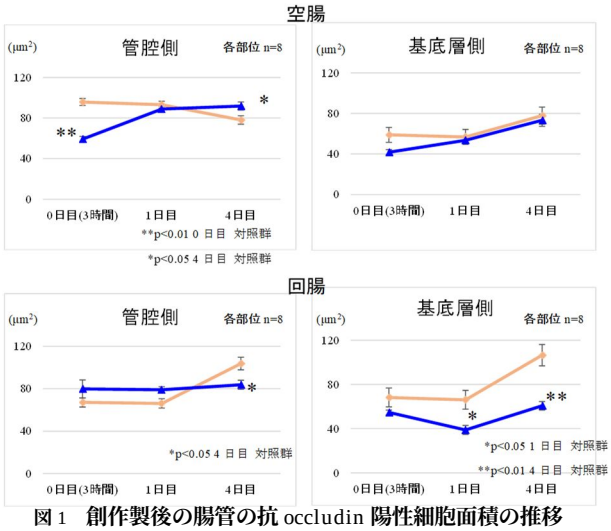

図 1　創作製後の腸管の抗 occludin 陽性細胞面積の推移

②claudin2

空腸、回腸腸粘膜上皮細胞における抗 claudin2 反応（図 2）

occludin と同様に、空腸、回腸ともに腸上皮細胞の細胞膜の境界に抗 claudin2 の反応が認められた。

創作製群と対照群との比較

空腸：創作製群の管腔側は、0 日目、1 日目では対照群と有意差はなかった。4 日目では 54.85±4.84μm² であり、対照群より有意に増加した（$p<0.01$)。基底層側は、0 日目は対照群より増加したが、その後減少し 4 日目では 24.75±5.06 ㎛ ² と対照群より減少した。創作製群の管腔側と基底層側ともに、減少はなくほぼ維持された。

ii.回腸：創作製群の管腔側は、0 日目では管腔側が対照群より有意に減少した($p<0.01$)。その後増加し、4 日目では 54.84±3.86 ㎛ 2 であり、対照群より有意に増加した（$p<0.05$)。基底層側の 0 日目、1 日目、4 日目では、いずれも創作製群のほうが減少し、特に 4 日目では有意に減少した（$p<0.05$)。空腸同様に、創作製群の管腔側と基底層側ともに、大きな減少はみられずほぼ維持された。

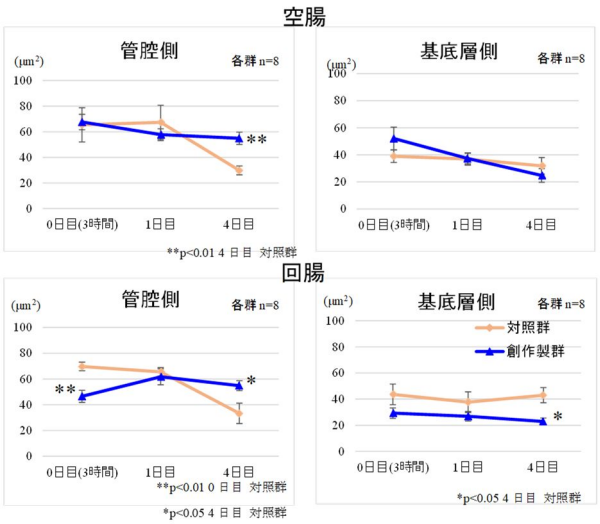

図 2　創作製後の腸管の抗 claudin2 陽性細胞面積の推移

（５）　好中球数、マクロファージ数と抗 occludin, claudin2 反応面積の相関

各創作製群における、好中球、マクロファージ数と抗 occludin, claudin2 反応面積の相関は、全ての創作製群で認められなかった。

３）実験 3：

実験 2 によって、切開創が腸管の細胞結合の形態に影響することが明らかとなったため、皮膚および腸管粘膜上皮における ILC3 マーカーの抗 RORγt 陽性細胞の局在性を分析した。他の実験同様に抗 RORγt 免疫染色を施し、任意の単位面積当たりの陽性細胞の面積を計測して分析した。

結果概要：切開創における抗 RORγt 陽性細胞は創中心部における局在が確認できず、圧迫部位と正常組織との境界、つまり創辺縁部に局在していた。腸管は回腸における抗 RORγt 陽性細胞は 0 日目で増加し、その後 7 日目まで減少した。0 日目と 7 日目には有意差が認められた($p<0.01$)（図３)。

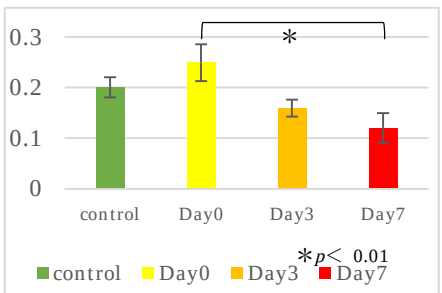

図 3　回腸の RoRγt 陽性細胞/組織面積

４）考察：

本研究によって、皮膚に受傷したマウスにおいて、皮膚の創傷治癒期間中に腸管粘膜上皮における上皮の結合および腸管粘膜上皮の ILC3 数に変化が認められた。特に回腸の粘膜上皮における ILC3 は、受傷時に増加を認めその後は減少に転じていた。初期の炎症応答の鍵として近年注目される(H. Spits et al: Immunol. 2011)。獲得免疫で反応まで時間を要する T／B リンパ球と異なり、体外微生物の認識なしでサイトカインを産生し、迅速に自然免疫を誘導する。この点で、DTPI 初期の微生物侵入がない＝感染がない時期の炎症誘導に ILC が深く関わると考えていた。機能的役割から特に 3 型の ILC3 は、平常時は腸管の粘膜固有層でサイトカインの一種インターロイキン(Interleukin: IL)-17 や IL-22 を分泌(ILC 分泌軸) し、粘膜上皮の維持に関わるが(Vivier E

et al: Nat Rev Immunol.2009)、切開した創傷の真皮層にも誘導され、好中球遊走や表皮細胞の成熟を調整すると言われている。炎症を誘導する腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor: TNFα) を介した炎症調整および上皮バリア機能の成熟にも関わる(Li Z et al: Nat. Rev Immunol,2013 Nat. Commun. 2016)とされている。我々の研究においても、腸管粘膜上皮の細胞間結合のマーカーとなる皮膚の外傷によって、腸管粘膜上皮において物理的バリアを構成する occludin は増加し、栄養吸収に関わる claudin2 はほぼ維持された。創傷の一次癒合の完了に関連し経日的に増減し腸管からの水分や栄養成分の吸収を強化するような形態を示したと考えられる。つまり、腸管形態は皮膚の創形成および創傷治癒過程により影響を受ける可能性を明らかにした。加えて、ILC3 の細胞数に変化を認めたことは、これらの炎症誘導に腸管粘膜上皮の ILC3 が関連していることが示唆される。創傷治癒において、超急性期つまり創傷治癒の初期に関しては、創傷の局所的な ILC3 の変動は認められていない。これまで我々が実験してきた結果からも圧迫創の中心は炎症性細胞の反応性が遅延していた。その結果に追随する様に圧迫創中心部において、局所的には ILC3 を確認することはできなかった。しかしながら、現行進めている創傷治癒関連実験の結果（研究進行中のため data は提示しない）から炎症初期にある介入を行い速やかに炎症をスタートすることによって、過度な炎症を誘導せず適正な創傷治癒過程を経ることができる所見が得られている。今後、この実験においても ILC3 の局在も継続的に確認する予定にしている。

以上のことから、皮膚損傷における局所での細胞誘導を中心に確認していたが、受傷した個体における腸管粘膜上皮の結合にも影響を与え、その機能として栄養吸収の調整にも関わることが考えらえた。さらに、腸管における ILC3 細胞数の変動は皮膚の創傷治癒過程に合わせて正常化しておりその炎症の程度や全身性の炎症誘導にも関連している可能性が考えられる。

５）今後の展望

DTIP をはじめとする褥瘡や創傷の炎症誘導の機序に腸管における粘膜上皮の形態および ILC3 等の自然リンパ球の機能が介在する可能性は、現在、盛んに叫ばれている免疫力を高めるためのいわゆる「腸活」との関係性も深いと推測される。われわれの研究結果から、創傷の発生初期に創への適切な対応および腸管粘膜上皮をケアする介入が創の炎症激化を抑制するケア開発につなげられる可能性が示唆された。臨床においても手術後の早期栄養介入等は全身栄養回復の治療として診療報酬化されているが、その根拠としては疫学コホートや臨床介入結果などの疫学的データに拠る。まだ生物学的根拠はまだ十分とは言えず、まして、腸管内の免疫反応と皮膚の創傷治癒との関係も未だ謎が多い。したがって、今後は看護支援として、褥瘡の創傷治癒を劇症化しない適正な炎症誘導に腸管粘膜上皮における免疫寛容に関わる炎症機構を健常にする介入の開発、ひいては褥瘡治療の診療報酬等につなげる根拠を示すことが期待される。我々の研究グループにおいて、引き続き、圧迫創受傷時の腸管粘膜上皮における免疫機能について研究を重ねる予定である。

引用・参考文献

・Zhi Li et.al: Epidermal Notch1 recruits RORgþ group 3 innate lymphoid cells to orchestrate normal skin repair. nature communications. DOI: 10.1038, 2016

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 木村未来，村田恵理，石田陽子，松田友美
２．発表標題 マウス圧迫創における温冷刺激の創傷治癒への影響
３．学会等名 第25回日本褥瘡学会学術集会
４．発表年 2023年

〔図書〕　計0件

〔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・教授 (11301)	
研究分担者	三浦　奈都子（小山奈都子） (MIURA NATSUKO) (40347191)	岩手県立大学・看護学部・教授 (21201)	

	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
研究協力者	村岡　知里 (MURAOKA CHISATO)		

６．研究組織（つづき）

	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
研究協力者	木村　未来 (KIMURA MIKU)		
研究協力者	相馬　祐也 (SOUMA YUUYA)		

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