

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22792132

研究課題名（和文）DTI の発生機序解明および予防的看護援助技術の開発に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Development Preventive Nursing Care 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・助教

研究者番号：90444926

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、深部損傷褥瘡（Deep Tissue Injury: DTI）の発生機序を解明し、予防的かつ治癒に貢献する看護ケアを開発するために広範に組織の観察が可能である動物実験モデルを開発した。その結果、臨床で発生する DTI の所見を包含した創をラットに作製することができた。炎症性細胞は創縁から創中心部に向けて波及する様子が観察されたことから、創中心部への炎症性細胞浸潤の遅れにより時間差が生じ、一部炎症の慢性化像を示して創傷治癒の遅延を引き起こしたと考えられた。さらに創治癒悪化防止を目的に創作製直後に冷罨法を実施した結果、冷罨法群では圧迫創発生直後は対照群に比較し炎症性細胞の浸潤が多いが、後の壊死領域が減少する所見を得た。組織学的詳細および適切な看護ケア介入方法は今後さらに検討する。

## 研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to investigate the histological findings of ischemic ulcers with all of the relevant tissue layers of the skin in a new DTI model, and development preventive nursing care. The ulcers caused by compression showed prolonged wound healing in vivo. The inflammatory response ‘time lag’ in the ulcer occurred chronic situation from the ulcer edge to center. This new DTI model should provide valuable information for the development of new nursing management strategies for the treatment of DTI. Using this model, we evaluated whether inflammation of wounds can be inhibited by ice cooling nursing care. Necrotic tissue of cooling group was lower damage than control one.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
23 年度	900,000	270,000	1,170,000
24 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：看護学・基礎看護学

キーワード:DTI, 深部損傷褥瘡, 線維芽細胞, 好中球, PCNA, マクロファージ, 看護ケア技術

## 1. 研究開始当初の背景

褥瘡は、圧迫や剪断力などの外力が主な原因で発生する。近年、軽症の「消退しない発赤」に分類される褥瘡の中で、発生の初期にすでに皮下組織・筋までの深い潰瘍を形成し

ている症例を含むことが報告されている。これに関して NPUAP（米国褥瘡諮問委員会）は“Suspected Deep Tissue Injury: sDTI”（深部損傷褥瘡疑い:DTI 疑い）と分類している。表皮発赤のみの初期病変からは、深部組織損

傷の評価が非常に困難なことから“DTI 疑い”と称され問題視されている。DTI である場合は、骨まで至る深い潰瘍を形成し、治癒には長期間を要するため患者の QOL が著しく低下する。患者の身近な存在である看護師はこれらの褥瘡の第一発見者になることが多く、発見時の対応によって予後が左右される可能性もあることから予防も含めた早急な対策の検討が必要とされる。しかしながら、現時点で DTI の発生機序は不明であり、対処方法も自然経過の観察が提唱されるのみであるため課題が多い。

## 2. 研究の目的

DTI の定義上 sDTI あるいは DTI の初期は、表皮の欠損がない状態であるため、臨床において人体からの組織サンプルの採取は非常に困難である。そこで本研究では、DTI の発生機序を明らかにするため動物実験モデルを開発し、それを基に褥瘡発生や悪化予防の看護ケア技術を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### I. DTI 動物実験モデル作製の必要性和創傷治癒評価

深部組織 DTI 動物実験モデルの確立に向けて実験を進めた。褥瘡の動物実験モデルは従来さまざまな方法が開発されている。しかし、DTI の病態を解明するにあたっては従来の方法では問題として以下の点が挙げられる。1) 創の作製上、前手術処置が必要な方法は手術操作により観察目的組織の細胞動態への影響が大きい。2) 創作製方法が体表からの圧迫によるため臨床で発生する患者の自重の影響を受けた損傷とは異なる。3) 動物の種類や部位によって損傷部位や皮下組織を含まないなど損傷組織に差が生じる。4) 動物への侵襲性が高い方法は個体の創傷治癒系に影響する恐れがある。以上の点を鑑みて、本研究では臨床における DTI の発生状況を可能な限り再現できる方法を考案した。オリジナルの創傷作製方法を考案し以下の方法を実施した。

#### 1) 対象

9-10 週齢の Wistar 系雄性ラット (Japan SLC Inc., Japan) 36 匹、体重  $232.2 \pm 8.1$  (Mean  $\pm$  SD) g を 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実験に供した。

#### 2) 圧迫創作製方法

手順：イソフルラン (Forane®アボットジャパン株式会社) 吸入麻酔下 (導入 2.5 l/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、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 ( $\phi$  10mm $\times$ 10mm : 488mT) を腹腔内の後腹壁側に挿入し、体表から腰背部の高さと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。6 時間後、同様に麻酔下で磁石を外した。

#### 3) 摘出、標本作製および組織の観察

磁石除去直後 0 から 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 および 28 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た。毎日体重計測を行った。組織学的観察用の組織は、ジエチルエーテル (和光純薬) を用いて致死させた後速やかに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、エタノール、キシレンで脱水・透徹した。その後、パラフィン包埋し、マイクロミクロームにて 5  $\mu$ m の切片を作製し光学顕微鏡で観察した。

#### 4) 免疫組織化学染色

抗体：抗ラットマクロファージ (RM-4; Trans Genic Kumamoto, Japan) を用いてマクロファージを染色した。増殖細胞の検討には、PCNA 抗体 (PC-10; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA.) を用いた。PCNA は核内で DNA 複製に活性化する酵素 DNA ポリメラーゼ  $\delta$  の補助蛋白である。細胞増殖マーカーとしては、PCNA 抗体のほかに ki-67、MIB-1 など信頼性が高いマーカーが報告されているが、いずれもヒト特異性が高く動物実験には不適合である。そのため特異性の問題を解決する抗体 PC-10 を選択した。PCNA は G1 期から S 期を陽性とする報告が多いが、非増殖層に移行してからもしばらくは PCNA が存在し続けるという報告もあり (臨床検査 39 (11) 1995)、本研究では細胞増殖および細胞増殖部位を確認するマーカーとして使用した。

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。抗原賦活化処理および一次抗体反応に関して、抗ラットマクロファージ (RM-4) は、プロテアーゼ溶液 (ニチレイバイオサイエンス、ヒストファイン) を切片に滴下し湿潤環境で 10 分間インキュベートした後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて洗浄し一次抗体の RM-4 (1:200 希釈) を室温で 15 分間反応させた。PC-10 は、抗原賦活化液 pH9 (ニチレイバイオサイエンス) 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 PC10 (1:200 希釈) を室温で 15 分間反応させた。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

ラット MAX-PO (ニチレイバイオサイエンス) を各切片に用い室温で 10 分間反応させた後、3, 3'-ジアミノベンチジン (DAB) を用いて発色させた。

#### 5) 抗体陽性細胞の画像データ処理

RM-4、PC-10 の抗体により免疫組織化学染色した組織標本はデジタル CCD カメラにて撮影した。画像データの計測は、NIH Image 画像解析ソフト (Image J) を用い、各組織層の単位面積における抗体陽性細胞面積の比率を測定した。単位面積は  $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$  ( $400\mu\text{m}^2$ ) の区画とし、一標本につき 10 カ所ずつ計測した。

## II. 冷罨法実施評価

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を開発することを目的に冷罨法が有効である可能性を考えた。作製した DTI モデルをコントロール群 (Control Group: Cont.) とし、創に冷罨法を実施した群は冷罨法群 (Cooling Group: Cool) とした。Cont と同様に肉眼的、組織学的観察を実施した。

## 4. 研究成果

### I. DTI 動物実験モデル作製の必要性和創傷治癒評価

#### 1) 対象の体重

本実験条件下で、ラットの体重は術後 1~3 日目くらいまで若干減少したが、その後増加した。無処置群と比較し手術処置後の体重に有意な差はみられなかった。

#### 2) 作製した圧迫創の特徴

(1) 創作製初期は表皮の剥離がない連続性が保たれた状態で、創部の細胞動態が手術操作準備等による周辺組織損傷からの影響をほとんど受けない。(2) 創の治癒に 28 日以上要し、治癒が比較的遅延するモデルである。

(3) 圧迫の方向性を考慮し、皮下組織および深部骨格筋も含めた組織の損傷が認められる。(4) 比較的簡便な方法で再現性があり、死亡例は 0% であり、動物侵襲性が少ない。

#### 3) 肉眼的所見

磁石除去直後 0 日目の創は、暗紫色で磁石圧迫部分は凹状だった。1 日目には、圧迫部分が蒼白となり、創縁部に軽度の発赤がみられた。3 日目から創表面中央に部分的な黄色変化が認められ始め、4~5 日目には創表面中央部の黄色変化領域が増加し、創縁部の発赤が増強・拡大した。7 日目には創部全体が黄色~黄土色に変化した痂皮を形成し創縁の発赤はさらに拡大した。その後、痂皮は黄土色~薄茶色へと変色がみられ 10 日を過ぎると硬化し、わずかに縮小がみられた。14 日目以降、痂皮の硬化は進行し徐々に痂皮辺縁下から上皮化を認めたが、創部の痂皮は剥離せず 20~28 日まで覆っていた。

#### 4) 組織学的観察

##### (1) 炎症性細胞の動態

##### (1) -1 皮膚各層の特徴的所見と好中球の浸潤

表皮：圧迫を受けた 0 日目の表皮基底層細胞は扁平に変形しておりそれに伴って核の変形もみられたが、表皮の連続性は保たれていた。3~7 日目、痂皮形成がみられ始めた表皮から真皮層には好中球が局所的に浸潤し、7 日目には圧迫部分のほとんどの表皮から真皮表層部分に好中球の浸潤を伴う壊死層 (Slough) を覆う痂皮形成が認められた。

真皮：0 日目は大きな変化を示さなかった。

1 日目圧迫部位は線維芽細胞等の核が全体的に染色されない像が認められた。3 日目では膠原繊維のエオジンによる強染がみられ変性を示した。皮筋直上の真皮深層において太い血管の周囲に局所的な浮腫像を認めた。5 日目~7 日目では真皮表層の Slough の形成が顕著に認められた。Slough 下の真皮深層では血管の拡張が起り、活性化した線維芽細胞の核がみられ肉芽の形成も徐々に認められた。14 日目になると、痂皮の下層に非活動性の線維芽細胞が増加し少数の毛細血管を含む癒痕組織が形成されていた。28 日目まで圧迫部分に新生した表皮基底層、真皮層では癒痕組織と毛細血管がみられ、皮膚付属器官は消失していた。

皮下組織：0 日目は圧縮像がみられた。1 日目は疎性結合組織内に好中球の浸潤が顕著に認められた。1~7 日目くらいまで結合組織の層構造が乱れ境界が不明瞭となる浮腫像が観察された。7~10 日目では円形の核を示す活性化した線維芽細胞がみられ、太い膠原線維束を認めた。

深部骨格筋層：0 日目は圧迫像が観察された。0~1 日目は圧迫範囲の筋組織は皮筋も含め筋線維が波形状に収縮していた。好中球が筋層の疎性結合組織に浸潤している様子が観察された。1 日目以降、創縁部から創中心部にかけて炎症性細胞の浸潤がみられ炎症が波及する様子が観察された。7 日目には圧迫された筋の損傷中心部分まで活性化した筋衛星細胞の核が多く認められ、筋線維の中心に核が位置している再生像を認めた。

##### (1) -2 マクロファージの分布部位と浸潤時期 (図 1)

表皮：7 日目では、痂皮直下にみられた

真皮：1~3 日目では、Cont. と比較し真皮マクロファージ数の減少を認めた。7 日目には毛包周囲に多く集積し貪食していた。14 日目には Cont. と同数ほどに減少したが、真皮マクロファージは少なく、毛包の貪食が顕著に認められ毛包組織構造の不明瞭化が認められた。

皮下組織：皮下組織層へのマクロファージの浸潤は 3 日目には増加し 7 日目をピークに増加した。

深部骨格筋層：3 日目から 7 日目をピークに

増加し損傷筋細胞組織の貪食がみられた。

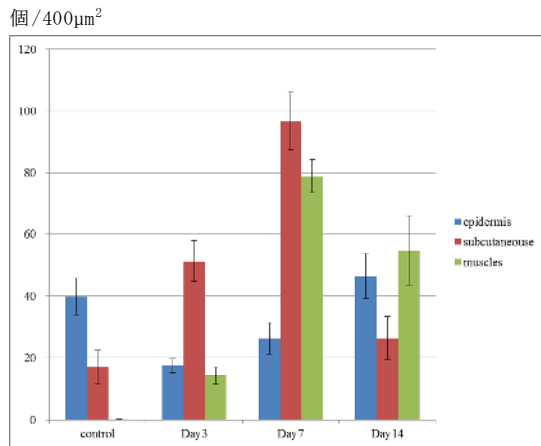


図 1 RM-4 陽性細胞数の変化

## (2) 細胞増殖動態の変化 (図 2)

PCNA 抗体 (PC-10) を用いて細胞増殖の動態を観察した結果、マクロファージの浸潤を追跡して細胞増殖が観察された。PC-10 陽性細胞は、好中球およびマクロファージ浸潤が早い皮下組織において 1 日目から変化し始めた。3 日目には PC-10 陽性細胞が多く観察され、7 日目をピークに 14 日目には Cont. と同等となった。表皮および真皮は 14~21 日目に表皮の増殖時期にかけて表皮基底細胞、真皮の線維芽細胞で増殖が認められた。

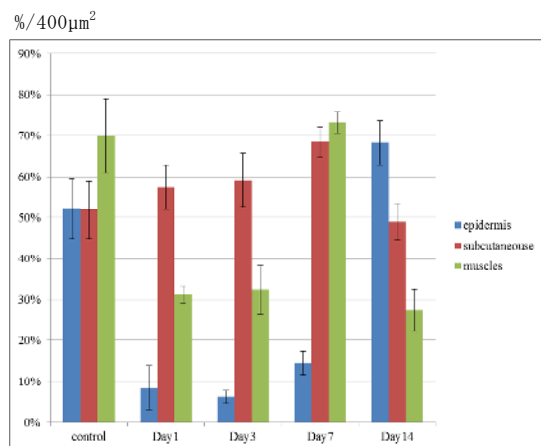


図 2 PCNA (PC-10) 陽性細胞率の変化

以上の結果から、圧迫によって作製した創の炎症は、皮下組織や骨格筋層の疎性結合組織内において早期に炎症性細胞が浸潤して進行するため創の炎症に時間差が生じ、創の治癒遅延を惹起する可能性が示唆された。

## II. 冷罨法実施評価

### 1) 肉眼的所見

Cont. と比較して初期には顕著な所見の変化は認められなかったものの 7 日目の痂皮形成時期において Cool は比較的皮膚の茶褐色

変色が軽度な傾向を示した。

### 2) 組織学的所見

1 日目は真皮において Cont. よりも Cool の方が比較的真皮深層から中層への好中球の浸潤の進度が早い傾向がみとめられたが、大きな所見の差異は認められなかった。しかし、Cool は 5 日目~7 日目真皮浅層部分の Slough 領域が少なかった。

以上のことから、創傷発生直後に冷罨法を実施することによって、壊死領域を減少させ創傷の悪化を抑制する可能性が示唆された。

今後は、創傷を悪化させず早期に回復が可能となる冷罨法実施の条件をさらに詳細に検討するとともに臨床看護師との検討会を開催し、意見や臨床所見と併せながら、実験モデルの組織評価および動物実験モデルの改良を実施していく予定である。

### 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)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 松田友美, 石田陽子, 三浦奈都子, 長岡純二, 多田耕一, 美濃谷知子, 居鶴一彦: 深部損傷褥瘡モデルの細胞動態. 第 42 回日本創傷治癒学会, 2012 年 12 月 2-4 日 札幌市, かでる 2・7
- 2) Yumi Matsuda, Kazuhiko Izuru, Tomoko Minotani, Yoko Ishida: Development of a Deep Tissue Injury Animal Model. WUWHS, 2012 年 9 月 2-6 日 横浜市, パシフィコ横浜
- 3) 松田友美, 三浦奈都子, 石田陽子: 深部組織損傷 (DTI) 褥瘡モデルの作製に向けた基礎的研究, 第 31 回日本看護科学学会 学術集会, 2011 年 12 月 2-3 日 高知市, 高知市民文化ホール, 文化プラザカルポート
- 4) 松田友美, 石田陽子: 仙骨部皮膚にみられた深部組織損傷を疑う褥瘡の一事例, コ・メディカル形態機能学会第 9 回総会学術集会, 2010 年 9 月 11 日 新潟市, 新潟大学医学部
- 5) 松田友美, 石田陽子: 深部損傷褥瘡 (DTI) の動物実験モデル作製に関する組織学的検討. 第 12 回日本褥瘡学会学術集会, 2010 年 8 月 20-21 日 千葉市, 幕張メッセ

### 6. 研究組織

研究代表者

松田 友美 (MATSUDA YUMI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 90444926