

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20日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22792134

研究課題名（和文） 糖尿病の皮膚創傷における治癒遅延のメカニズム-糖尿病マウス皮膚の形態学的研究-

研究課題名（英文） Morphological studies on the wound healing of the diabetic mouse skin

研究代表者

寺嶋 美帆（TERAJIMA MIHO）

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：90381433

研究成果の概要（和文）：糖尿病マウス（糖尿病群）の皮膚創傷治癒過程の中でも肉芽期に注目し、正常な治癒過程を示す対照群と形態学的に比較観察した。糖尿病群では、炎症期の延長、表皮回復と創幅の縮小の遅延がみられ、治癒が遅延していた。肉芽期では、対照群にはみられない線維成分が存在し、その部分に細網線維を確認した。同部位に血管新生と膠原線維の新生がみられなかったことから、線維成分の残存が治癒遅延に影響していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to clarify the morphological variation of the granulation phase in wound healing process using diabetic mice. In the diabetic group, extension of the inflammatory phase, and delay of epithelialization and wound contraction were observed. Cross-sectional analysis revealed that reticular fiber was existed without neovascular formation and collagen fiber in the granulation phase. These data indicated that residual fiber components affect delayed wound healing process in diabetic mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：基礎看護学

科研費の分科・細目：看護学・基礎看護学

キーワード：看護技術、創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒過程は細胞成分、細胞外基質、サイトカインの働きが複雑に絡み合っている高度な再生反応であり、これらのどの一部分が異常を起こしても治癒遅延、瘢痕化など臨床的な問題となることが知られている。糖尿病は創傷治癒を阻害する全身的要因の一つであり、看護においても、褥瘡や外科的侵襲後の回復過程のケアに際して、非常に重要な情報となる。

近年、Wound bed preparation に基づいた

褥瘡ケアが提唱され、臨床現場で広く取り入れられている。それに伴い、創傷ケアも見直され、そのメカニズムの解明が急速にすすんでいる。糖尿病マウスの創傷治癒は褥瘡に代表される慢性創傷モデルとして考えることができ、感染対策、ドレッシング材の選択や創部の洗浄方法、栄養管理などの創傷ケアの計画立案に基礎的情報を与えることができる。

創傷治癒において、糖尿病は皮膚潰瘍に深く関連していることから、潰瘍の病態解明に

注目した研究報告が多くみられる。実験動物を用いた研究は 1990 年代からストレプトゾシン誘発糖尿病モデルラットを用いた報告がみられる。その後、遺伝子変異による 2 型糖尿病マウスが発見され、マウスを使用した報告が多くみられるようになった。糖尿病モデル動物の創傷治癒に関しては *in vitro* の報告が多く、実験形態学的に調査したものはほとんど見当たらない。

糖尿病の創傷治癒では、末梢血管障害が治癒遅延の主な原因の一つと考えられるが、糖尿病の皮膚創傷における肉芽形成に関して、新生血管の形成、線維芽細胞の出現と分布、膠原線維の成熟過程についての形態学的な報告は非常に少ない。申請者は先行研究で糖尿病マウスの創傷治癒過程を正常な治癒過程を経過する対照群と比較観察してきた。マウス皮膚の創傷治癒過程の進行は非常に速いため、肉芽期の詳細な観察をするためには今までの創作製後（以下、受傷後）1 日おきの観察に加え経日的な観察を行う必要がある。現在、このような短い間隔で肉芽期を形態学的に追跡した報告は見当たらない。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、対照群と比較して糖尿病マウスの皮膚創傷治癒過程において、炎症期の延長、肉芽期における線維成分の残存、表皮形成と創幅縮小の遅延が起こることを明らかにしてきた。治癒遅延の主な原因の一つに末梢血管障害が考えられるが、肉芽期における新生血管の形成や線維芽細胞、膠原線維産生について形態学的に精査した研究は見当たらない。

今回、創傷治癒過程の肉芽期を中心に、糖尿病群の細胞成分の動態や先行研究でみられた線維成分の構造と分布の変化について、形態学的に明らかにするため、光学顕微鏡下の観察および線維成分の免疫組織化学的解析を行い、糖尿病の皮膚創傷における治癒遅延のメカニズムを考察する。

3. 研究の方法

(1) 顕微鏡的観察

2 型糖尿病の 10 週齢雄マウス KK-A^y/TaJc1 を糖尿病群、10 週齢雄マウス C57BL/6JJc1 を対照群とした。対照群、糖尿病群ともに各時点 3～5 匹のマウスを使用した。体重を測定し、除毛、消毒後、脊柱高位の両側に皮膚生検用パンチと外科用ハサミを用いて皮筋層にいたる直径 3 mm の開放創を作製した。創部はポリウレタンフィルムにて閉鎖環境においた。ポリウレタンフィルムが剥がれないようにその上から弾性粘着包帯で巻き、飼育ケージに戻した。創作製後（受傷後）1、3、5、7、15 日目と肉芽期にあたる受傷後 4、6、8 日目に、創部を含む皮膚組織を直径 8

mm の皮膚生検用パンチにて摘出した。摘出した組織は、パラフィン包埋用、凍結切片用、樹脂包埋用に分け、それぞれ常法に従い、固定、脱水、包埋した。パラフィン切片はヘマトキシリン・エオジン染色、エラスチカ・ゴールドナー変法染色、渡銀染色を施し、光学顕微鏡（光顕）下での観察を行なった。凍結切片ではフィブロネクチンと血管内皮細胞の局在を免疫組織化学的に観察した。樹脂ブロックからは準超薄切片を作製しトルイジンブルー染色にて観察を行った。

糖尿病群は、高血糖状態であることを確認するため、創作製日および組織摘出日に血糖値および尿糖を測定した。

(2) フィブロネクチンの局在

凍結標本から切片を作成し、1 次抗体はラビット抗ウシフィブロネクチンを、2 次抗体はペルオキシダーゼ標識アフィニティ精製マウス抗ラビット IgG を用いた。

(3) 肉眼的観察

創傷作成日、創部摘出日に創部周囲をデジタルカメラで撮影し肉眼的に観察した。

(4) 倫理的配慮

本実験は筑波大学動物実験委員会の承認を得て行なった。

4. 研究成果

(1) 肉眼的観察

創径は、対照群では経時的に縮小し、受傷後 5 日目から 7 日目で著しく縮小していた。糖尿病群では、創径の縮小に個体差がみられたが、全体的には受傷後 3 日目にやや拡大した後、受傷後 7 日目までに徐々に縮小していた。受傷後 15 日目には、対照群では毛が再生していたが、糖尿病群では毛は再生されていなかった。創部は両群ともに癒痕化していた。

(2) 糖尿病群の創傷治癒過程

炎症期にあたる受傷後 1 日目から 3 日目において、糖尿病群では対照群にみられる好中球の痂皮下への集積が対照群より明らかに少なく、好中球、マクロファージは創部に散在していた。受傷後 3 日目では脂肪滴を含む線維芽細胞が確認された。線維成分の分布は対照群では疎であったが、糖尿病群では豊富にみられた。また赤血球や細胞小片も多くみられた。

肉芽期にあたる受傷後 5 日目では、対照群の創幅が縮小し、表皮が回復していた。また対照群では、創部全体で新生血管と線維芽成分を主とする肉芽組織を形成していた。好中球はほとんどみられなかった。糖尿病群では、対照群にはみられないフィブリンと思われる

る帯状の線維成分が創部中層にみられ、その部位に線維芽細胞や新生血管は確認されず、肉芽組織は創端にみられた。好中球、マクロファージは受傷後3日目よりも増加し、大きな脂肪滴を含む線維芽細胞が多く確認された。受傷後7日目には、対照群では表皮が正常に近い厚さになり、創部では内腔の広い毛細血管が多数観察された。糖尿病群では線維成分が消失し、全体で肉芽を形成していたが、創幅は広いままだった。表皮はほとんどの個体で回復していた。創部の肉芽組織では毛細血管や線維芽細胞が確認され、マクロファージが散在し、好中球は減少していた。

組織再建期にあたる受傷8日目以降でも糖尿病群では炎症細胞である好中球やマクロファージの存在を認め、受傷後15日目まで確認された。創部は受傷後15日目では肉眼的には対照群と同様に治癒に至っていたが、顕微鏡的には対照群に比べて膠原線維の分布が疎であった。

(3) 肉芽期における線維成分の変化

① 渡銀染色による観察

対照群では、受傷後5日目には渡銀染色で黒く染まる細網線維と赤く染まる膠原線維が混在していたが、次第に膠原線維に置き換わり、受傷後15日目には膠原線維が密に分布していた。糖尿病群の受傷後5日目に創部中層でみられた線維成分は黒く染まり、その部分では細網線維を確認し、その周りの肉芽組織では膠原線維の分布を認めた。細網線維は受傷後7日目では創全体に、受傷後15日目では創部表層から中層でみられ、膠原線維の新生が遅延していた。

② フィブロネクチンの局在

受傷後5日目に糖尿病群の創部中層でみられた線維成分と同部位にフィブロネクチンの局在を確認した。

(4) 糖尿病群の治癒遅延に対する考察

① 創傷治癒遅延

糖尿病群の創傷治癒過程では、好中球やマクロファージが創部に散在し、炎症期が延長し、炎症性細胞である好中球、マクロファージは受傷後15日目まで創部にみられた。また、創幅の縮小、表皮の回復も遅延していた。高血糖状態により、好中球機能の低下、リンパ球、マクロファージなどの細胞性免疫機能低下、末梢神経障害、血流障害、膠原線維産生能低下が起こるといわれている。好中球が正常に機能できないことが、好中球の次に出現するマクロファージや線維芽細胞、さらに表皮細胞等の動態に影響していると考えられる。

② 肉芽期にみられた線維成分の変化

糖尿病群の肉芽期では、創部中層に線維成

分がみられ、その部位では血管新生や膠原線維の新生はみられなかった。また、線維成分と同部位に細網線維の存在を確認し、受傷後15日目まで創部にみられた。同じく受傷後5日目の線維成分にてフィブロネクチンの局在も確認された。

細網線維はⅢ型コラーゲンからなり、細かい網目状の構造を形成する。細胞遊走の足場となるため、創傷治癒過程の初期段階で増殖し、Ⅰ型コラーゲンと置き換わることが知られている。また、創傷治癒においては、まずⅢ型コラーゲンの量が上昇し、ついでⅢ型コラーゲンの減少とともに、Ⅰ型コラーゲンが徐々に増加するといわれている。フィブロネクチンは創傷治癒の早期に多量に分泌され、各種細胞が創部に遊走するための足場を形成し、コラーゲンの成熟にしたがって数日で局所から消失する。

糖尿病群では細網線維は受傷後5日目から組織再建期にあたる受傷後15日目までみられており、Ⅰ型コラーゲンへの置換が阻害されていることが考えられる。これは、好中球などから分泌されるコラーゲナーゼのようなタンパク分解酵素が創部に必要なときに不足することにより、線維成分が残存すると推測される。またフィブロネクチンについては、受傷後7日目以降いつまで創部にみられるのか確認が必要である。

糖尿病群では肉芽期以降も治癒が遅延していたことから、肉芽形成が線維成分の残存により阻害され、さらにそのことが表皮回復、創幅の縮小といった創傷治癒過程全体にも影響を及ぼしていると考えられる。

③ 研究の限界

今後、フィブロネクチンの受傷後5日目以降、受傷後15日目までの経時的な変化と、線維成分の免疫組織化学的な解析が必要である。また、新生血管の形成についてCD31を用いて観察を始めていたが、データをまとめるに至らなかったため、線維成分の関係とともに明らかにしていく必要がある。線維成分の構造については、電子顕微鏡による観察を計画していたが、観察途中であったため、治癒過程全体の微細構造の観察とともに解析を進めていく必要がある。

また、糖尿病群では脂肪滴を含んだ線維芽細胞が多く観察された。申請者が先行研究で電子顕微鏡下での観察を行ったが、なぜそのような形態を示しているのか明らかにできなかった。この線維芽細胞についても解析を続けることで治癒遅延の新たな原因を発見できる可能性がある。

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 1 件)

- (1) 寺嶋美帆 (代表) 林 弘之、金村尚彦、五味敏昭、志賀 隆、糖尿病モデルマウスの皮膚創傷治癒過程-肉芽期に注目して-、第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013 年 3 月 29 日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場、香川県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺嶋 美帆 (TERAJIMA MIHO)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：90381433