

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：23302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659956

研究課題名(和文)低蛋白血症ラットにおける褥瘡発生機序解明のための病態モデル開発

研究課題名(英文)Condition of a patient model development for ulceration mechanism elucidation following pressure loading in protein malnourished rats

研究代表者

北山 幸枝 (Kitayama, Yukie)

石川県立看護大学・看護学部・准教授

研究者番号：20419740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本邦の高齢者医療問題である褥瘡発生の一因に栄養低下があるが、その皮膚組織変化を明らかにした研究はない。低蛋白の栄養不良ラット(以下0%群)を用いて褥瘡発生時の所見を観察した。金沢大学動物実験委員会の承認を得た。

正常皮膚(HE染色)では、両群とも表皮の厚み、皮筋や皮下脂肪層の割合に大差なく、0%群では骨格筋の割合が減少していたことから、低栄養状態では荷重により深部の組織ダメージが大きくなることが示唆された。加圧直後～24時間後いずれの部位もアポトーシス(CC3a染色)の所見はなかったが、ネクローシスを示すHMGB1染色では圧迫側境界部(Ep)が最もダメージを受けていたことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：There was a nourishment drop in a cause of the pressure ulcer development that was the issue of elderly care in Japan. But there was no study that determined the skin tissue changes. We observed views at pressure ulcer development using protein malnourished rats (0% group). We obtained approval of Kanazawa University animal experiment Committee.

With the normal skin (HE staining), there was no great difference in the ratio of epidermal thickness, cutaneous muscle and subcutaneous fatty layer and the both groups. Because the ratio of skeletal muscle decreased in the 0% group, it was suggested by load in the malnutrition that the tissue damage in the deep part.

The apoptotic (CC3a staining) views were not seen in p in which during 24 hours from the pressure cancelled time. However, is the HMGB1 staining indicating necrotic views; a pressure side border part (Ep) caught the damage most.

研究分野：創傷看護

キーワード：低蛋白血症 ラット 褥瘡発生 創傷モデル HMGB1 ネクローシス CC3a アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦の高齢者医療問題のひとつに、寝たきり状態で起こる褥瘡が挙げられる。褥瘡とは、日本褥瘡学会の定義では「身体的に加わった外力によって生じる組織の不可逆的な阻血性障害」とされ、2006年度の学会の調査では日本の有病率は3.6%である。そのうち3割が皮下組織を超える深い褥瘡であることが、極めて重大な問題となっている。

・褥瘡の発生要因には外的要因(外力)である圧力や摩擦のほか、内的要因として栄養低下や加齢などがあるといわれている(Braden et al., 1987)。実際に、入院や施設入所高齢者では8割以上が低栄養もしくは低栄養リスクにある(Izawa et al., 2006)とされ、最新の知見では、褥瘡保有高齢者は発生前に58.7%が低栄養であることが明らかになっている(Iizaka et al., 2009)。

(2) 日本褥瘡学会の「褥瘡予防・管理ガイドライン」(2009)では、「褥瘡予防における栄養の役割についてのエビデンスは不足している(WOCN ガイドライン, 2003)」とし、「その原因として褥瘡発生リスク患者は個々の病態による背景に違いがあること、同じカロリーを投与してもその吸収量は個々の症例によって異なること、栄養療法の効果が出現するには時間がかかることなどが挙げられている(Langer et al., 2008)」と解説している。

(3) 基礎研究の分野において、低栄養すなわち栄養状態不良(体重減少や低蛋白血症など)の状態、外力(圧力)が加わった皮膚組織がどのように変化するかについては、1990年代より本邦において動物実験で少しずつ明らかにされてきた(Takeda et al., 1992; 武田 他, 2000)が、一定の加圧負荷後1時点あるいは2時点での横断的調査であり、褥瘡発生の過程について経時的な観察がおこなわれていない。

つまり、栄養不良状態下では皮膚組織にはどのような変化があり、そこへ圧力のような外力が加わり褥瘡発生した時に皮膚はどの程度変化しているのかについては必ずしも明確に示されておらず、このような基礎的内容について臨床研究から知見を得ることは倫理的にも困難である。

(4)そこで、実験条件がコントロール可能な病態動物モデルを用いた基礎的研究により、栄養状態と褥瘡発生の複雑な関連を明らかにすることが可能となり、褥瘡の基礎研究の発展に大きく寄与できると考えた。

2. 研究の目的

低蛋白血症の病態を呈した栄養不良ラットのモデルを用いて褥瘡を作製し、その発生時の所見について組織学的に検討する。

(1)低蛋白血症の病態を呈した栄養不良ラットの皮膚(圧力を加えない状態)は、標準飼料摂取ラット(control)のそれと比べ、どのような違いがあるのかを明らかにする。

(2)局所皮膚に圧力が加わる時に、皮膚および皮下組織がどのように変化しているのかを明らかにする。

(3)褥瘡発生(カテゴリ/ステージ I)時に、皮膚および皮下組織がどのように変化しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)材料;8週齢の雄性ラット(Wistar系)を2群に分けた。

A群:標準飼料摂取〔control群〕6匹

B群:無蛋白食摂取〔実験群,以下0%群〕6匹、計12匹

無蛋白低栄養モデル;研究者らグループが2007年に発表したモデル使用(Tsuda et al., 2010)

1匹ずつケージ収容、1日食餌(投与)量は20g(75.44kcal)、水は自由摂取とした。

control群、実験群それぞれの飼料投与・環境馴化4週間の後、創作製した。

(2)方法;研究者らグループが開発した装置と方法で褥瘡作製(図1)(Sugama, 2005)。

創作製方法:

ラットに麻酔後、右側腹部を剃毛。

電気メスで腹腔腔に達する2cmの切開創を5cm離して2ヶ所作製。

幅2cmの金属板を一方の切開創から腹膜下に挿入し、もう一方の切開創から出した状態でラットを実験装置に固定、8kg、6時間で加圧し褥瘡(圧迫虚血創)作製。(図2)

装置を除去し、2ヶ所の切開創を縫合。加圧創傷部と縫合部を覆うようにハイドロコロイドドレッシング材を貼付し管理した。

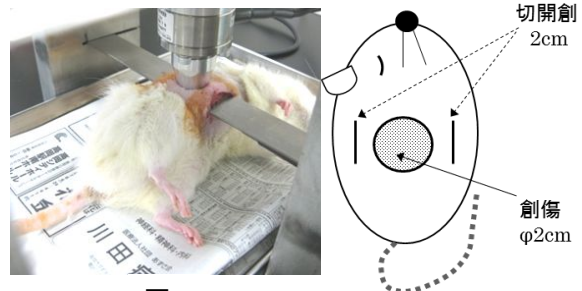


図1

図2

創観察方法:創作製日より毎日、デジタルカメラで撮影と同時に透明ポリプロピレンシートで創縁をトレースし、画像解析ソフトで数量化した。

低栄養状態の把握:

体重測定:創作製前は週1回、作製後は毎日行った。

血液採取:2群の飼料開始時および創作製

前日の2回、1ml採取する。検査項目は、血清総蛋白量と血清アルブミン量とした。

組織採取方法：創作製（加圧終了・解除）直後、30分後、以降炎症期として経過する24、48、72時間に採取した。Pentobarbital Sodium 注射液を致死量腹腔内投与で安楽死させた後に行った。

組織観察方法：HE染色、ネクロシス所見を示すHMGB1免疫組織化学染色、およびアポトーシス所見を示すCC3a免疫組織化学染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

(3)倫理的配慮：金沢大学動物実験委員会の承認（AP-101730）を得たうえで、同指針に則って実験を行った。研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省、2006）を遵守した。特に、加圧実験中および毎日の観察、計測、処置時は、麻酔*投与にて苦痛緩和に留意した。

*麻酔は、ジエチルエーテル吸入麻酔後、Pentobarbital Sodium（ソムノペンチル[®]、共立製薬）30～40mg/kgを腹腔内投与とした。

4. 研究成果

(1)無蛋白低栄養モデルの作製：4週間で0%群の体重、血清総蛋白量、血清アルブミン量は、いずれも標準飼料摂取のcontrol群に比べ有意（ $p < 0.01$ ）に減少していた。

(2)正常皮膚の組織学的観察所見（HE）において、0%群、control群で表皮の厚みや皮筋および皮下脂肪層の割合に大差なく、0%群では繊維層の割合が多く、腹筋（骨格筋）の割合が著しく減少していた。

(3)創作製（加圧終了・解除）直後の時点では、圧迫部および周囲の皮膚組織において、組織学的観察所見（免疫組織化学染色CC3a）では、アポトーシスを示す所見はみられなかったが、

組織学的観察所見（免疫組織化学染色HMGB1）では、圧迫部と非圧迫部の「移行部（境界）」において、0%群で一部活性化されたHMGB1が細胞質に移行、細胞外へ分泌する「壊死（ネクロシス）への移行」を示す所見がみられた。（図3,4-a,4-b）

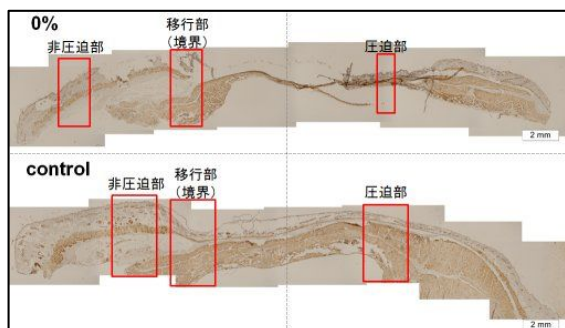


図 3

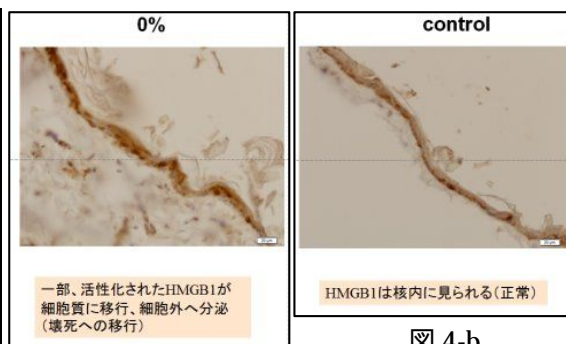


図 4-a

(4)創作製（加圧終了解除）30分後の資料について、a.圧迫部：P、b.境界部P側：Ep、c.境界部N側：En、d.正常部：Nの4箇所を細分化して組織学的観察したところ、

免疫組織化学染色CC3aでは、どの部位においてもアポトーシスを示す顕著な所見はみられなかったが、

免疫組織化学染色HMGB1では、b.境界部P側：Ep（97.7%）>a.圧迫部：P（96.9%）>c.境界部N側：En（81.5%）>d.正常部：N（0%）のように、部位によるダメージの違い（勾配）がみられた。これと同様の結果は、24時間後までみられたが、48～72時間後の資料では明確に認められなかった。

(5)本研究での新しい知見：

無蛋白低栄養モデル（0%群）の皮膚の構造は、control群と表皮の厚みや皮筋および皮下脂肪層の割合に大差なかったが、ヒトの真皮層に相当する繊維層の割合は寧ろ多く、腹筋（骨格筋）の割合が著しく減少していた。骨格筋の減少は想定していたが、低栄養状態では荷重により深部での組織ダメージが大きくなることが示唆された。

圧迫部（P）と非圧迫部（正常部N）、さらにその境界部（E）を圧迫側（Ep）と非圧迫側（En）に分けて観察した結果、圧迫側境界部（Ep）が最もダメージを受けていたことから、圧迫解除後に褥瘡が治癒していく場合と周囲へ拡大していく場合の因果関係につながる所見を得られる可能性があると考えられる。

(6)今後の課題：

初年度の、創作製（加圧終了解除）直後の結果と、加圧30分後～24時間後の結果については大きく変わらなかったが、非圧迫部をさらに細分化した観察により、圧迫部位に近い境界部に最も大きな侵襲が加わっていることが示唆された。今後さらに48～72時間後CC3a染色の経時的な変化と肉眼的治癒過程の所見とを照合して、加圧終了解除後の治癒過程が説明可能な病態モデルであるか、について検討したい。

<引用文献>

Braden BJ, Bergstrom N: A conceptual schema for the study of the etiology of pressure sores. Rehab Nurs 12(1):8-12,

1987.

Iizaka S, Okuwa M, Sugama J, Sanada H.: The impact of malnutrition and nutrition-related factors on the development and severity of pressure ulcers in older patients receiving home care. Clin Nutr. 29(1): 47-53, 2010.

Izawa S, Kuzuya M, Okada K, et al : The nutritional status of frail elderly with care needs according to the mini-nutritional assessment. Clin Nutr. 25(6): 962-967, 2006.

Langer G, Knerr A, Kuss O, Behrens J, Schlomer GJ: Nutritional interventions for preventing and treating pressure ulcers. Cochrane Database Syst Rev Issue 3:CD003216, 2009.

Sugama J, Sanada H, Nakatani T, Nagakawa T, Inagaki M.: Pressure-Induced Ischemic Wound Healing with Bacterial Inoculation in the Rat. WOUNDS, 17(7): 157-168, 2005.

Takeda T, Koyama T, Izawa Y, et al : Effects of malnutrition on development of experimental pressure sores. J Dermatol, 19 : 602-609, 1992.

武田利明, 石田陽子: 栄養不良ウサギを用いた褥瘡の実験的研究 - 圧迫による皮膚虚血状態と褥瘡発生について - . 日本褥瘡学会誌, 2(1):51-56, 2000 .

Tsuda K, Nakatani T, Sugama J, Okuwa M, Sanada H.: Influence of the timing of switching a protein-free to a protein-containing diet on the wound healing process in a rat all-layer skin defect. Int Wound J. 7(3):135-46, 2010.

Wound Ostomy and Continence Nurses Society. Guideline for Prevention and Management of Pressure Ulcers, WOCN Society, Glenview, IL. 2003;52.

5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕未発表

〔学会発表〕未発表

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北山 幸枝 (KITAYAMA, Yukie)
石川県立看護大学・看護学部・准教授
研究者番号 : 2 0 4 1 9 7 4 0

(2)研究分担者

須釜 淳子 (SUGAMA, Junko)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号 : 0 0 2 0 3 3 0 7

中谷 壽男 (NAKATANI, Toshio)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号 : 6 0 1 9 8 1 2 4