

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293430

研究課題名(和文) 看護ケアに繋がるリンパ浮腫と創傷，蜂蜜と熱傷，エストロゲンと創傷の動物での研究

研究課題名(英文) Study on the lymphatic edema and wound, honey and burn, estrogen and wound for the nursing care by using animal

研究代表者

中谷 壽男 (Nakatani, Toshio)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：60198124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：1. 単径リンパ節を切除してマウスの後肢に浮腫を作製し，浮腫部位に皮膚創傷を作製した．浮腫が継続しなかったために，創傷の治癒にリンパ浮腫が影響するかは不明であった．2. 蜂蜜のマウスのIII度熱傷治癒への効果はほとんど見られなかった．3. 女性ホルモンのエストロゲンは高齢，栄養不良のマウス皮膚創傷治癒への効果がみられた．4. アルゴンガスに高電圧をかけて発生させるプラズマはマウス皮膚創傷治癒を早める可能性があることが判明した．

研究成果の概要(英文)：A mouse model of lymphedema after inguinal lymphadenectomy with a skin wound at the same site was created to examine the influences of the condition. Honey, and estrogen as a female hormone on wound healing were examined. The following findings were obtained: the influence of lymphedema on the wound healing remained unclear, as lymphedema did not persist; the effect of honey on the third-degree burn was poor; estrogen positively affected wound healing in elderly and malnourished mice; and a plasma jet generated by applying a high voltage to argon gas was also suggested to promote wound healing.

研究分野：皮膚創傷治癒

キーワード：皮膚創傷 看護ケア リンパ浮腫 蜂蜜 火傷 エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

(1)リンパ浮腫と創傷

近年、癌治療後の四肢のリンパ浮腫が大きな問題となっている。破壊されたリンパ管の再生は困難である。そのため、ケアはリンパ浮腫の軽減が主になっている。リンパ浮腫部位の合併症(リンパ小疱、リンパ漏、蜂窩織炎など)は重要な問題である。中谷らは、ここ10数年創傷を研究してきたこと、また、中谷がリンパ管の研究を行ってきたことを踏まえて、このリンパ浮腫の問題に取り組むことにした。特に、リンパ浮腫部位にできた創傷は、どのような治癒過程をたどるか、その治癒にはリンパ浮腫の軽減(手動的リンパドレナージや弾性包帯の使用)が重要かどうかを検討する必要がある。

(2)蜂蜜と熱傷

熱傷は深度(表皮までのI度、真皮までのII度、皮下組織におよぶIII度)と広がり(中心部の壊死層、周囲の血流うっ滞層、その周囲の血流増加層)の点を考慮に入れて治療をしている。諸外国では看護ケアとして蜂蜜塗布を行っている。蜂蜜は皮膚創傷や熱傷に効果があると報告されているが、急性期の熱傷に対する効果は明らかではない。蜂蜜を熱傷に塗布することで、壊死周囲の血流うっ滞層の虚血性壊死を防止できるか検討する必要がある。

(3)エストロゲンと創傷

エストロゲンは皮膚創傷治癒を促進させると言われている。しかし、年齢との関係はまだ不明な点があり、我々は、8週齢の若い雌マウス、20週齢と36週齢といった中齢と高齢の卵摘雌マウスを使用し、エストロゲンの皮膚塗布による皮膚創傷治癒効果を検討している。さらには、高齢社会を鑑みると、老齢(マウスで60週齢)のマウスへのエストロゲンの創傷治癒効果を検討したり、老齢では低栄養状態になることが問題なので、低栄養状態でのエストロゲンの創傷治癒効果を検討する必要がある。

(4)追加の研究、常温プラズマと創傷

プラズマは個体、液体、気体でない第4の状態であり、電子と陽子が分離した状態である。例えば希ガスのアルゴン(Ar)、ヘリウム(He)に高電圧をかけると電子が希ガスより離れて空間を自由に動くようになり、これがプラズマといわれるものである。プラズマは空気と接触してNO(一酸化窒素)や $\cdot\text{OH}$ (ヒドロキシラジカル)を生成し、液体と接触して $\cdot\text{OH}$ や H_2O_2 を産生する。このような産生物が細胞の活性化をもたらすと言われている。一方、皮膚創傷の治癒過程では、表皮の新生、血管新生や線維芽細胞によるコラーゲンの産生により肉芽組織が形成され創の欠損を埋め、さらに筋線維芽細胞により創傷は収縮して、癒痕治癒していく。この表皮や線維芽細胞の増殖、筋線維芽細胞の増殖は、NOやROS(活性酸素)によって刺激されて起きると言われている。すなわち、プラズマを創傷に照射することで治癒が促進される可能性があるので検証する必要がある。

2. 研究の目的

(1)リンパ浮腫と創傷:リンパ浮腫のマウスモデルを作製し、リンパ浮腫の皮膚が創傷を負った場合の創傷治癒過程を研究し、リンパ浮腫軽減により、創傷治癒が促進し奇麗に治癒するかを検討。

(2)蜂蜜と熱傷:蜂蜜塗布が高温熱傷受傷後の壊死拡大の防止に効果があるかとその機序の解明を行う。

(3)エストロゲンと創傷:エストロゲンの年齢、または低栄養による皮膚創傷治癒に効果があるかとその機序の解明を行う。

(4)追加の研究、常温プラズマと創傷:アルゴンガスで発生させた常温プラズマの創傷治癒効果の検討を行う。

3. 研究の方法

(1)リンパ浮腫と創傷:①下肢にリンパ浮腫を作製するために、下肢にパテントブルーやインドシアニングリーン(ICG)を皮下投与して、単径リンパ節、腹胸壁リンパ管、腋窩リンパ節を描出させる。単径リンパ節を郭清し、下肢にリンパ浮腫が出現するかを観察する。下肢の皮下にICGを投与し、腹胸壁リンパ管が描出されるかを観察する。リンパ浮腫が出現した下肢に皮膚全層欠損創を作製し、治癒過程を観察する。組織学的観察を行う。②リンパ浮腫のマウスモデルが作製されたら、それを用いて、浮腫におけるリンパの流れる通路を解明、より効果的な手動的ドレナージの方法を検討する。

(2)蜂蜜と熱傷:マウスの背部の皮膚に、沸騰したお湯につけた分銅(直径1.2cm、重さ10g)を20秒間当てて、III度の熱傷を作製した。処置なし、スルファジアジン銀クリーム塗布、マスカ蜂蜜塗布、あかしあ蜂蜜塗布の処置、創部の観察と創部の組織採取を炎症期の4日間行った。熱傷創はJacksonの分類(図)に基づき、創中心部を熱によって直接凝固壊死し、開存血管のみられないZone of coagulation、創中間部を血流うっ滞により、受傷後数日で壊死に陥るZone of stasis、創周辺部を熱刺激によって炎症反応が起き、血流増加のみられるZone of hyperemiaに分けた。

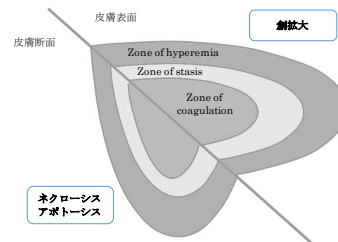
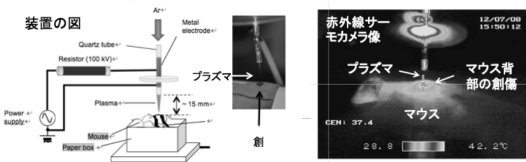


図: Jacksonによる熱傷創受傷後の組織の状態

(3)エストロゲンと創傷:①8週齢、20週齢、36週齢の雌マウスの卵巣を摘出後一ヶ月、すなわち12週齢、24週齢、40週齢で背部に皮膚全層欠損創を作製する。創より離れた部位の皮膚にエストラジオールゲルを0.01g/日塗布し、創傷治癒過程の観察を組織採取して組織学的、血清

の生化学的検討を行った。②8週齢の雌マウスを卵巣摘出後3週目より低タンパク栄養(3%タンパク質)で3週間飼育後の14週齢で、背部に①と同じように創を作製し、エストラジオールを塗布して、創傷治癒過程の観察と組織学的、血清の生化学的検討を行った。

(4) 常温プラズマと創傷: ①アルゴンの流れ(5s1m)に高電圧(25kV)をかけて発生させた常温プラズマをマウスの皮膚の全層欠損創(直径2mm)に照射して(距離15mm, 1分間, その後ハイドロコロイド被覆材で創を覆う, 毎日繰り返し替える), コントロール群(プラズマの照射無し)と比較する。②①の時に, 常温プラズマ発生させるためにアルゴンガスを使用しているので, そのアルゴンの流れが創を乾燥させる可能性が否定できなかったため, 創表面を蒸留水(40 μ L)で覆い創の乾燥を防止し, そこに常温プラズマを当てて, 創傷治癒過程をコントロール群(プラズマ照射無し)と比較した。



4. 研究成果

(1) リンパ浮腫と創傷

①科研費で購入した IMI 赤外観察システムを使用して, マウスの皮下に注入したインドシアニングリーン (ICG) がリンパ管に吸収され, 描写される単径リンパ節や腹壁・胸壁リンパ管や腋窩リンパ節を観察できた (図1)。②単径リンパ節を郭清すると, 郭清後3~4日までは, 腹壁リンパ管は出現せずに, 下肢に浮腫が観察された (図2) が, その後は腹壁リンパ管は出現し (図3), 下肢の浮腫が消失することが判明した。理由として, 下肢に注入した ICG はリンパ節郭清部位に貯留後に, または, 皮下に拡散して腹壁リンパ管に吸収されることが考えられた。③下肢の浮腫部位に作製した皮膚全層欠損創の治癒は, 浮腫の無い対側の創傷の治癒と差は無かった。これは上記の②に記載したリンパ流が再開して, 下肢の浮腫が軽減したためと考えられる。④今回の実験では, 下肢のリンパ浮腫作製が困難であることと, 創傷治癒にリンパ浮腫(リンパ節郭清やリンパ管遮断)が影響するかどうかが不明であった。リンパ浮腫モデルの作製ができなかったため, 効果的な用手的ドレナージの検討はできなかった。現在もリンパ浮腫モデルの作製の検討, リンパ管の再生, 浮腫部位の線維化の機序を研究している。論文執筆中。

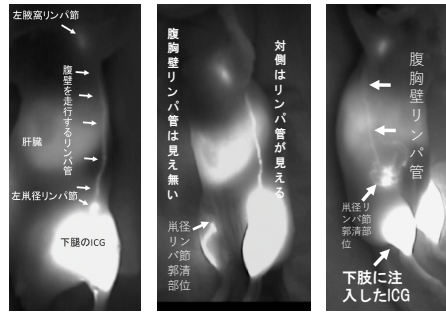


図1: ICGでリンパ節リンパ管描写
図2: 単径リンパ節郭清後は腹胸壁リンパ管は描写されない
図3: リンパ管が再度抽出された

(2) 蜂蜜と熱傷

III度熱傷創への蜂蜜塗布は, 対照群と比較して, 細胞のネクローシスとアポトーシスや創傷面積拡大部(図)には有意差が見られず, 蜂蜜は細胞のネクローシスとアポトーシスの抑制に効果はなく, 創拡大を妨げることはできないと考えられた。ヒトと動物の熱傷を比較すると, Zone of stasis ではヒトの皮膚は赤色から白色へ変化するのに対し, 動物は白色へ急激に変化し, 表皮は喪失すること, Zone of hyperemia ではヒトは表皮の喪失と開存血管がみられるが, 動物では表皮は残存した状態で開存血管が見られるという点が異なった。Zone of hyperemia の真皮構造は正常とされているが, 全てのパラメーターで正常皮膚よりもネクローシス細胞の割合が高く, 正常部位でも同様であった。よって, 熱傷創の Zone of hyperemia やその周囲では, 肉眼的には正常であっても, 組織学的には細胞のネクローシスにより, 組織学的には創拡大が起きていると考えられた。ヒトと動物を用いた実験での各ゾーンの特徴は異なる(表)ため, 動物実験での結果を臨床に適用する際には熱傷創形成状況を考慮する必要がある。論文として発表。

表: Jackson分類との比較

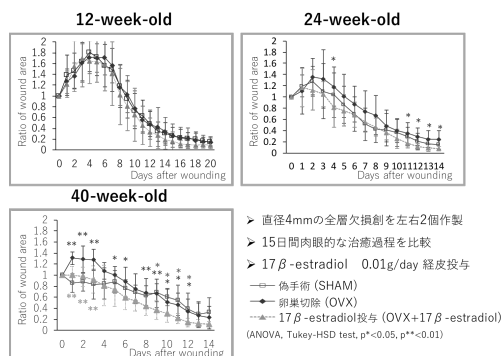
熱傷の種類 (分類)	Zone of coagulation	Zone of stasis	Zone of hyperemia
Jackson®	肉眼的に白色 創面が乾かし 創縁は褐色	肉眼的に赤色から 白色へ急激に 3~7日までに表皮 喪失, 壊死	肉眼的に4~7日ま でに赤くなる 7日までに創面 基底層, 真皮正 常, 創縁血管
本論文 (熱傷色)	肉眼的に白色 創面が乾かし 創縁は褐色や壊死	肉眼的に白色 2~3日目に表皮喪 失し, エストジオール 塗布の有無で創面 の形成が異なる う, 創縁形成	2~3日目に赤色へ 変化 創縁血管, 真皮正 常, 創縁血管
本論文 (熱傷色) 注: 創縁部は 褐色色, 創縁部 は白色	注: エストジオールで 注した100%	創縁部: 94.0% 創面: 94.4% 創縁部: 94.4% 創面: 94.4%	創縁部: 94.7% 創面: 94.3% 創縁部: 94.3% 創面: 94.3%
本論文 (熱傷色) 注: 創縁部は 褐色色, 創縁部 は白色	創縁部: 50.2% 創面: 47.0% 創縁部: 42.2% 創面: 54.8% 創縁部: 57.2%	創縁部: 94.0% 創面: 94.4% 創縁部: 94.4% 創面: 94.4%	創縁部: 94.7% 創面: 94.3% 創縁部: 94.3% 創面: 94.3%

創縁部は熱した分だけ大きくなる, 実際は褐色色, ・は創
拡大部を示す

(3) エストロゲンと創傷

①卵巣非摘出群と卵巣摘出+エストラジオール群では, 12週齢, 24週齢で作製した創傷の治癒過程にはほとんど差が見られなかったが, 40週齢では有意な差が見られ, 年齢による創傷治癒過程の衰えを, 外用のエストラジオールによって復活させられる可能性が見られた。卵巣摘出群と卵巣摘出+エストラジオール群の創傷面積は, 24週齢, 40週齢で作製した創傷の治癒はエストラジオールの塗布群で有意に治癒が早く, さらに, 年齢が高いほど, エストラジオールの効果が顕著に見られ, 創傷治癒は促進していた。一方, 12週齢ではエストラジオールの明確な創傷治癒

促進効果は見られなかった。すなわち、高齢になるほど、内因性のエストラジオールの創傷治癒への効果は低下するので、高齢では創傷治癒のためにエストラジオールを塗布することは意義があることがしめされた。しかし、さらに高齢の場合や卵巣摘出後の時期によるエストラジオールの効果の検討の必要がある。論文として発表。



②栄養不良群(偽手術群, 卵巣摘出群, 卵巣摘出+エストラジオール群)は対照群(普通食群)と比較して, 創傷治癒は炎症期, 肉芽形成期で著名に遅延していた。これは炎症性反応延長, 血管新生低下, コラーゲン合成低下, 創収縮が遅延することによることが判明した。一方, 栄養不良群の間では, 創傷治癒には大きな差が見られなかったが, 卵巣摘出+エストラジオール群では, 肉芽形成期の末期から急激に創収縮が見られた。これは, エストラジオールの投与で, 炎症性 M2 型マクロファージの発現を増加させることによって創収縮促進に作用することであることを示すことができた。すなわち, 栄養不良の状態であっても, 外用のエストラジオールによって, 蛋白質栄養不良の皮膚創傷治癒への影響を最小限に抑えられることが示された。より高齢の栄養不良マウスの創傷治癒へのエストラジオールの影響を検討する必要がある。論文として発表。

(4) 常温プラズマと創傷

①プラズマで創を処置すると, ハイドロコロイド被覆材以上に創傷治癒を促進することが示された。それは表皮の新生促進, 筋線維芽細胞の肉芽形成期(創作製後 7 日)での増加, 好中球やマクロファージといった炎症細胞の数の抑制によってもたらされていることが示された。論文として発表。

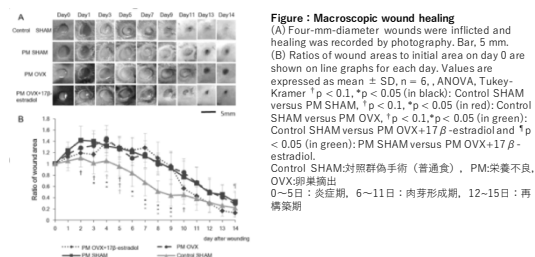
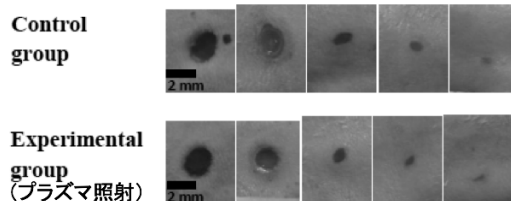
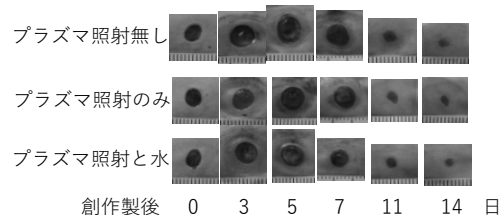


Figure 2: Macrophscopic wound healing
(A) Four-mm-diameter wounds were inflicted and healing was recorded by photography. Bar, 5 mm.
(B) Ratios of wound areas to initial area on day 0 are shown on line graphs for each day. Values are expressed as mean \pm SD, n = 5, ANOVA, Tukey-Kramer. *p < 0.1, **p < 0.05 (in black); Control SHAM versus PM SHAM, *p < 0.1, **p < 0.05 (in red); Control SHAM versus PM OVX, *p < 0.1, **p < 0.05 (in green); Control SHAM versus PM OVX+17 β -estradiol and *p < 0.05 (in green); PM SHAM versus PM OVX+17 β -estradiol. Control SHAM: 対照群偽手術 (普通食), PM: 栄養不良, OVX: 卵巣摘出 0~5日: 炎症期, 6~11日: 肉芽形成期, 12~15日: 再構築期

照射後の日, 15日目で創は癒痕化
プラズマ照射のほうが創が小さい, 治癒促進
Day 0 Day 3 Day 7 Day 11 Day 15



②創傷面に蒸留水を滴下して, 創を湿潤環境に保ち, プラズマを創傷に照射すると, プラズマのみやハイドロコロイド被覆材のみの場合よりも, 創傷の縮小が進んだ。これは肉芽形成期の筋線維芽細胞の増加によることが示された。論文として発表。



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 31 件)

①Kanae Mukai, Emi Komatsu, Yukari Nakajima, Tamae Urai, Naoko Murakado, Toshio Nakatani (13/13), Evaluation of the effects of a combination of Japanese honey and hydrocolloid dressing on cutaneous wound healing in male mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2015, Article ID 910605, 9 pages, 2015. doi:10.1155/2015/910605 (査読有)

②Nasruddin, Yukari Nakajima, Kanae Mukai, Emi Komatsu, Junko Sugama (10/10), Toshio Nakatani (11/11), A simple technique to improve contractile effect of cold plasma jet on acute wound of mouse by dropping water. Plasma Processes and Polymers, Plasma Processes and Polymers, 12, 1128–1138, 2015, DOI: 10.1002/ppap.201400236 (査読有)

③Kanae Mukai, Emi Komatsu, Yukari Nakajima, Tamae Urai, Nasruddin, Junko Sugama, Toshio Nakatani, The effect of 17 β -estradiol on cutaneous wound healing in protein-malnourished ovariectomized female mouse model. PLoS ONE 9(12): e115564. doi:10.1371/journal.pone.0115564, 2014 (査読有)

④Kanae Mukai, Yukari Nakajima, Tamae Urai, Emi Komatsu, Nasruddin, Junko Sugama, Toshio Nakatani, 17 β -estradiol administration promotes delayed cutaneous wound healing in 40-week ovariectomized female mice. International Wound

Journal, doi: 10.1111/iwj.12336, 2014 (査読有)

⑤Kanae Mukai, Yuriko Miyasaka, Kana Takata, Tamae Urai, Yukari Nakajima, Emi Komatsu, Junko Sugama, Toshio Nakatani, Comparison of the cutaneous wound healing of ovariectomized mouse at 12 weeks with that of SHAM and estrogen-administered mice. *Journal of Hormones*, vol. 2014, Article ID 484258, 6 pages, 2014. doi:10.1155/2014/484258 (査読有)

⑥Nasruddin, Yukari Nakajima, Kanae Mukai, Junko Sugama (9/10), Toshio Nakatani (10/10), Cold plasma on full-thickness cutaneous wound accelerates healing through promoting inflammation, re-epithelialization and wound contraction. *Clinical Plasma Medicine* 2, 28-35, 2014, DOI: 10.1016/j.cpme.2014.01.001 (査読有)

⑦Kanae Mukai, Yukari Nakajima, Tamae Urai, Junko Sugama (8/9), Toshio Nakatani (9/9), The effect of 17 β -estradiol administration on cutaneous wound healing in 24-week ovariectomized female mice. *Journal of Hormones*, vol. 2014, Article ID 234632, 8 pages, 2014. doi:10.1155/2014/234632 (査読有)

⑧Yukari Nakajima, Kanae Mukai, Junko Sugama, Toshio Nakatani, Evaluation of the effects of honey on acute-phase deep burn wounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 784959, 20 pages, 2013. doi:10.1155/2013/784959 (査読有)

⑨Is estrogen effective for full-thickness cutaneous wound healing in young male mice? Yukari Nakajima, Mayumi Okuwa (15/16), Toshio Nakatani (16/16), *Wounds*, 25(10), 278-286, 2013

<http://www.woundsresearch.com/article/estrogen-effective-full-thickness-cutaneous-wound-healing-young-male-mice> (査読有)

⑩ Yukari Nakajima, Mayumi Okuwa (17/18), Toshio Nakatani (18/18), Effects of three types of Japanese honey on full-thickness wound in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)* Vol. 2013, Article ID 504537, 11 pages, 2013. doi:10.1155/2013/504537 (査読有)

[学会発表] (計 26 件)

①向井加奈恵, 他5名, Estradiol Benzoateの創部塗布による皮膚創傷治癒への効果—肉眼的検討—. 第45回日本創傷治癒学会 JRタワーホール&カンファレンス(東京都千代田区), 2015年12月1日

②中谷壽男, 他5名, 単径リンパ節を郭清した下腿に作製した創傷は治癒が遅延するか. 第45回日本創傷治癒学会 JRタワーホール&カンファレンス(東京都千代田区), 2015年12月1日

③Tamae Urai, 6 et al., Influence of obesity on cutaneous wound healing in an obese mouse model fed a high-fat diet. 18th East Asian

Forum Of Nursing Scholars (EAFONS), NTUH International Convention Center (Taipei, Taiwan) February 6, 2015.

④向井加奈恵, 他4名, マウスの皮膚全層欠損創への日本産蜂蜜とハイドロコロイド被覆材併用による効果の検証. 第16回日本褥瘡学会学術集会, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2014年8月29日

⑤Nasruddin, 10 et al., Visually non contact argon plasma jet on microliter water dropped wound accelerates wound healing. 5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM5), Nara Prefectural New Public Hall (Nara, Japan) 20 May 2014, (poster presentation)

⑥Nasruddin, 10 et al., Improving the Healing Effect of Cold Plasma Treatment on Wound using Water Adding. 8th International Conference on Reactive Plasmas/ 31st Symposium on Plasma Processing, Fukuoka International Congress Center, (Hakata, Japan), 5 February 2014 (oral presentation)

⑦中島由加里, 他5名, 急性期三度熱傷創における蜂蜜の抗炎症作用の効果 第43回日本創傷治癒学会 別府湾ロイヤルホテル(大分県速見郡)2013年11月14日

⑧Emi Komatsu, 13 et al., Study of the effects of combining Japanese honey and a hydrocolloid dressing on skin wound healing. XXIII International Symposium on Morphological Sciences, Toki Messe Niigata Convention center (Niigata, Japan) September 10-13, 2013 (poster presentation)

⑨Kanae Mukai, 4 et al., 17 β -estradiol promotes cutaneous wound healing in 24-week ovariectomized female mice by modulating wound inflammation and promoting wound contraction. XXIII International Symposium on Morphological Sciences, Toki Messe Niigata Convention center (Niigata, Japan) September 10-13, 2013

[その他]

ホームページ等

<http://mhs3.mp.kanazawa-u.ac.jp>

<http://wmn.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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: 00203307

(H25~H26: 研究分担者)

大桑 麻由美 (OKUWA, Mayumi)

金沢大学・保健学系・教授
研究者番号： 30303291
(H25～H26:研究分担者)

西澤 知江(NISHIZAWA, Tomoe)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号： 50579597
(H25～H26:研究分担者)

臺 美佐子(DAI, Misako)
金沢大学・保健学系・助教
研究者番号： 50614864
(H25～H26:研究分担者)