



Title	マウス熱傷モデルにおける羊膜由来間葉系幹細胞由来物質のBurn wound conversion抑制効果に関する研究
Author(s)	松田, 識郁
Description	配架番号 : 3002
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16909号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16909
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99754
Type	doctoral thesis
File Information	MATSUDA_Norifumi.pdf, 全文



学 位 論 文

マウス熱傷モデルにおける 羊膜由来間葉系幹細胞由来物質の Burn wound conversion 抑制効果 に関する研究

(Studies on the inhibitory effects of amnion-derived
mesenchymal stem cell secretome on burn wound
conversion in a mouse burn model)

2026 年 3 月

北 海 道 大 学

松 田 識 郁

学 位 論 文

マウス熱傷モデルにおける 羊膜由来間葉系幹細胞由来物質の Burn wound conversion 抑制効果 に関する研究

(Studies on the inhibitory effects of amnion-derived
mesenchymal stem cell secretome on burn wound
conversion in a mouse burn model)

2026 年 3 月

北 海 道 大 学

松 田 識 郁

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
第一章 Burn wound conversion を模した新しいマウス熱傷モデルの 検討	
緒言	8 頁
動物実験計画	9 頁
予備実験	10 頁
本実験	
方法	12 頁
結果	26 頁
考察	34 頁
第二章 Burn wound conversion を模したマウス熱傷モデルにおける 羊膜由来間葉系幹細胞由来物質の影響の検討	
緒言	37 頁
動物実験計画	38 頁
予備実験	39 頁
本実験	
方法	45 頁
結果	48 頁
考察	51 頁
結論	53 頁
謝辞	55 頁
利益相反	56 頁
引用文献	57 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Norifumi Matsuda, Chigusa Sato, Kosuke Ishikawa, Yuhei Yamamoto, Kanako Fuyama.
Shunsuke Ohnishi, Takahiro Miura, Emi Funayama, Taku Maeda

A novel mouse model for studies of burn wound conversion using a top hat-shaped brass template.

Burns. 51(2), 107348 (2025).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 松田識郁, 佐藤千草, 三浦隆洋, 石川耕資, 前田拓, 舟山恵美, 山本有平
Burn wound conversion 研究のための新しいマウス熱傷モデル
第33回日本形成外科学会基礎学術集会, 2024年10月17日・東京

要旨

【背景と目的】

広範囲熱傷は依然として致死率が高く、その生命予後を規定する最大の因子は熱傷面積である。熱傷創は中心部の壊死領域（Zone of coagulation）、最外層の充血領域（Zone of hyperemia）、およびその中間に位置するうっ血領域（Zone of stasis）の3つに分類される。このうち、Zone of stasis は不安定な領域であり、経時的に壊死へと進行する場合もあれば、救済される場合もある。この Zone of stasis が壊死へと進行する現象は「Burn wound conversion」と呼ばれ、これを抑制することで熱傷面積の拡大を防ぎ、生命予後の改善が期待されている。

羊膜由来間葉系幹細胞（Amnion-derived mesenchymal stem cell; AMSC）は分化・増殖能に優れており、パラクライン作用を介して、血管新生や免疫調節、抗炎症、抗線維化作用などをもたらす。近年、間葉系幹細胞が Burn wound conversion を抑制し得る可能性が報告されているが、AMSC 由来物質による効果は十分に検討されていない。

従来、Burn wound conversion の研究には主にラットを用いた Comb モデルが利用されてきたが、実験試薬や遺伝子改変モデルが豊富であるマウスを用いた研究は、より多面的な病態理解に寄与することが期待される。そこで、本研究では、マウスを用いた新規の熱傷モデルを作製した。さらに、そのマウス熱傷モデルを用いて AMSC 由来物質が Burn wound conversion に及ぼす影響を検証した。

【材料と方法】

第一章において、真鍮製のテンプレートを作製し、2つの凸面部および、それらの間に間隙を設けた。凸面部は皮膚と接触して熱傷（Zone of coagulation）を生じさせ、非接触領域である間隙部は Zone of stasis を形成する構造とした。

8週齢の ICR 雄性マウス 75 匹を用い、接触時間に応じて 5 秒群（5s 群）、15 秒群（15s 群）、25 秒群（25s 群）の 3 群に分けた。テンプレートを沸騰した熱水で加熱し、マウスの側腹部左右に 5 秒、15 秒、25 秒間接触させた。熱傷創作成 96 時間後に創部を撮影し、画像解析ソフトウェア ImageJ で壊死領域および生存領域の面積を計測した。間隙部（Zone of stasis）の 50 % から 75 % が壊死した状態を Burn wound conversion を模倣するマウス熱傷モデルと定義した。生存面積割合は以下の式により算出した：

生存面積割合 (%) = (間隙部の生存面積 ÷ 2 つの凸面に囲まれた全体面積)
× 100

間隙部の 50 % から 75 % が壊死している状態は、生存面積割合が 7 % から 14 % に相当した。

さらに、熱傷創作成 1, 12, 24, 48, 96 時間後に間隙部から組織を採取し、組織学的評価を行った。

第二章において、第一章と同様の方法で、38 匹のマウス熱傷モデルを作製し、CM5-ip ($n=15$)、Sham-ip 群 ($n=12$)、Control 群 ($n=11$) の 3 群に無作為に分けた。侵襲を与えず同じ環境で飼育したマウスを正常群 ($n=2$) とした。熱傷創作成直後に、CM5-ip 群では AMSC 由来物質 1mL を腹腔内に投与し、Sham-ip 群では α -MEM 1mL を腹腔内に投与した。熱傷創作成 48 時間後に、Malondialdehyde (MDA) assay のために、20 匹のマウスを安楽死させた。熱傷創作成 96 時間後に創部を撮影し、ImageJ で生存面積割合を解析した。その後、RNA 単離用に残ったすべてのマウスを安楽死させた。

2 群間は Student の t 検定、3 群以上は一元配置分散分析後に多重比較検定 (Tukey-Kramer 法) を行った。結果は平均±標準誤差で表し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

第一章において、テンプレートの凸面部と接触した皮膚では、III 度熱傷が生じていた。一方、間隙部の非接触領域では、Burn wound conversion により経時的に壊死が進行する部位が認められた。

熱傷創作成 96 時間後の生存面積割合は、5s 群で $20.1 \% \pm 0.6 \%$ 、15s 群で $9.6 \% \pm 0.6 \%$ 、25s 群で $3.7 \% \pm 0.8 \%$ であり、全群間で有意差が認められた。

5s 群では壊死がほとんど認められず、25s 群では大部分が壊死していたため、いずれも動物モデルとして不適切と判断された。これに対し、15s 群では Burn wound conversion が適度に生じており、壊死組織と生存組織が混在していたことから、Burn wound conversion を模倣する動物モデルとして最適であると考えられた。

Burn wound conversion がほとんど生じなかった 5s 群と間隙の中央で生じていた 15s 群を用いた組織学的検討では、熱傷創作成 12 時間後の時点で皮膚付属器および皮下筋層の組織変性に関して、両群間で有意差が認められた。

第二章において、熱傷創作成 96 時間後の生存面積割合は、CM5-ip 群で 17.5 %

$\pm 0.8 \%$, Sham-ip 群で $8.5 \pm 1.0 \%$, Control 群で $9.9 \pm 0.6 \%$ であり, CM5-ip 群と Sham-ip 群の間および CM5-ip 群と Control 群の間に有意差が認められた。

熱傷創作成 48 時間後に行った MDA assay において, MDA 濃度は CM5-ip 群で $7.0 \pm 2.9 \mu\text{mol/L}$, Sham-ip 群で $7.8 \pm 2.5 \mu\text{mol/L}$, Control 群で $10.0 \pm 2.5 \mu\text{mol/L}$, 正常群で $3.9 \pm 2.9 \mu\text{mol/L}$ であった。2 検体は計測エラーのため解析から除外した。

熱傷創作成 96 時間後のリアルタイム定量 PCR 解析において, 炎症性サイトカイン (*Il1b*, *Il6*, *Il10*) や成長因子 (*Vegfa*), 細胞死制御関連遺伝子 (*Hmgb1*, *Bcl2*) の mRNA 発現は, いずれも Control 群に比べて Sham-ip 群および CM5-ip 群で低下していた。total RNA の抽出は全 38 検体中 4 検体でのみ成功し, うち 1 検体は mRNA の発現が確認できず解析から除外した。

【考察】

第一章において, 本研究で作製したモデルは, マウスを用いて Burn wound conversion を高い再現性で表現可能な熱傷モデルであった。組織学的検討により, Burn wound conversion が生じる過程で, 受傷早期から皮膚付属器および皮下筋層に変性が生じることが明らかとなった。これらの知見は, Burn wound conversion の早期診断や治療介入のための手がかりとなる可能性がある。

第二章において, 第一章で作製したマウス熱傷モデルに対し, AMSC 由来物質を投与することで, Zone of stasis における Burn wound conversion の抑制が確認された。また, MDA assay の結果より, AMSC 由来物質は軽度の抗酸化作用を有する可能性が示唆された。リアルタイム定量 PCR による遺伝子発現解析では, Zone of stasis からの total RNA 検出の際に技術的問題が発生した。組織の変性, 壊死, 線維化や, 炎症反応に伴う RNA 分解酵素の活性化などが, RNA 抽出を困難にした要因と考えられる。

【結論】

第一章において, 沸騰した熱水で加熱したテンプレートをマウスの皮膚に 15 秒間接触させることで, Burn wound conversion の機序や治療法を検討するための, 再現性の高い新規熱傷モデルを作製できた。

第二章において, AMSC 由来物質は Burn wound conversion を抑制する可能性が示唆された。

略語表

本文および図中で使用した略語は以下の通りである。

AMSC	Amnion-derived mesenchymal stem cell
α -MEM	Alpha minimum essential medium
<i>Bcl2</i>	B-cell lymphoma 2
bFGF	Basic fibroblast growth factor
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
EV	Extracellular vesicle
<i>Hmgb1</i>	High mobility group box 1
<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1
<i>Il1b</i>	Interleukin-1 beta
<i>Il6</i>	Interleukin-6
MDA	Malondialdehyde
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MWCO	Molecular weight cut off
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PES	Polyethersulphone resins
RNA	Ribonucleic acid
<i>Vegfa</i>	Vascular endothelial growth factor A

緒言

【背景】

広範囲熱傷の生存率は、過去数十年間で着実に改善してきたものの、依然として致死率の高い外傷である。熱傷の深達度を加味した熱傷面積および患者の年齢が、予後を規定する重要な因子であるとされている (Nakae and Wada, 2002)。

熱傷では、初期損傷により壊死した中心部と、その周囲に位置する組織灌流の低下した虚血領域という特徴的な構造が形成される。Jackson による Zone 分類では、中心の壊死領域を Zone of coagulation, その周囲の虚血領域を Zone of stasis, さらにその外側を Zone of hyperemia と定義している (Jackson, 1953)。Zone of coagulation は初期の損傷によって不可逆的な壊死を生じるため治療介入は困難であり、Zone of hyperemia は自然治癒が見込まれる可逆的な領域である。一方、Zone of stasis は可逆性と不可逆性の中間にある不安定な領域であり、時間の経過とともに壊死が進行する場合もあれば、救済されることもある。この Zone of stasis が変性壊死に移行する現象は、Burn wound conversion と呼ばれている (Singh et al, 2007)。Zone of coagulation は治療による救済が困難であることから、熱傷面積を減らすための初期治療の焦点は、Burn wound conversion のリスクを有する Zone of stasis に置くべきである。Burn wound conversion の予防を目的に、これまでにさまざまな治療法が提案されてきた (Lu et al, 2022)。しかし、Burn wound conversion に関与する細胞・分子機構の多くは未だ十分に解明されておらず、確立された治療法は存在していない。このため、より有効な治療戦略を確立するために、動物モデルを用いた基礎研究が多数行われてきた (Palackic et al, 2022 ; Salibian et al, 2016 ; Wardhana et al, 2020)。

Burn wound conversion の病態生理を解明し、新規治療法を評価するためには、適切な動物モデルの確立が不可欠である。従来はラットを用いた Comb モデルが広く用いられてきた (Regas and Ehrlich, 1992 ; Tobalem et al, 2020)。一方、マウスは飼育コストが低く、実験試薬や遺伝子改変モデルが豊富という利点を有する (Mieczkowski et al, 2022)。遺伝子改変技術を活用することで、Burn wound conversion の分子機構を詳細に解析できることから、マウスモデルの確立は極めて重要である。

一方、再生医療の分野において、間葉系幹細胞を用いた治療法が注目されている。特に羊膜由来間葉系幹細胞 (Amnion-derived mesenchymal stem cell; AMSC) は、採取の安全性や高い増殖性から新しい間葉系幹細胞源として期待されている。

る (Alviano et al, 2007 ; In't Anker et al, 2004)。ラットを用いた研究では間葉系幹細胞が **Burn wound conversion** を抑制する可能性が報告されているが (Abbas et al, 2019 ; Tutak et al, 2022), AMSC 由来物質の効果については検証がなされていない。

【目的】

本研究の目的は, 第一章でマウスを用いた新規熱傷モデルを確立し, 第二章でこのモデルを用いて AMSC 由来物質の治療効果を検証することとした。本研究により, **Burn wound conversion** の病態理解が深まり, 新規治療法開発の基盤が構築されることで, 重症熱傷患者の予後改善に貢献することが期待される。

第一章

Burn wound conversion を模した新しいマウス熱傷モデルの検討

緒言

Burn wound conversion に関する先行研究では、ブタ、ラット、マウスなどの動物に対し、熱水または熱した金属テンプレートを用いて熱傷創を作成し、検討が行われてきた。特に、ラットを用いた Comb モデルは、加熱した櫛状の金属テンプレートをラット背部に接触させることで、Zone of coagulation と Zone of stasis を同時に形成できるモデルとして広く用いられている (Regas and Ehrlich, 1992 ; Tobalem et al, 2020)。Zone of stasis に対して介入し、Burn wound conversion を阻止することで、熱傷領域の拡大を防止することが期待されており、多くの基礎研究がこのモデルを用いて実施されている (Bohr et al, 2013 ; Choi et al, 2018 ; El Ayadi et al, 2021 ; Eski et al, 2012 ; Fang et al, 2017 ; Fourman et al, 2014 ; Inoue et al, 2018 ; Jiang et al, 2023 ; Lee et al, 2023 ; Macri et al, 2013 ; Öksüz et al, 2013 ; Reddy et al, 2015 ; Rosique et al, 2017 ; Shalom et al, 2011 ; Singer et al, 2010 ; Singer et al, 2011 ; Singer et al, 2018 ; Singer et al, 2020 ; Singer et al, 2013 ; Smith et al, 2021 ; Tobalem et al, 2013 ; Tobalem et al, 2012 ; Türkaslan et al, 2010 ; Wang et al, 2021a)。

一方、マウスにおいては、Comb モデルのように Burn wound conversion を高い再現性で評価可能な動物モデルは確立されていない。ラットとマウスでは体格や皮膚の厚さが異なるため、既存の Comb モデルをそのまま縮小するだけでは不十分であり、マウスに適した独自のテンプレート設計と至適条件の検討が必要である。

本章の目的は、Burn wound conversion を再現可能な新規マウス熱傷モデルを確立することである。マウスの体格に適合したテンプレートを設計し、Zone of stasis を意図的に形成できる条件を検討することで、高い再現性を有する動物モデルを作製する。さらに、Zone of stasis における経時的な変化を観察し、Burn wound conversion の進行過程における組織の変化を明らかにすることで、病態生理に関する基礎的知見を得ることを目指す。

動物実験計画

本研究は、「動物の愛護及び管理に関する法律」，「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」，「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」，その他関係法令等に基づき，「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に従って，動物実験計画「皮膚深達性急性創傷に対する羊膜由来幹細胞の創傷治癒促進作用」（承認番号 23-0005）の一研究として行った。

予備実験

実験には C57BL/6N マウス (雄, 7-9 週齢) および ICR マウス (雄, 7-9 週齢) を用いた。三共ラボサービス株式会社 (東京) より購入し, その後 1 週間の順化期間を設けた。飼育環境は温度 24 °C, 相対湿度 60 % から 65 %, 12 時間明暗サイクル下とした。餌水は自由摂取可能とした。実験開始前日には, 2.0 % イソフルラン-酸素混合ガスによる全身麻酔下で, 3MTM サージカルクリッパー (可動ヘッドタイプ) (スリーエム ジャパン株式会社, 東京) および除毛クリームを用いて体幹部の除毛を行った。

真鍮製のテンプレートを巴企画 (群馬) に依頼し, 4 種類作製した。具体的には, テンプレート 1 は 8 × 8 mm の凸面が 4 mm の隙間を空けて 3 つ並んだ形 (図 1A), テンプレート 2 は 11 × 8 mm の凸面が 3 mm の隙間を空けて 3 つ並んだ形 (図 1B), テンプレート 3 は 11 × 8 mm の凸面が 4 mm の隙間を空けて 3 つ並んだ形 (図 1C), テンプレート 4 は 11 × 8 mm の凸面が 4 mm の隙間を空けて 2 つ並んだ形である (図 2A)。すべてのテンプレートはステンレスパイプヒーター SWS1503 (太洋株式会社, 大阪) を用いて, 沸騰した 100 °C の水中に 5 分間浸漬させて加熱後に使用した。

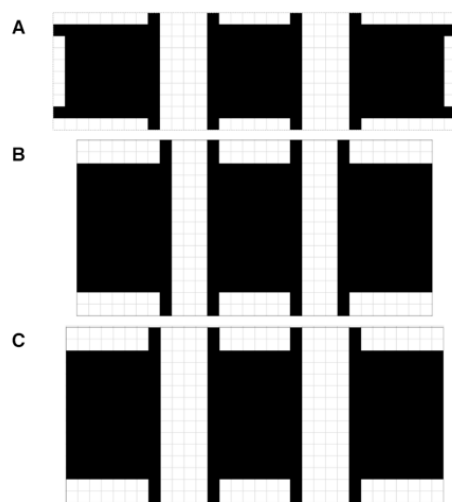


図 1. **A** : テンプレート 1。8 × 8 mm の長方形が 4 mm の隙間を空けて 3 つ並んだ形。1 × 1 mm の突起を有する。**B** : テンプレート 2。11 × 8 mm の長方形が 3 mm の隙間を空けて 3 つ並んだ形。2 × 1 mm の突起を有する。**C** : テンプレート 3。11 × 8 mm の長方形が 4 mm の隙間を空けて 3 つ並んだ形。2 × 1 mm の突起を有する。

熱傷創作製 96 時間後に創を観察し、Zone of stasis に相当すると考えたテンプレートの間隙部の壊死状況によって、創を以下の 3 つのタイプに分類した。具体的には、間隙部の 75 %以上が壊死している創を A タイプ、50 %から 75 %壊死している創を B タイプ、壊死が 50 %未満の創を C タイプとした。

テンプレート 1 では、接触時間別に 5, 10, 20, 30, 40, 50 秒間の 6 群で検討した。全群でテンプレートの長軸が脊柱と並行になるように配置し、左右の側胸腹部に接触させた（縦置き配置）。5 秒間接触群では全例が C タイプ、10 秒間接触群では 83.3 %が C タイプ、16.7 %が A タイプ、20 秒間接触群では 83.3 %が C タイプ、16.7 %が B タイプ、30 秒間接触群では 33.3 %が C タイプ、33.3 %が B タイプ、33.3 %が A タイプ、40 秒間接触群では 33.3 %が B タイプ、66.7 %が A タイプ、50 秒間接触群では全例が A タイプであった。

テンプレート 2 では、10, 15, 20, 25, 30 秒間の 5 群で検討した。全群でテンプレートは縦置き配置にした。10 秒間接触群の 1 例を除き、全例が A タイプであった。

テンプレート 3 では 10, 15, 20, 25 秒間の 4 群で検討した。全群でテンプレートは縦置き配置にした。10 秒間接触群は 50 %が C タイプ、50 %が B タイプ、15 秒間接触群では 33.3 %が C タイプ、66.7 %が B タイプ、20 秒間接触群では 75 %が B タイプ、25 %が A タイプ、25 秒間接触群では全例が A タイプであった。

テンプレート 4 では、10 秒間接触群（縦置き配置）、15 秒間接触群（縦置き配置）、15 秒間接触群（テンプレートの長軸が脊柱に垂直になるように配置し左右の側腹部に接触させる；横置き配置）、20 秒間接触群（縦置き配置）、20 秒間接触群（横置き配置）の 5 群で検討した。10 秒間接触群（縦置き配置）は 82.4 %が C タイプ、17.6 %が B タイプ、15 秒間接触群（縦置き配置）は 40 %が B タイプ、60 %が A タイプ、15 秒間接触群（横置き配置）は 12.5 %が C タイプ、75 %が B タイプ、12.5 %が A タイプであった。20 秒間接触群（縦置き配置）および 20 秒間接触群（横置き配置）はともに全例が A タイプであった。

以上の結果より、沸騰した 100 °C の熱水で 5 分間加熱したテンプレート 4 を用い、テンプレートの長軸が脊柱に垂直になるように横置きで側腹部に 15 秒間接触させる方法が、最も再現性をもって B タイプの熱傷創を作成できることが示唆された。

本実験

方法

1. 動物

実験には ICR マウス（雄，8 週齢，体重 36g から 38 g）を用いた。三共ラボサービス株式会社より 7 週齢で購入し，購入後 1 週間の順化期間を設けた。飼育環境は温度 24 °C，相対湿度 60 %から 65 %，12 時間明暗サイクル下とした。餌水は自由摂取可能とした。実験開始前日には，2.0 %イソフルラン-酸素混合ガスによる全身麻酔下で，3M™ サージカルクリッパー（可動ヘッドタイプ）および除毛クリームを用いて体幹部の除毛を行った。

2. 金属テンプレート

真鍮製のテンプレートは，11 × 8 mm の長方形本体に，3 × 1 mm のつばを有する 2 つのシルクハット様の構造が，4 mm の間隙を空けて対向する形状であり，巴企画に作製を依頼した。テンプレートの総重量は 99 g であった（図 2）。

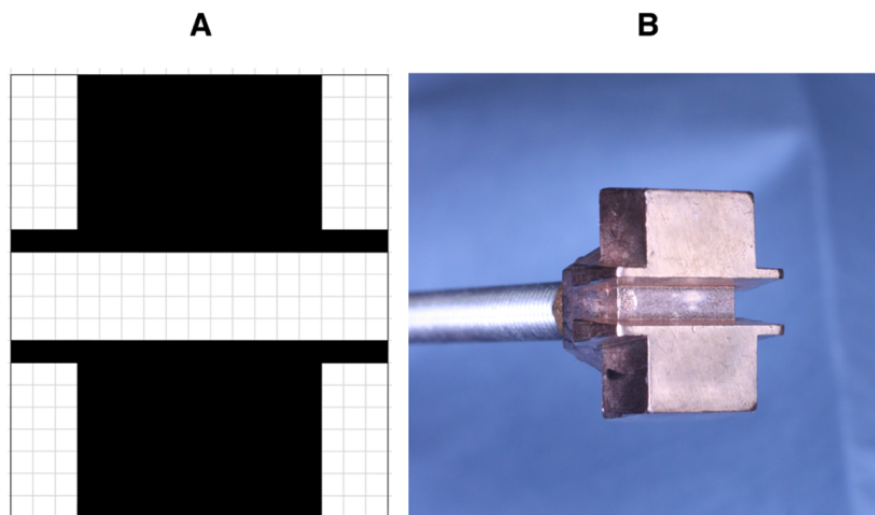


図 2. **A** : 1 × 1 mm の方眼紙に描かれたテンプレートのデザイン。黒塗りが凸面を示す。11 × 8 mm の長方形に 3 × 1 mm のつばを有する 2 つのシルクハット様の構造が，4 mm の間隙を空けて対向している。**B**: テンプレートの写真。

3. 実験群とプロトコール

75 匹のマウスを無作為に 3 群に分けた。各マウスには、2.5 %から 3.0 %のイソフルラン-酸素混合ガスによる吸入麻酔を施し、側臥位に保定した。ステンレスパイプヒーターSWS1503 を 100 °C に設定し、沸騰した水中にテンプレート を 5 分間浸漬して、十分に加熱した。テンプレートの加熱後、皮膚にしわが寄らないよう適度な張力を保ちながら、マウスの側腹部皮膚に対してテンプレートを垂直に接触させた。テンプレートの自重以外には、圧力を加えなかった(図 3A)。

接触時間に応じて、5 秒間接触群 (5s 群) ($n = 22$), 15 秒間接触群 (15s 群) ($n = 27$), 25 秒間接触群 (25s 群) ($n = 26$) の 3 群を設定し、それぞれの時間テンプレートを皮膚に接触させた。接触後、反対側の側腹部にも同様の操作を行い、各マウスに 2 か所の熱傷創を作成した。

テンプレートが皮膚と接触した部位には Zone of coagulation が、非接触部位には Zone of stasis が形成された (図 3B, C)。局所治療やドレッシング材の使用は行わず、輸液も実施しなかった。テンプレートと皮膚の接触が不均一であった場合や、過度の皮膚張力によって創傷間隙が狭くなっていた場合には、当該創を評価対象から除外した。

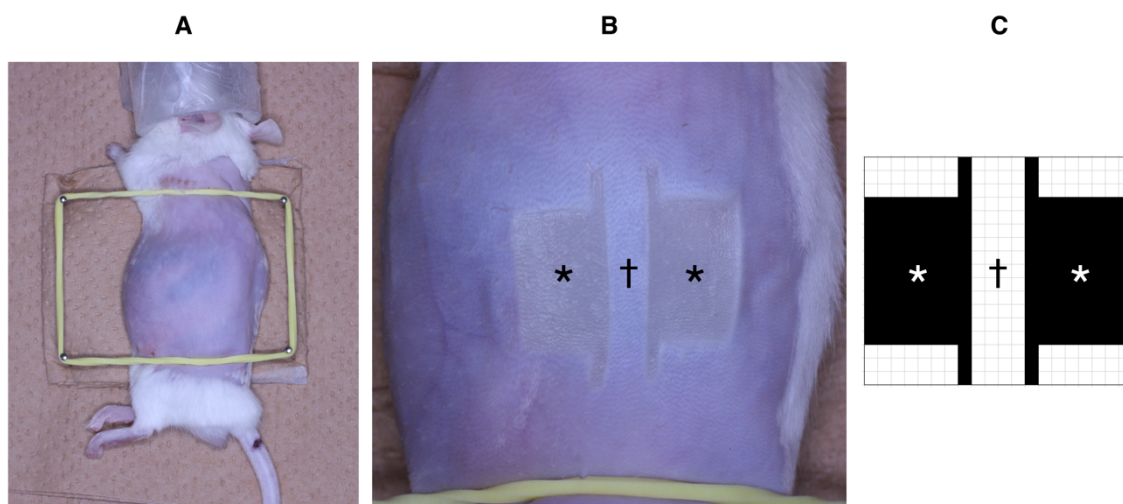


図 3. **A** : マウスは側臥位をとり、皮膚に適度な緊張をかけた状態で保定した。**B** : 熱傷創作成直後の様子。テンプレートの接触部分 (*) には Zone of coagulation が形成され、間隙の非接触部分 (+) には Zone of stasis が形成された。**C** : シェーマ。

4. 熱傷創の評価時点

熱傷創作成 1, 12, 24, 48, 96, 168 時間後の時点で, 2.0 %イソフルラン-酸素混合ガスによる吸入麻酔下にマウスを鎮静し, 創部の評価を実施した。

5. 肉眼的観察と熱傷面積の計測

熱傷創は個別に識別・記録し, 評価および解析を行った。熱傷創作成 1, 12, 24, 48, 96, 168 時間後に, 一眼レフカメラである EOS X2 (Canon, 東京) を用いて撮影を実施した。また, ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて, 熱傷創作成 96 時間後に撮影した画像から生存面積割合を解析した (図 4)。生存面積割合は以下の式により算出した :

$$\text{生存面積割合 (\%)} = (\text{間隙部の生存面積} \div \text{2 つの凸面に囲まれた全体面積}) \times 100$$

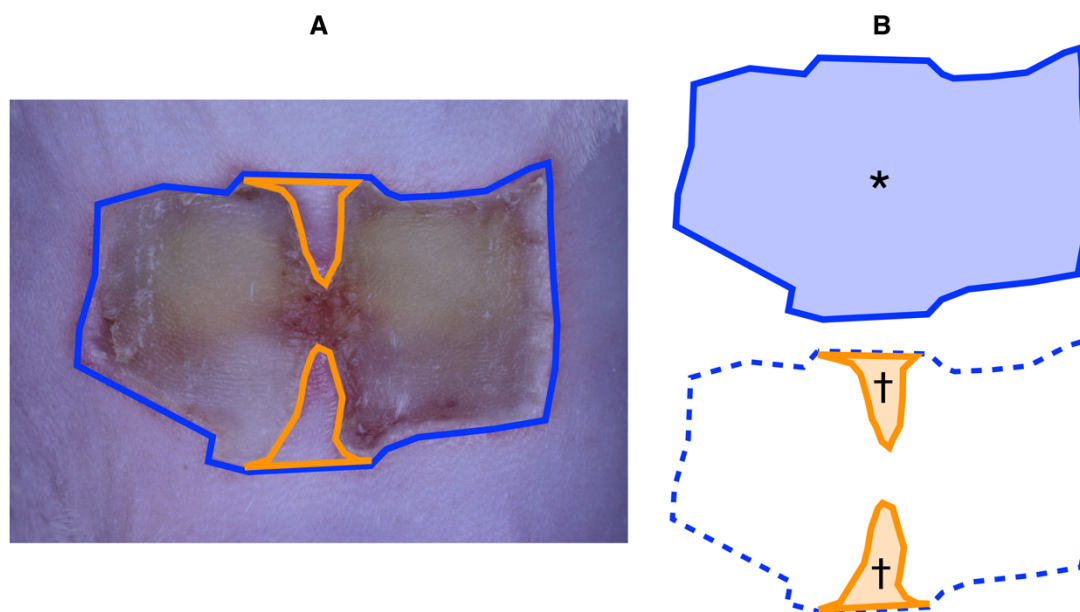


図 4. **A** : 熱傷創作成 96 時間後に撮影した写真に基づき, 生存領域と壊死領域の境界をマークし, 画像解析ソフトを用いて面積を算出した。**B** : シェーマ。2 つの凸面に囲まれた全体面積 (*) と間隙の生存面積 (+)。

6. Burn wound conversion を模したマウス動物モデルの定義

テンプレートにより作成された創傷において、間隙に形成される Zone of stasis の壊死率が 50 %から 75 %の範囲にある創傷が、Burn wound conversion の病態生理研究に最も適していると考えられた。Zone of stasis の大部分が壊死している場合、生理的な現象の観察が困難となる可能性があり、逆に大部分が温存している場合には Burn wound conversion が発生していない可能性を否定できない。そこで、Zone of stasis の壊死率に基づき、創傷を三つのタイプに分類した。具体的には、Zone of stasis の壊死率が 75 %以上を A タイプ、50 %から 75 %を B タイプ、50 %未満を C タイプとした。前節で示した生存面積割合の計算式に基づくと、A タイプの生存面積割合は 7 %未満、B タイプは 7 %から 14 %、C タイプは 14 %以上であった。以上より、本研究では、生存面積割合が 7 %から 14 %の B タイプの創傷を Burn wound conversion を模したマウス動物モデルとして定義した(図 5)。

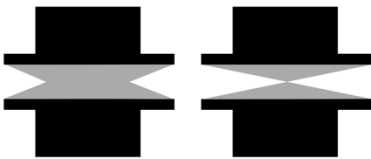
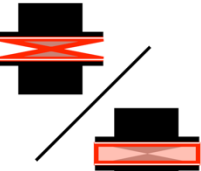
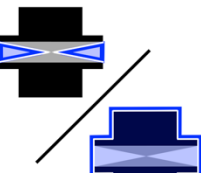
	Type A	Type B	Type C
			
(i) 	> 75%	75% - 50%	< 50%
(ii) 	< 7%	7% - 14%	> 14%

図 5. 間隙の灰色が、Burn wound conversion により壊死性変化が生じた部分を示す。(i) Zone of stasis のうち壊死面積の割合 $\times 100$ 。(ii) (間隙部の生存面積 $\div$ 2 つの凸面に囲まれた全体面積) $\times 100$ %。(i) において Zone of stasis の 50 %から 75 %が Burn wound conversion により壊死している B タイプは、(ii) において生存面積割合が 7 %から 14 %に相当する。

7. 組織学的評価

5s 群, 15s 群, 25s 群のそれぞれから 2 匹から 5 匹のマウスを無作為に選び, 熱傷創作成 1, 12, 24, 48, 96 時間後に安楽死させた。組織学的評価のため, 間隙の組織を採取し, 4 %パラホルムアルデヒドで固定した。パラフィン包埋後, ヘマトキシリン・エオジン染色を行い, 短辺の中心で組織切片を作製し、その中央部を観察した (図 6)。

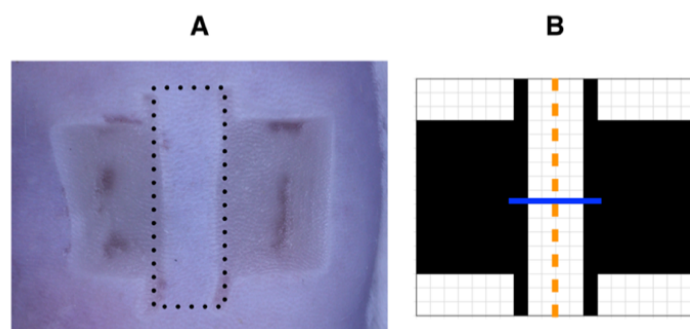


図 6. **A** : 破線で囲まれた間隙の組織を採取した (写真は 15s 群, 熱傷創作成 1 時間後)。 **B** : シェーマ。オレンジの破線で示した位置から組織切片を作製した。青の線は観察点を示す。

評価項目は表皮・皮膚付属器・真皮および皮下筋層の変性, 毛細血管の拡張および閉塞, 真皮および間質結合組織への炎症細胞浸潤, 表皮再生, 表層および深層の血管新生の 11 項目で, それぞれ 0 点から 2 点の 3 段階で採点した (表 1)。代表的な組織像を図で示した (図 7)。評価は 6 名の研究者が独立に盲検下で行った。

表 1：組織学的評価項目と評価時点ならびにスコア

Histological assessment.

Assessment items		Evaluation time after injury	Score	
1	Denaturation of the epidermis	1 h	0	Normal
2	Denaturation of the cutaneous appendages	12 h	1	Intermediate
3	Denaturation of the dermis	24 h	2	Strong
4	Denaturation of the panniculus carnosus	48 h		
5	Capillary hyperemia	96 h		
6	Capillary occlusion			
7	Infiltration of inflammatory cells into the dermis			
8	Infiltration of inflammatory cells into the interstitial connective tissue			
9	Regeneration of the epidermis			
10	Angiogenesis in the superficial layer			
11	Angiogenesis in the deep layer			

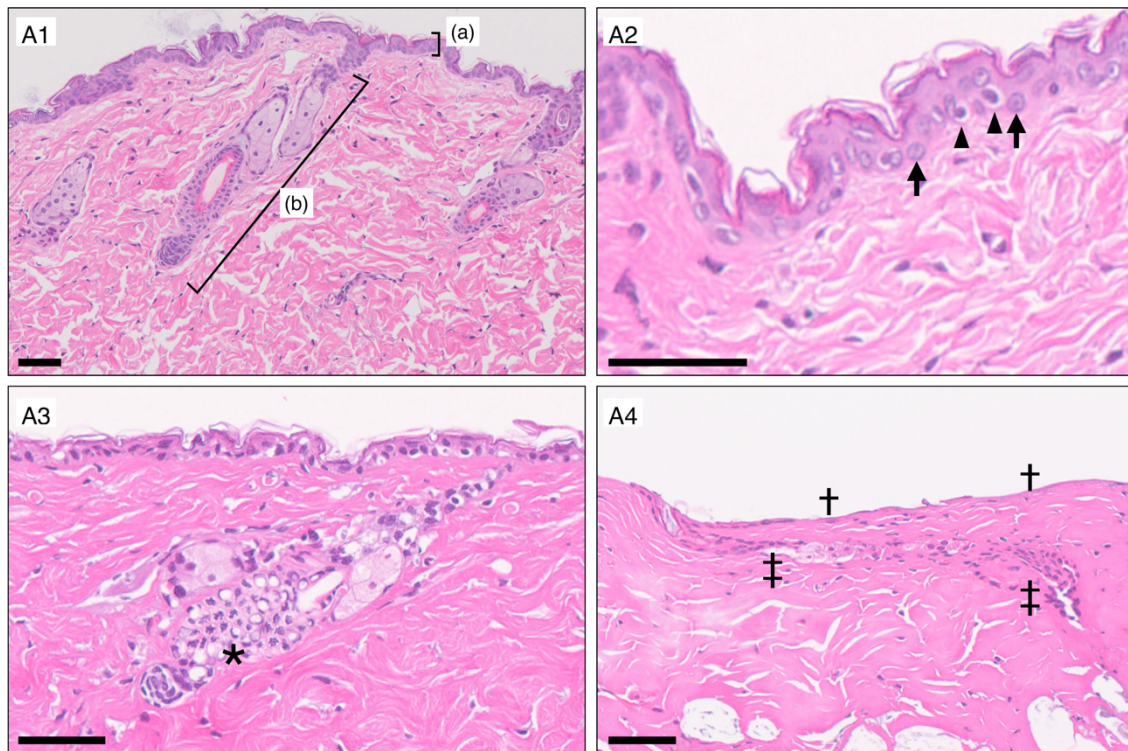


図 7. A : 表皮の変性と皮膚付属器の変性について。A1 : 0 点 (正常)。表皮 (a) : 1 層から 2 層構造で、核小体が明瞭。皮膚付属器 (b) : 皮脂腺と毛包。A2 : 1 点 (中等度) (15s 群, 熱傷創作成 1 時間後)。表皮 : 正常な核 (矢印) に混じって、凝集し変性した核 (矢頭) が散在している。A3 : 1 点 (中等度) (25s 群, 熱傷創作成 24 時間後)。皮膚付属器 : 核が凝集し、核周囲空隙が目立つ (*)。A4 : 2 点 (高度) (25s 群, 熱傷創作成 48 時間後)。表皮 : 欠如 (+)。皮膚付属器 : 強く変性し、構造が保たれていない (⦿)。Bar は 50 μm を示す。

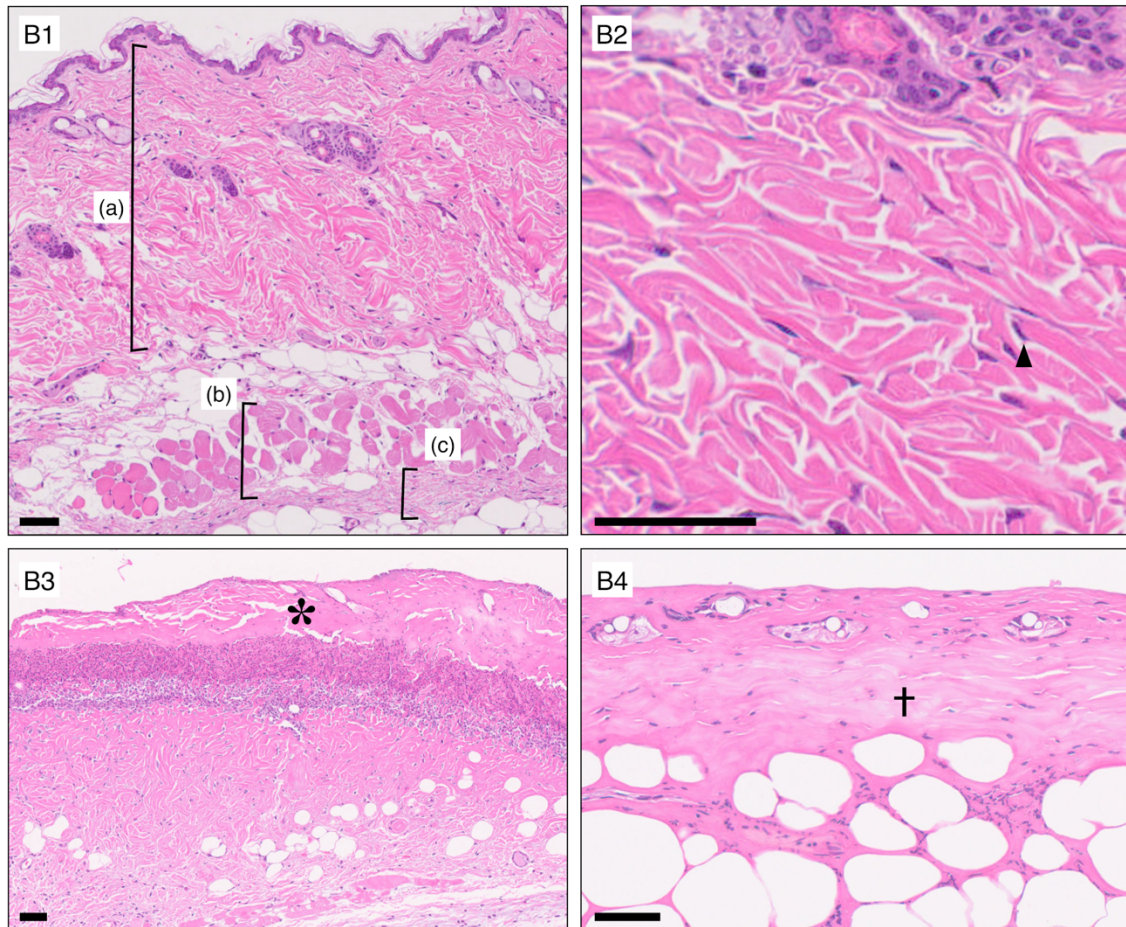


図 7. **B**：真皮の変性について。**B1**：0 点（正常）。真皮（a）：皮下筋層（b），間質性結合組織（c）。**B2**：0 点（正常），拡大像。真皮：膠原線維と線維芽細胞の核が見える（矢頭）。**B3**：1 点（中等度）（15s 群，熱傷創作成 48 時間後）。真皮の中間層まで変性している（*）。膠原線維は均質な構造変化を示している。核は変性し，凝集しているか消失している。**B4**：2 点（高度）（25s 群，熱傷創作成 24 時間後）。真皮全層が変性している（+）。Bar は 50 μm を示す。

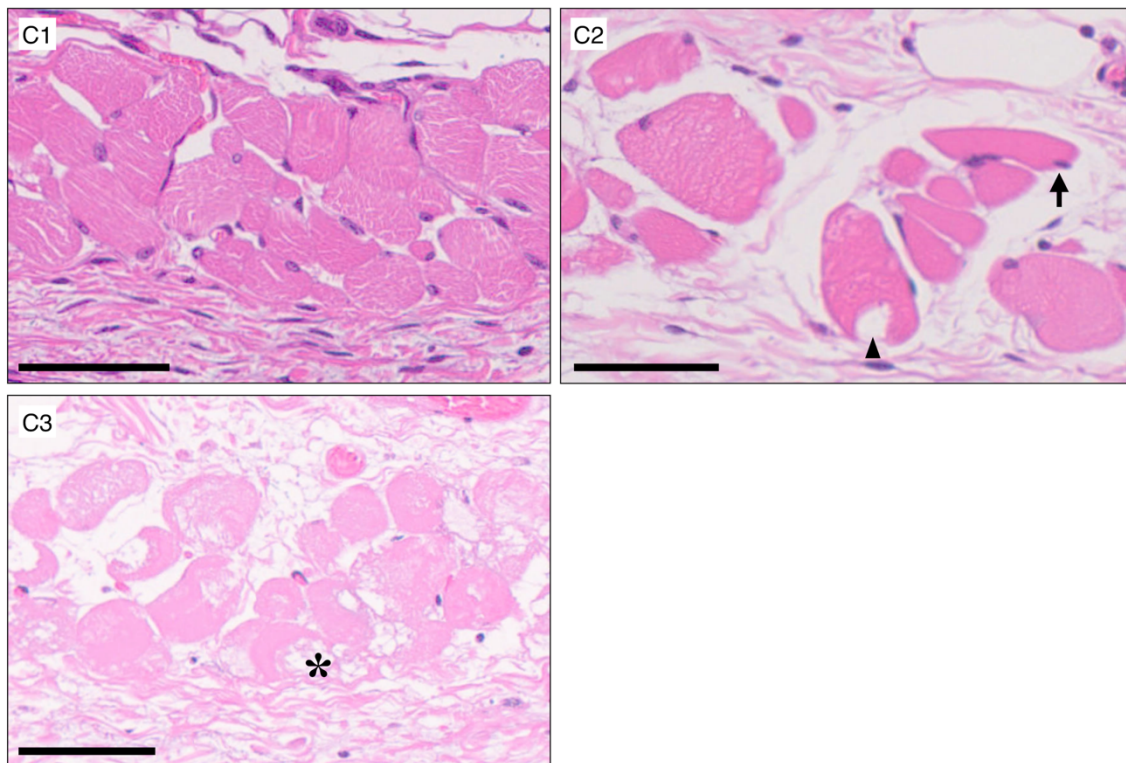


図 7. **C** : 皮下筋層の変性について。**C1** : 0 点 (正常)。皮下筋層。筋原線維は横紋構造を有し、核は筋鞘の辺縁部に位置しており、末梢性配列を示している。**C2** : 1 点 (中等度) (15s 群, 熱傷創作成 1 時間後)。筋鞘の構造は保たれているが、筋原線維内に空胞が認められる (矢頭)。変性し、凝集した核を認める (矢印)。**C3**: 2 点 (高度) (15s 群, 熱傷創作成 48 時間後)。筋鞘構造は破綻を認め (*), 核は消失している。Bar は 50 μ m を示す。

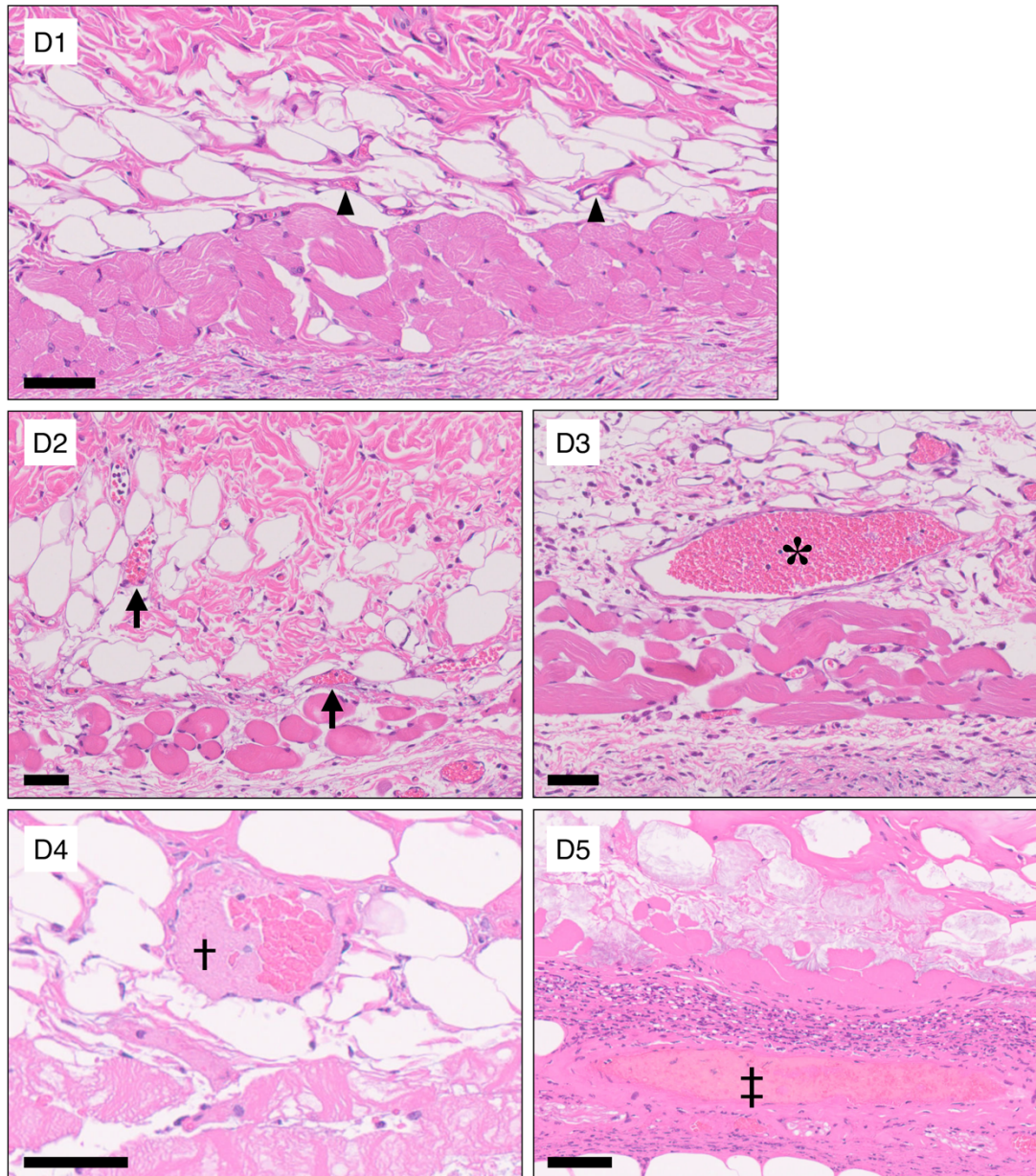


図 7. **D** : 毛細血管の鬱滞および閉塞について。 **D1** : 0 点 (正常)。脂肪層内で稀に血管構造を認める。 **D2** : 1 点 (中等度) (5s 群, 熱傷創作成 12 時間後)。毛細血管の鬱滞: 血管は脂肪細胞と同程度の大きさまで拡張しており, 内腔は赤血球が充満している (矢印)。 **D3** : 2 点 (高度) (5s 群, 熱傷創作成 96 時間後)。毛細血管の鬱滞: 血管は脂肪細胞および筋鞘よりも著明に大きく拡張している (*). **D4** : 1 点 (中等度) (15s 群, 熱傷創作成 12 時間後)。毛細血管の閉塞: 拡張した血管内には好酸性物質と赤血球が混在し, 内腔は閉塞している (†)。 **D5** : 2 点 (高度) (25s 群, 熱傷創作成 48 時間後)。毛細血管の閉塞: 血管内は均質な構造物で充満しており, 内腔は完全に閉塞している (‡)。血管内皮細胞は変性し消失している。Bar は 50 μ m を示す。

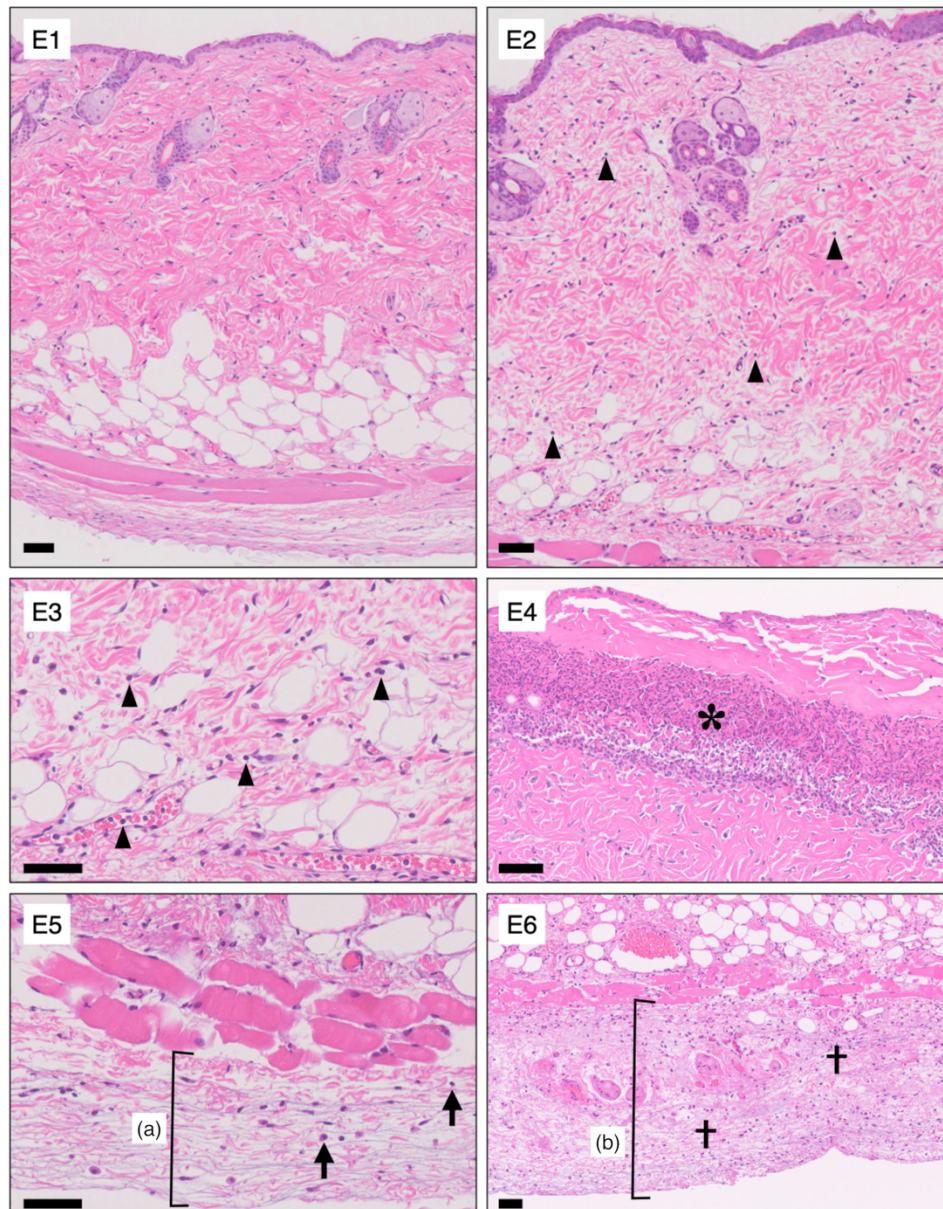


図 7. **E**：炎症細胞の真皮および間質性結合組織への浸潤について。**E1**：0 点（正常）。炎症細胞の浸潤は真皮ではほとんど認められず，間質性結合組織においてごく軽度に認められる。**E2, 3**：1 点（中等度）（5s 群，熱傷創作成 1 時間後）。真皮内に単核球が散見され，血管内からの遊走像が確認される（矢頭）。**E4**：2 点（高度）（15s 群，熱傷創作成 48 時間後）。壊死性変化を示す真皮の周囲に，多数の変性炎症細胞の集簇が認められる（*）。**E5**：1 点（中等度）（5s 群，熱傷創作成 12 時間後）。間質性結合組織の肥厚（a）と炎症細胞浸潤：皮下筋層よりも肥厚しており，複数の単核球が認められる（矢印）。**E6**：2 点（高度）（15s 群，熱傷創作成 24 時間後）。間質性結合組織は著明に肥厚（b）しており，多数の炎症細胞が浸潤している（†）。Bar は 50 μ m を示す。

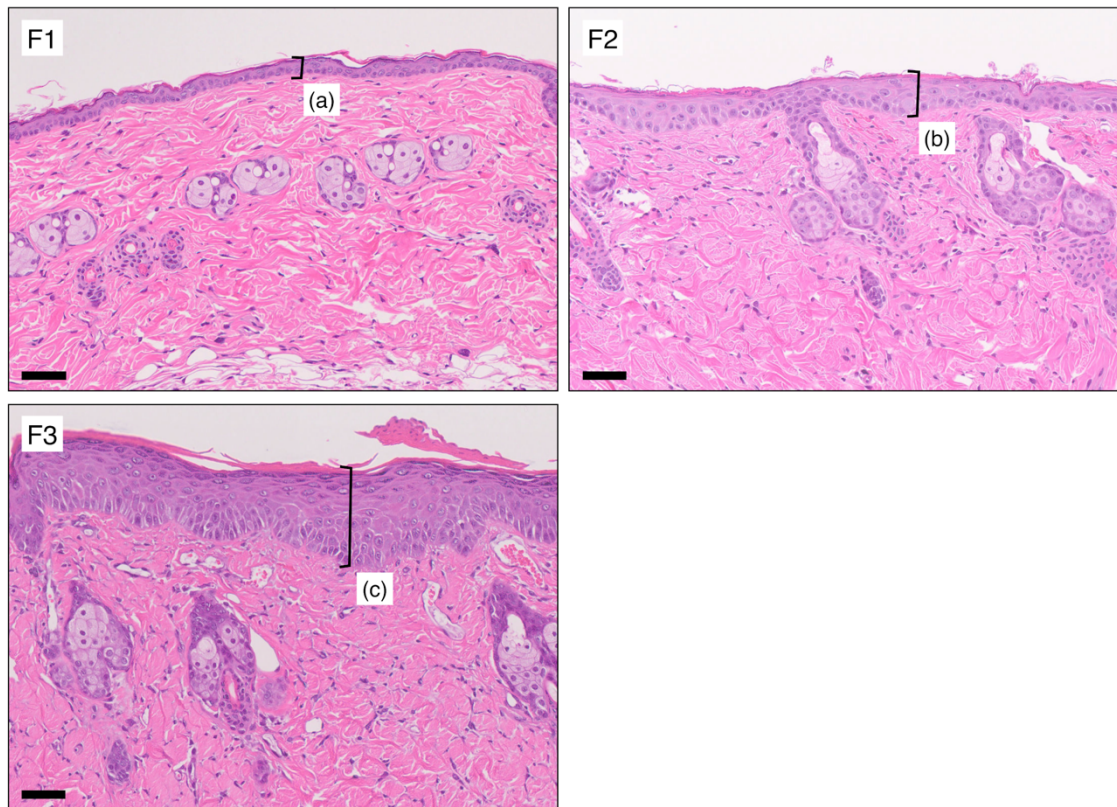


図 7. **F**：表皮の再生について。**F1**：0 点（正常）。表皮は 1 層から 2 層の細胞層で構成されている（a）。**F2**：1 点（中等度）（15s 群，熱傷創作成 96 時間後）。表皮細胞の再生が認められ，細胞層は 3 層から 5 層に重層化している（b）。**F3**：2 点（高度）（5s 群，熱傷創作成 96 時間後）。表皮細胞の強い再生性増殖が認められ，重層化した表皮層は著明に肥厚している（c）。Bar は 50 μm を示す。

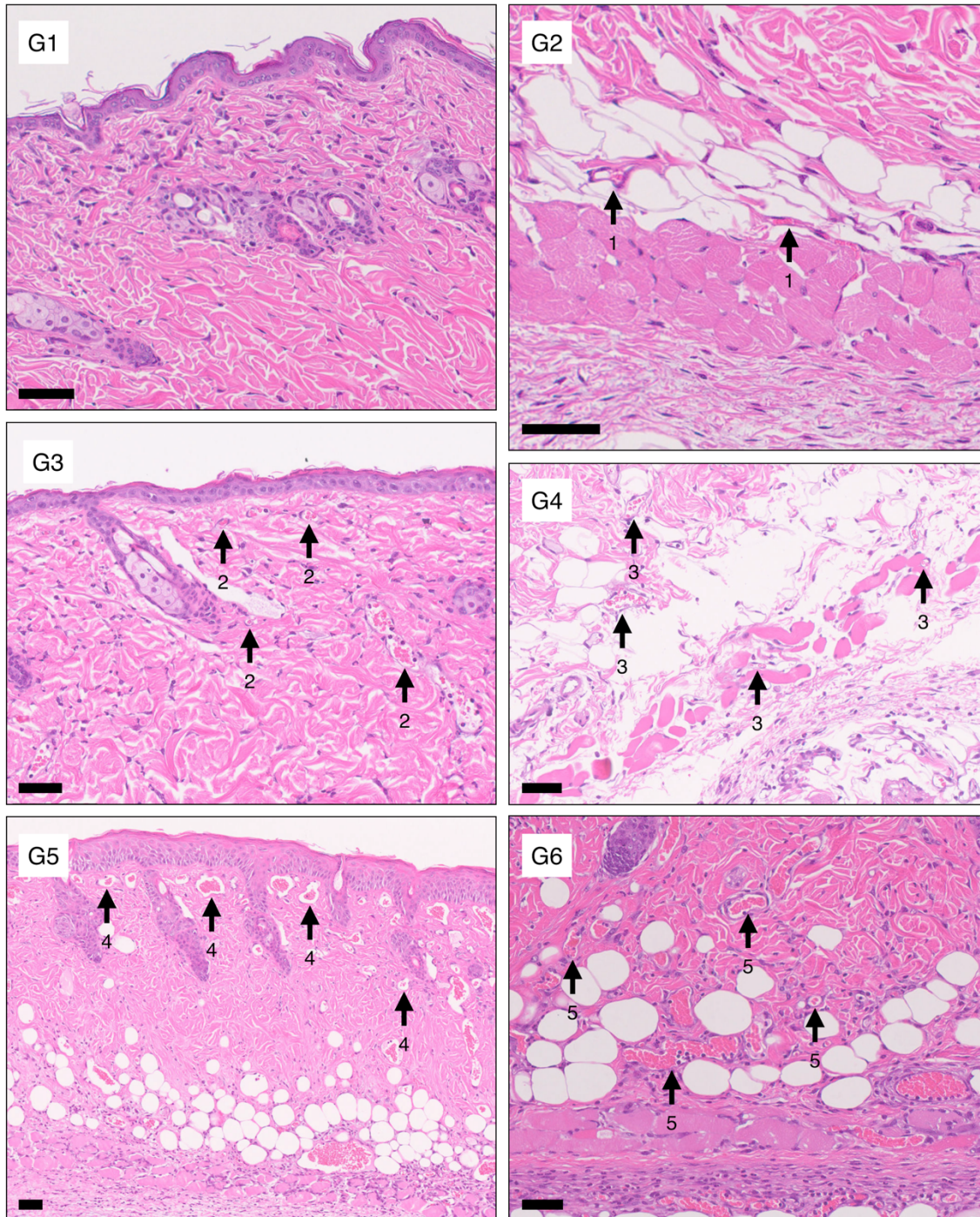


図 7. **G**：浅層および深層における血管新生について。**G1**：0 点（正常）。浅層では血管構造はほとんど認められない。**G2**：0 点（正常）。真皮深層および脂肪層では、細く小さな血管が稀に認められる（矢印 1）。**G3**：1 点（中等度）（15s 群，熱傷創作成 48 時間後）。浅層では血管新生が進行しており，小血管の出現が明瞭である（矢印 2）。**G4**：1 点（中等度）（5s 群，熱傷創作成 48 時間後）。深層において，変性した筋組織や脂肪組織の周囲に新生小血管の形成が

認められる（矢印 3）。G5：2 点（高度）（15s 群，熱傷創作成 96 時間後）。浅層において，大小さまざまな血管が豊富に認められる（矢印 4）。G6：2 点（高度）（15s 群，熱傷創作成 96 時間後）。深層において，大小さまざまな血管が豊富に認められる（矢印 5）。Bar は 50 μm を示す。

8. 統計学的解析

すべてのデータは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。2 群間の比較には Student の t 検定を用い，3 群以上の比較には一元配置分散分析を行い，その後 Tukey-Kramer 法による多重比較検定を施した。組織学的評価で 6 名から得られた評価スコアは，時点毎に平均した後，JMP ver. 17.0 のグラフビルダーで，スプライン補間を用いて近似曲線を作成した。すべての統計解析は JMP version 17.0（SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA）を用いて実施し， $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

1. 実験動物の使用状況と解析対象の概要

75 匹のマウスのうち 34 匹は、熱傷創作成 96 時間後の評価に先立ち、各評価時点で組織学的評価のために安楽死させた。また、熱傷創作成 96 時間後までに 7 匹のマウスが死亡しており、いずれも 25s 群に属していた。このうち 3 匹は熱傷創作成後 24 時間から 48 時間の間に、残りの 4 匹は 48 時間から 96 時間の間に死亡した。

5s 群のマウス 1 匹および 15s 群のマウス 2 匹では、熱傷創作成中の手技上の問題により左右いずれか一侧の創傷を評価から除外したが、手技上の問題のなかった対側の創傷は解析に含めた。

結果として、34 匹のマウスから得られた 65 の創傷における生存面積割合を、熱傷創作成 96 時間後に評価した。その後、組織学的評価のためにさらに 9 匹のマウスを安楽死させた。加えて、15s 群の 1 匹については、実験開始時と比較して 20 %以上の体重減少を認めたため安楽死させた。残りの 24 匹（5s 群：12 匹，15s 群：7 匹，25s 群：5 匹）は、熱傷創作成 168 時間後の評価終了時に安楽死させた。

2. 肉眼所見の経時的変化と群間比較

熱傷創作成直後には、テンプレートの接触部において皮膚の白色変化および硬化が認められた。間隙部でも軽度の白色変化が観察された。5s 群では、熱傷創作成直後から 96 時間後までに間隙部の壊死変化は認められなかった。15s 群では、熱傷創作成 24 時間後に間隙部に紫斑が出現し、48 時間後には間隙の一部に壊死変化が認められた。熱傷創作成 96 時間後には、壊死領域が拡大した。25s 群では、熱傷創作成 24 時間後に間隙部に潰瘍および紫斑が認められた。潰瘍は経時的に拡大し、熱傷創作成 96 時間後には間隙部の大部分が壊死していた。熱傷創作成 96 時間後および 168 時間後の比較において、いずれの群も壊死面積の有意な増加は認められなかった。一方、168 時間後には、明らかな創収縮が確認された（図 8）。

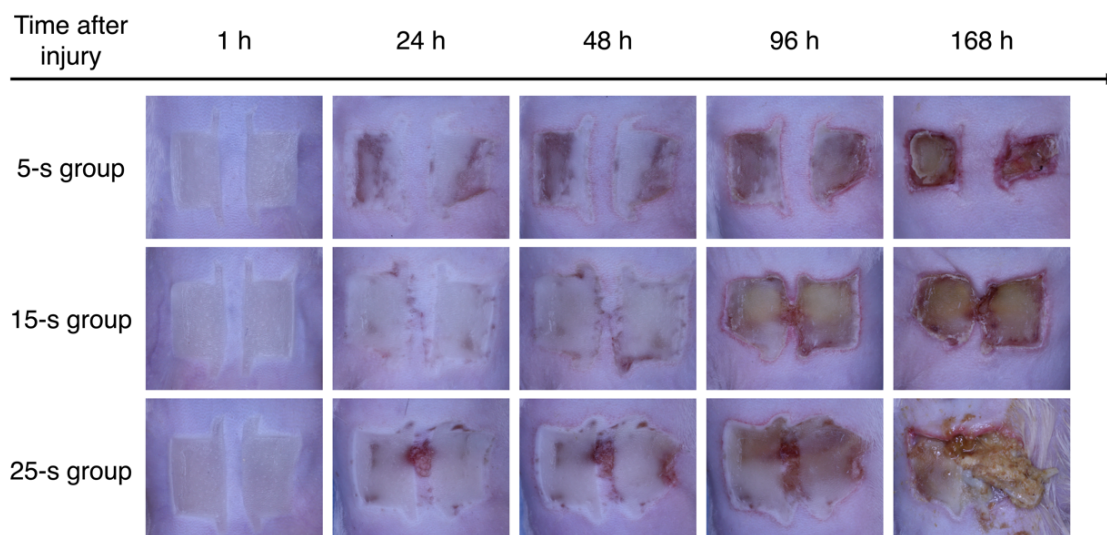


図 8. 各群における典型的な経過の概要。5s 群では、間隙に形成された Zone of stasis は壊死に至らず、組織の生存が維持されていた。15s 群では、Zone of stasis の一部に壊死が認められ、左右に形成された 2 つのシルクハット状の壊死部が中央で癒合していた。25s 群では、Zone of stasis の大部分が壊死し、左右のシルクハット状壊死部が完全に癒合していた。また、一部のマウスでは、創部感染により死亡した。

3. 生存面積割合

熱傷創作成 96 時間後に ImageJ を用いて解析した生存面積割合は、5s 群で $20.1\% \pm 0.6\%$ 、15s 群で $9.6\% \pm 0.6\%$ 、25s 群で $3.7\% \pm 0.8\%$ であった。生存面積割合に関する Tukey-Kramer 法の結果、3 群間で両側 $p < 0.001$ の有意差が認められた。タイプ分類では、5s 群の大部分が C タイプ、25s 群ではすべてが A タイプであった。一方、15s 群では B タイプが最も多く認められたが、A タイプおよび C タイプも一部に認められた（図 9）。

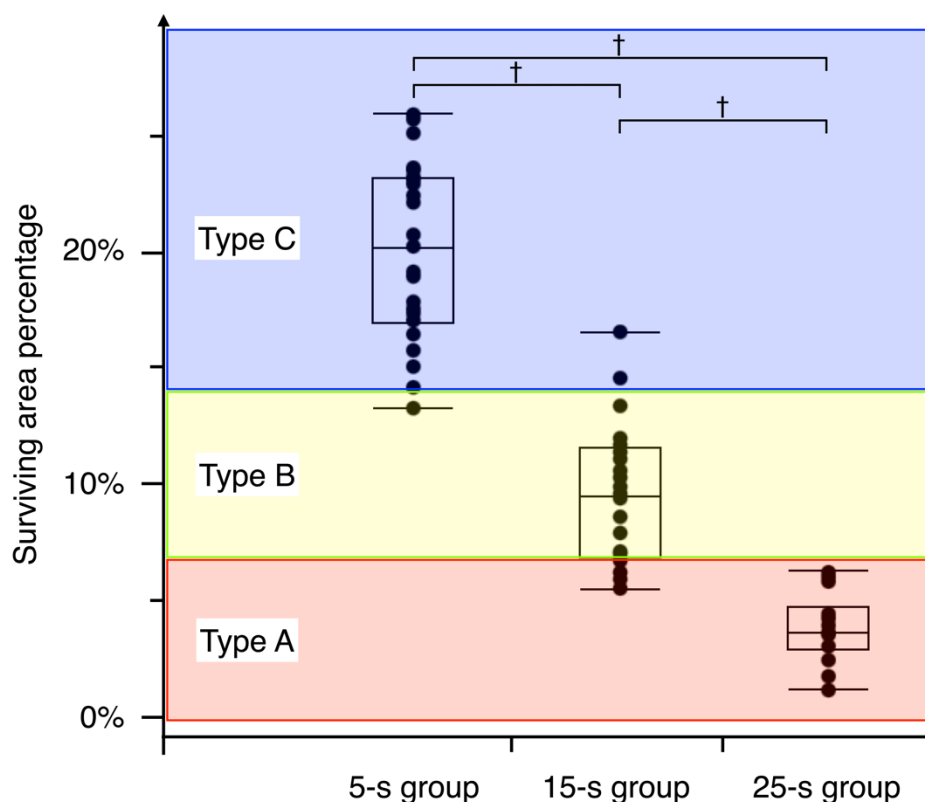


図 9. 接触時間と生存面積割合の関係。生存面積割合に対する Tukey-Kramer 法の結果、3 群間に有意な差が認められた（両側検定、 $p < 0.001$ ；†で示す）。図 5 での定義に従い、生存面積割合が 7%未満のものを A タイプ（赤）、7%以上 14%未満を B タイプ（黄）、14%以上を C タイプ（青）として分類したところ、5s 群ではほとんどが C タイプに該当し、25s 群ではすべてが A タイプであった。15s 群では B タイプが最も多かったが、A タイプおよび C タイプも含まれていた。

4. 組織学的評価

熱傷創作成 1, 12, 24, 48, 96 時間後に採取したサンプル数は、5s 群では各時点で 4 個、15s 群では順に 6 個、6 個、8 個、8 個、8 個、25s 群では順に 4 個、6 個、8 個、6 個、3 個であった。JMP ver. 17.0 のグラフビルダーを用いて作成した近似曲線を図 10, 11, 12 に示す。

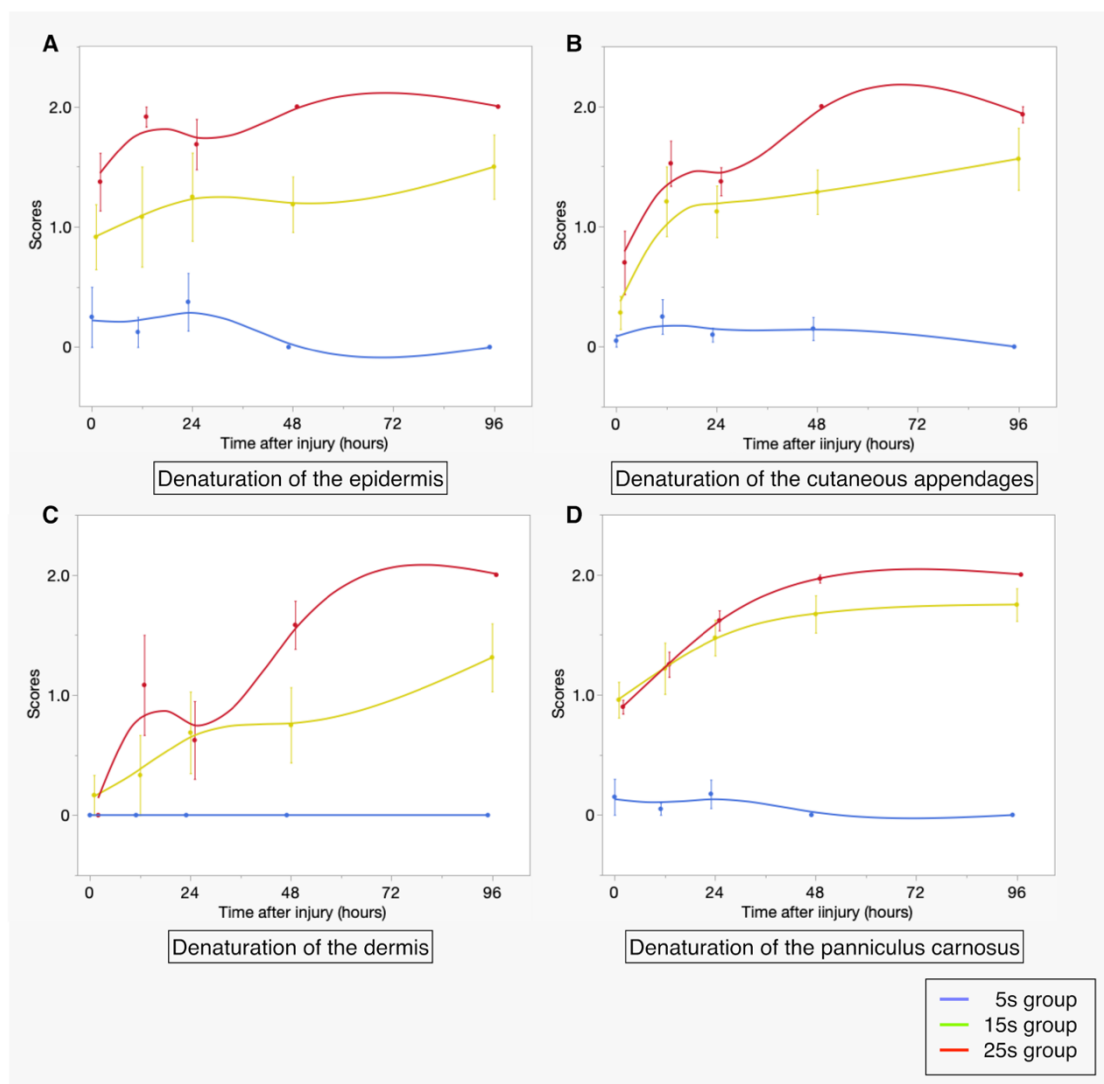


図 10. **A** : 表皮の変性について。 **B** : 皮膚付属器の変性について。 **C** : 真皮の変性について。 **D** : 皮下筋層の変性について。青線は 5s 群，黄線は 15s 群，赤線は 25s 群を示す。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。

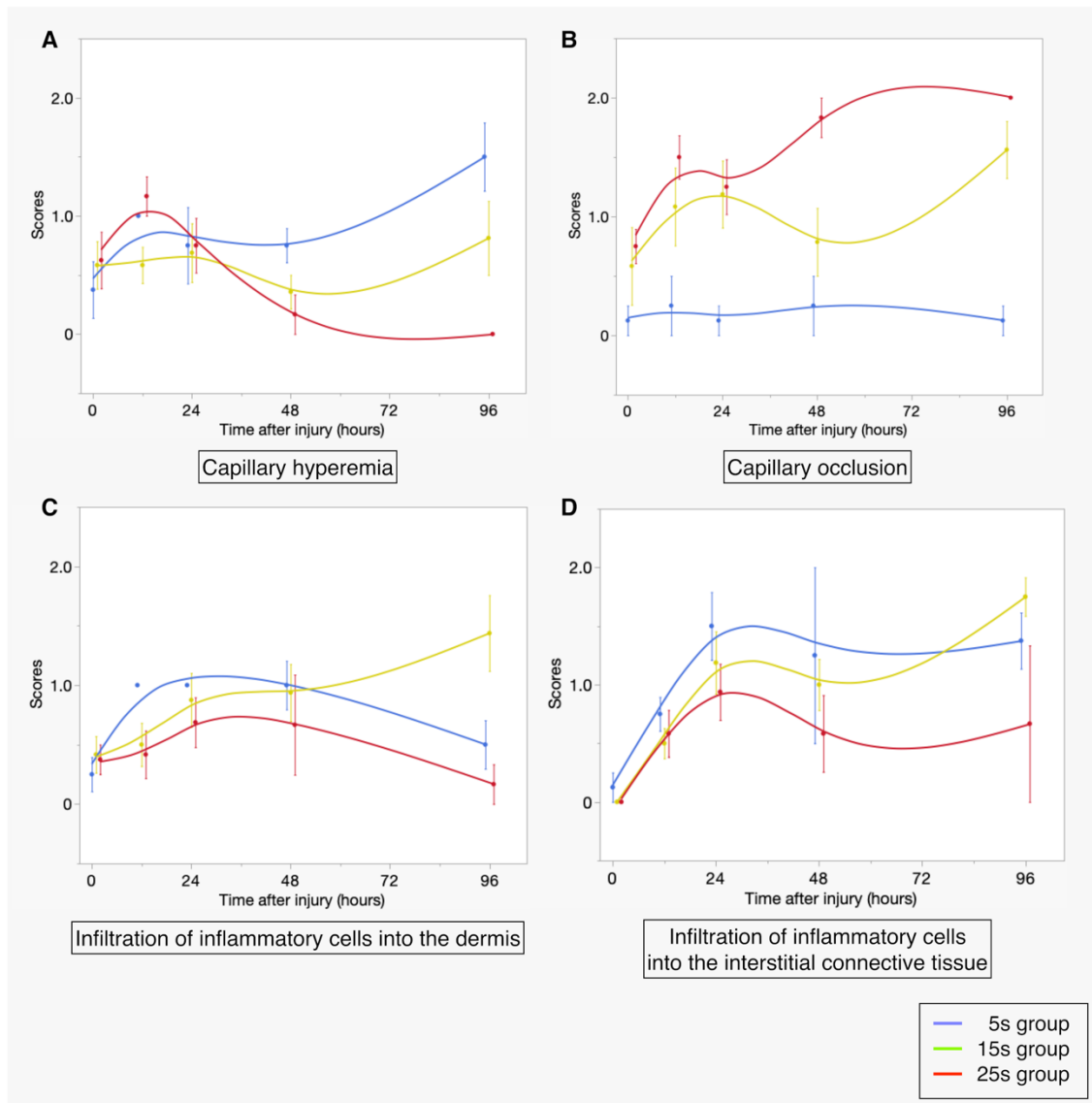


図 11. **A** : 毛細血管の鬱滞について。 **B** : 毛細血管の閉塞について。 **C** : 炎症細胞の真皮への浸潤について。 **D** : 炎症細胞の間質性結合組織への浸潤について。青線は 5s 群，黄線は 15s 群，赤線は 25s 群を示す。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。

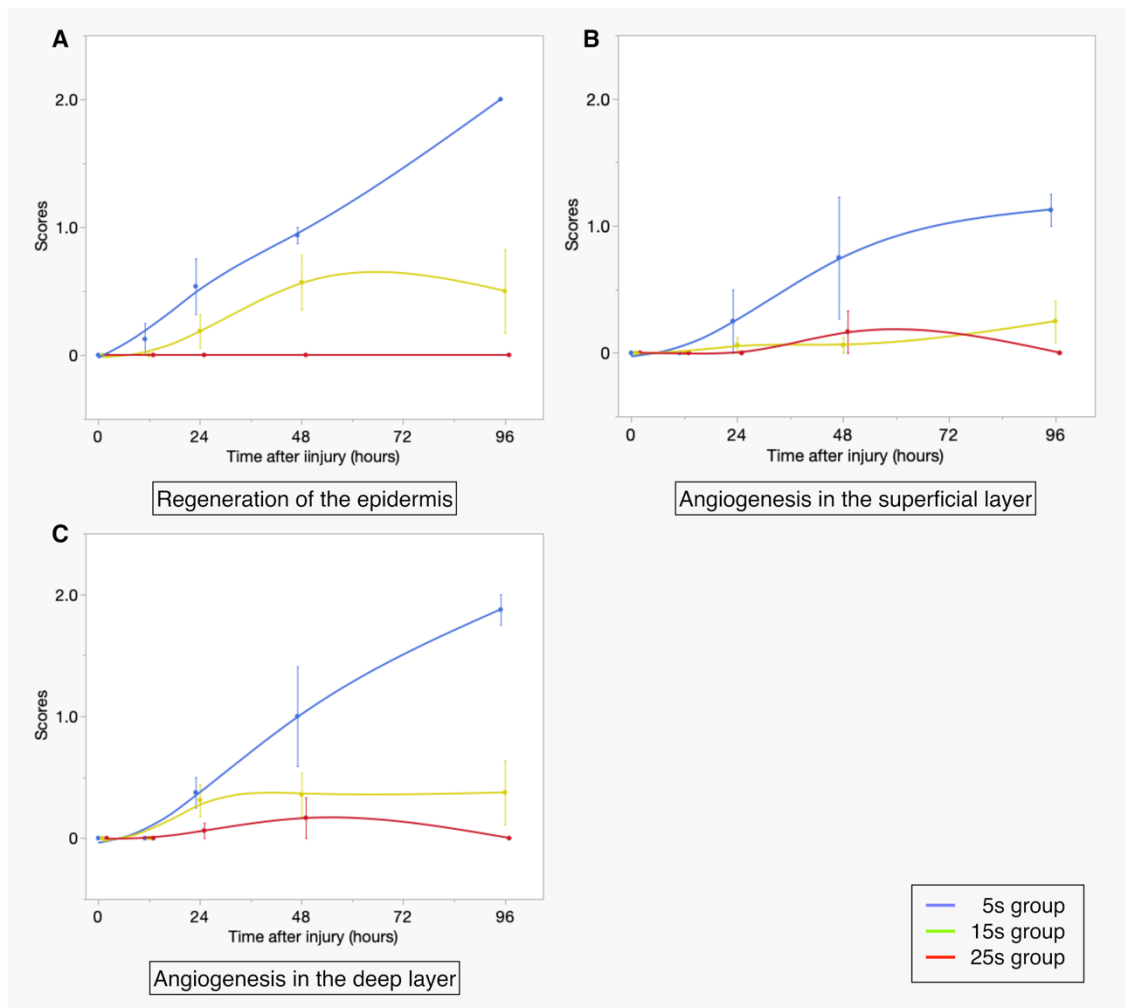


図 12. **A** : 表皮の再生について。 **B** : 浅層における血管新生について。 **C** : 深層における血管新生について。青線は 5s 群，黄線は 15s 群，赤線は 25s 群を示す。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。

5. 皮膚付属器および皮下筋層における組織評価スコアの経時変化

皮膚付属器の変性に関する組織評価スコアは、5s 群で熱傷創作成 12 時間後に 0.25 ± 0.29 、96 時間後に 0.00 ± 0.30 であったのに対し、15s 群では熱傷創作成 12 時間後に 1.21 ± 0.24 、96 時間後に 1.56 ± 0.22 であった (図 13A)。5s 群では、熱傷創作成 96 時間後まで皮膚付属器の明らかな変性は認められなかった。一方、15s 群では、熱傷創作成 12 時間後から核の凝集および核周囲空隙を伴う中等度の変性が観察された (図 14A)。熱傷創作成 12 時間後および 96 時間後の両時点において、5s 群と 15s 群の間には有意差が認められた (それぞれ $p = 0.0357$, $p = 0.0019$)。

皮下筋層の変性に関する組織評価スコアは、5s 群で熱傷創作成 12 時間後に 0.05 ± 0.21 、96 時間後に 0.00 ± 0.16 であったのに対し、15s 群では熱傷創作成 12 時間後に 1.22 ± 0.17 、96 時間後に 1.75 ± 0.11 であった (図 13B)。5s 群では熱傷創作成 96 時間後まで変性はほとんど認められなかったが、15s 群では熱傷創作成 12 時間後から筋原線維の変性および筋鞘内空隙を伴う中等度の変性が観察された (図 14B)。熱傷創作成 12 時間後および 96 時間後の両時点において、5s 群と 15s 群の間には有意差が認められた (それぞれ $p = 0.0025$, $p < 0.0001$)。

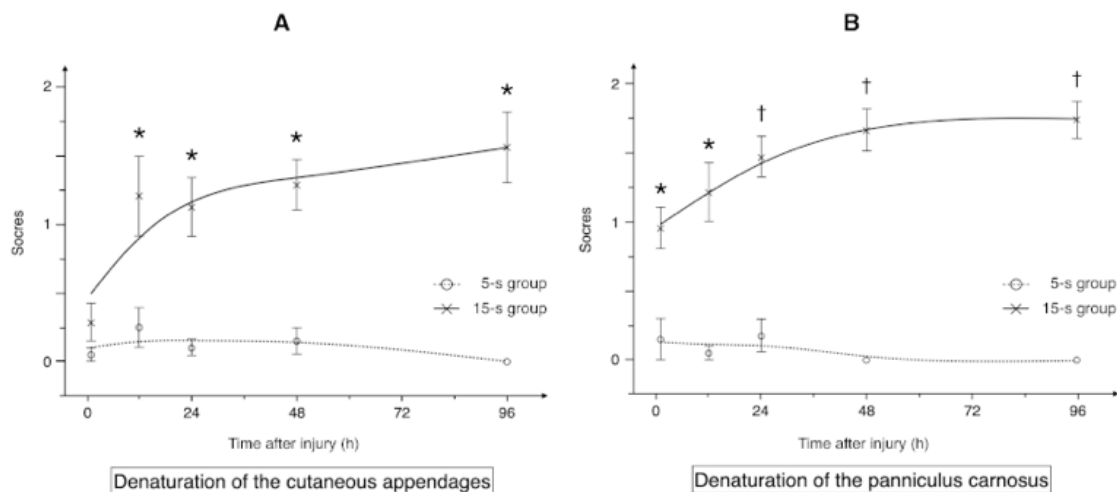


図 13. 皮膚付属器の変性および皮下筋層の変性に関する組織評価スコアの経時的変化。実線は 15s 群，破線は 5s 群を表す。**A**：皮膚付属器の変性スコアは，熱傷創作成 12 時間後から 96 時間後において，5s 群より 15s 群で有意に高かった ($p < 0.05$, *で示す)。**B**：皮下筋層の変性スコアは，熱傷創作成 1 時間後から 96 時間後において，15s 群の方が 5s 群よりも有意に高かった ($p < 0.05$, *で示す。 $p < 0.001$, †で示す)。

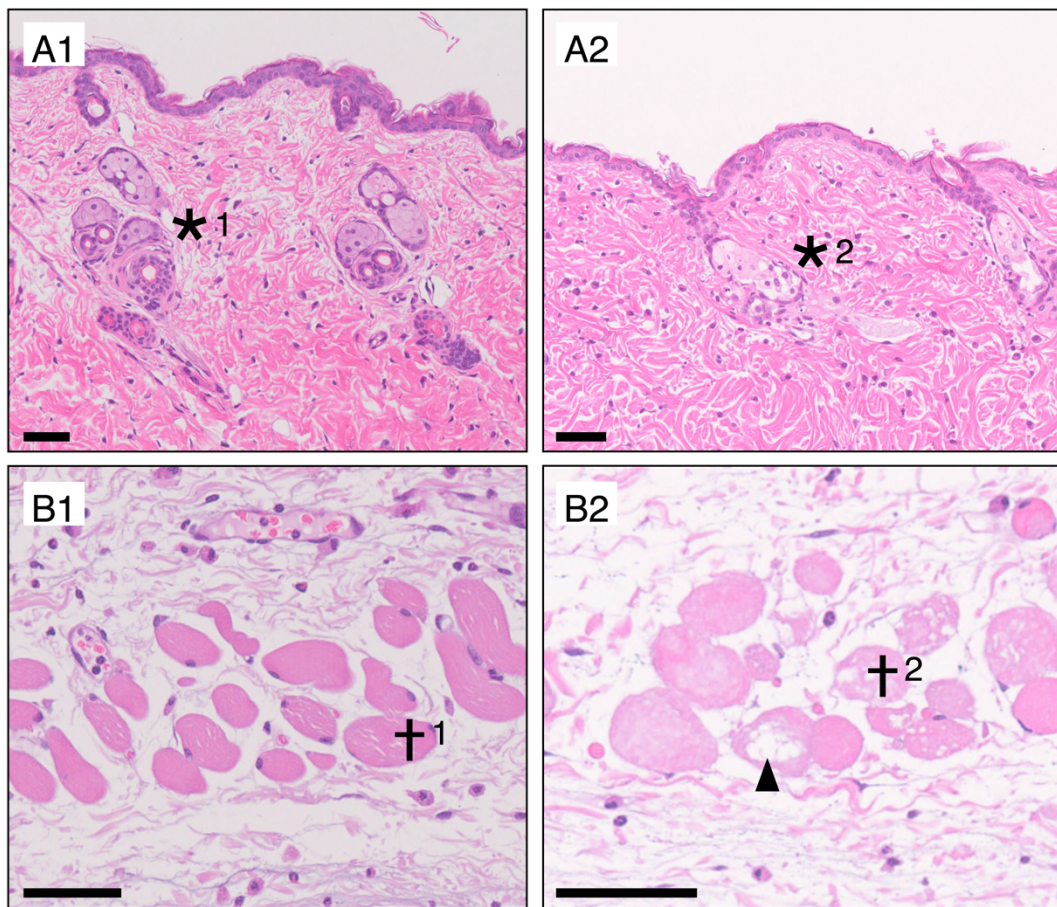


図 14. 皮膚付属器の変性および皮下筋層の変性の代表的な組織像（ヘマトキシリン・エオジン染色）。Bar は 50 μm を示す。A1：5s 群，熱傷創作成 12 時間後。皮膚付属器には明らかな変性は認められない（*1）。A2：15s 群，熱傷創作成 12 時間後。皮膚付属器に核の凝縮および核周囲腔の拡大が観察され，1 点（中等度）の変性を認める（*2）。B1：5s 群，熱傷創作成 12 時間後。皮下筋層に変性所見は認められない（†1）。B2：15s 群，熱傷創作成 12 時間後。皮下筋層に筋原線維の変性および筋鞘内空隙（矢頭）を伴う 1 点（中等度）の変性を認める（†2）。

考察

本研究では、2つの重要な知見が得られた。第一に、マウスを用いて **Burn wound conversion** を効率的かつ再現性よく検討可能な新規動物モデルを確立した点である。第二に、熱傷創作成直後から4日後までの複数の時点において **Zone of stasis** の組織学的評価を行い、壊死性変化に至る過程における組織学的変化を明らかにした点である。

マウスを用いた **Burn wound conversion** に関する先行研究 (Lu et al, 2022 ; Palackic et al, 2022) では、熱水 (Adediran et al, 2010 ; Beffa et al, 2011 ; Bohannon et al, 2009 ; Bohr et al, 2013 ; Cribbs et al, 1998 ; Fan et al, 2010 ; Fan et al, 2009a ; Fan et al, 2009b ; Finnerty et al, 2009 ; Howell et al, 2012 ; Huber et al, 2012 ; Liu et al, 2011 ; Muthu et al, 2009 ; Palmer et al, 2011 ; Plackett et al, 2010 ; Posluszny et al, 2011 ; Song et al, 2009 ; Song et al, 2008 ; White-Dzuro et al, 2022 ; Zhang et al, 2013), あるいは加熱した金属テンプレート (Begieneman et al, 2012 ; Chen et al, 2021) を皮膚に接触させて熱傷創を作成していた。しかしながら、これらの研究では熱傷創全体を評価対象としていたため、**Zone of stasis** に限局した **Burn wound conversion** の解析は困難であった。今回確立したモデルでは、**Zone of stasis** が生じる部位を意図的に作成することが可能であり、これにより **Zone of stasis** に限局した生理学的および組織学的評価が可能となった。

Comb モデル (Regas and Ehrlich, 1992 ; Tobalem et al, 2020) は、ラットを用いた **Burn wound conversion** 研究において既に確立された手法であるが、これをマウスに転用するには、ラットとマウスの体格差に応じてテンプレートのサイズを調整する必要がある。**Comb** モデルのテンプレートを同一の比率でマウス用に縮小した場合、その最大寸法はおよそ $30 \times 15 \text{ mm}$ (3つの凸面が $15 \times 7.5 \text{ mm}$, 2つの隙間が $15 \times 3.75 \text{ mm}$) となる。このサイズでは、テンプレートが接触する皮膚の直下に肋骨や股関節などの硬性組織と腹部の軟性組織が混在し、皮膚との接触圧を均一に保つことが困難である。その結果、モデルの安定性および再現性が損なわれる可能性がある。この問題を回避するために、本研究ではテンプレートの接触部位をマウスの側腹部に限定した設計を採用した。本モデルは、**Comb** モデルと比較して、隙間の大きさや数に加え、シルクハットのつばのような突起部を有している点が特徴である。この突起部は、テンプレートが皮膚と接触して生じた **Zone of coagulation** と、非接触領域に相当する **Zone of stasis** との境界を視認する上で有用である。

また、Comb モデルではテンプレートの長軸が脊柱と平行に配置される。マウスやラットの皮下筋層における筋繊維の走行を踏まえると (Naldaiz-Gastesi et al, 2018), 創部はこの長軸方向に沿って収縮しやすいと考えられる。そのため、たとえ Zone of stasis の幅を 10 mm として作成した場合でも、創傷治癒過程における創収縮の影響を受けて Zone of stasis の幅が変化し、生存領域および壊死領域の面積を再現性よく評価することが困難となりうる。本研究では、テンプレートの長軸を脊柱に対して垂直に配置したことで、創収縮の影響を最小限に抑えることができた。その結果、Zone of stasis における生存率および壊死率の評価において、再現性の高い解析が可能となった。

熱傷を誘発する熱源としては、熱水との直接接触 (Abdullahi et al, 2014), 加熱した金属との接触 (Begieneman et al, 2012 ; Chen et al, 2021), ヒートガンなどの熱風, アルゴンレーザー (Nakasone et al, 2007) などが挙げられる。本研究では、テンプレートの加熱方法として、半田ごてへの接続および熱水への浸漬の 2 つを検討した。半田ごてへの接続では機械の設定温度とテンプレートの実温度との乖離が認められたため、採用を見送った。一方、加熱した熱水への浸漬は、十分な浸漬時間を確保することでテンプレート全体の温度を均一に保てるため、再現性の高い加熱法であると判断した。水温が設定値 (100 °C) に到達したことを確認した上で、沸騰状態を視認し、さらに外部温度計で水温をモニターすることで温度管理の確実性を高めた。

ラットの Comb モデルでは、金属テンプレートを 100 °C に加熱して 20 秒から 30 秒間皮膚に接触させることで、接触部位に Zone of coagulation が形成された (Bohr et al, 2013 ; Choi et al, 2018 ; El Ayadi et al, 2021 ; Eski et al, 2012 ; Fang et al, 2017 ; Fourman et al, 2014 ; Inoue et al, 2018 ; Jiang et al, 2023 ; Lee et al, 2023 ; Macri et al, 2013 ; Öksüz et al, 2013 ; Reddy et al, 2015 ; Rosique et al, 2017 ; Shalom et al, 2011 ; Singer et al, 2010 ; Singer et al, 2011 ; Singer et al, 2018 ; Singer et al, 2020 ; Singer et al, 2013 ; Smith et al, 2021 ; Tobalem et al, 2013 ; Tobalem et al, 2012 ; Türkaslan et al, 2010 ; Wang et al, 2021a)。一方、皮膚や組織の厚さが異なるマウスでは、金属テンプレートを 90 °C 以上に加熱し、7 秒から 9 秒間皮膚に接触させることが Zone of coagulation の形成に必要とされている (Abdullahi et al, 2014)。本研究では、接触時間の検討を予備実験で行い、その結果に基づいて 3 つの群 (5 秒間接触, 15 秒間接触, 25 秒間接触) を設定した。

Burn wound conversion を模した創傷モデルにおいて最も適切な状態は、Zone of stasis に相当する間隙部で、部分的に壊死が進行しつつも生存組織が一部残存

している状況であると考えた。この状態は、間隙の 50 %から 75 %が壊死している場合に該当するとした。撮影した画像から間隙内の壊死面積の割合を直接算出できることが理想であったが、実際には、テンプレートとの接触により形成された Zone of coagulation と、Zone of stasis 内で Burn wound conversion により壊死に至った領域との境界を厳密に識別することは困難であった。そこで、2つのシルクハット形状の突起の間に存在する壊死していない皮膚の面積と全体の面積から、生存面積の割合を算出する方法を採用した。この手法により、間隙の 50 %から 75 %が壊死しているタイプ B に相当する生存面積割合は 7 %から 14 %であった。

生存面積割合は 3 群間で有意な差を示し、5s 群では 1 例を除いてすべてがタイプ C に分類された。一方、25s 群では全例がタイプ A に該当した。15s 群ではタイプ B が半数以上を占めた。これらの結果から、100 °C に加熱したテンプレートを皮膚に 15 秒間接触させることが、タイプ B に相当する創傷を再現する上で最も適した条件であると結論づけられた。

Burn wound conversion に伴う組織学的変化を観察するため、熱傷創作成 1, 12, 24, 48, 96 時間後の各時点で間隙の Zone of stasis より組織を採取した。壊死性変化を認めた 15s 群と、壊死を認めなかった 5s 群の組織を比較した結果、熱傷創作成 96 時間後の時点で両群間に有意差が認められた評価項目のうち、皮膚付属器の変性および皮下筋層の変性に関しては、より早期の時点からすでに両群間でスコアに有意差があることがわかった。この結果は、これら 2 項目が受傷早期に Burn wound conversion の発生を予測する指標となる可能性を示唆している。

熱傷創作成 168 時間後までの観察により、Burn wound conversion に伴う壊死性変化は 96 時間後までに経時的に進行し、それ以降は進行しないことが明らかとなった。組織学的検討においては、不可逆的变化がさらに早期に生じている可能性が示唆されたことから、Burn wound conversion に対する治療介入はできる限り早期、少なくとも受傷後 12 時間以内に実施すべきであると考えられる。

第二章

Burn wound conversion を模したマウス熱傷モデルにおける

羊膜由来間葉系幹細胞由来物質の影響の検討

緒言

AMSC は胎児を包む卵膜を構成する羊膜から採取される間葉系幹細胞であり、分化・増殖能に優れ、免疫寛容性を有する (Pittenger et al, 1999)。間葉系幹細胞が産生する生理活性物質は、周囲の細胞を刺激／抑制するパラクライン作用により、血管新生や免疫調整、抗炎症、抗線維化作用などをもたらす (Arno et al, 2014 ; Chen et al, 2008 ; Irons et al, 2018)。採取の安全性、豊富な細胞数、高い増殖性などから再生医療における有望な細胞源として注目されている (Alviano et al, 2007 ; In 't Anker et al, 2004)。

間葉系幹細胞は創傷治癒過程において、成長因子やサイトカインを介し、血管新生促進、炎症制御、組織再生促進などに寄与することが報告されている (Takahashi et al, 2021 ; Wu et al, 2007)。

これまでに、さまざまな組織由来の間葉系幹細胞をヒトの熱傷に対して投与する臨床試験が行われてきた (Wang et al, 2021b)。しかし、その安全性や作用機序については、未だ十分に確立されていない。投与方法、投与量、投与時期などの最適化が必要であり、また長期的な安全性についても継続的な評価が求められている。

一方、基礎研究においては、ラットを用いた Comb モデルに対して間葉系幹細胞を投与することで、Burn wound conversion の抑制効果が示されている (Abbas et al, 2019 ; Tutak et al, 2022)。これらの研究では、間葉系幹細胞の投与により、炎症の軽減、酸化ストレスの抑制、血管新生の促進などが確認されており、Zone of stasis における組織の救済に寄与している可能性が示唆されている。しかし、これらの報告の多くはラットを対象としており、また AMSC 由来物質、すなわち培養上清や細胞外小胞 (Extracellular vesicle; EV) の効果については十分に検討されていない。

第一章において、マウスを用いて **Burn wound conversion** を再現可能な新規熱傷モデルを確立した。このモデルでは、100 °C に加熱した金属テンプレートのマウスの側腹部に 15 秒間接触させることで、**Zone of coagulation** と **Zone of stasis** を区別して形成することが可能であり、マウスの体格に適した独自のテンプレートを使用している。このモデルは、**Burn wound conversion** に対する新規治療法の評価に適した実験系であり、**Zone of stasis** に限局した解析が可能である。また、マウスを用いることで、遺伝子改変技術の活用や、豊富な実験試薬の使用が可能となり、より詳細な病態機序の解明が期待される。

本章の目的は、第一章で確立したマウス熱傷モデルを用いて、AMSC 由来物質が **Burn wound conversion** に与える影響を検証することである。さらに、酸化ストレスマーカーおよび関連遺伝子発現の解析を通じて、その分子生物学的基盤を明らかにすることを目的とする。

動物実験計画

本研究は、第一章と同一の動物実験計画「皮膚深達性急性創傷に対する羊膜由来幹細胞の創傷治癒促進作用」（承認番号 23-0005）に基づき、同計画の一研究として行った。

予備実験

1. AMSC の準備

AMSC および培養液は、株式会社カネカ（大阪）により提供された。3 継代目から 4 継代目の細胞を用い、温度 37 °C、酸素濃度 21 %、二酸化炭素濃度 5 % の条件下でサブコンフルエントに達するまで培養した。

2. 投与物質の検討

AMSC 由来物質として、培養上清中に含まれる EV と濃縮した培養上清液の投与を検討した。

3. AMSC-EV の抽出

3 継代目から 4 継代目の AMSC を培養し、サブコンフルエントの状態に達した時点で、AMSC をリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate-buffered saline; PBS）（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）で 2 回洗浄し、残留する血清成分を除去した。その後、EV-Up™ MSC EV 産生用基礎培地, AF と EV-Up™ MSC EV 産生用サプリメント, AF（いずれも富士フィルム和光純薬株式会社、大阪）の混合培地に交換し、同条件下で 48 時間の培養を行った。得られた上清液は、細胞残渣を除去するため 0.2 μm 組織培養フィルターユニット Rapid-Flow, 250 mL, PES（Thermo Fisher Scientific）で濾過した。さらに、得られた上清液を VIVASPIN 20, MWCO 100,000, PES（フナコシ株式会社、東京）を用いて、限外ろ過によって 10 倍から 14 倍に濃縮した。その後、qEV オートフラクションコレクターおよび Gen2 qEV10/35（いずれもメイワフォーシス株式会社、東京）を用いて、2 つの EV 分画を抽出した。得られた 2 つ EV 分画は、ナノ粒子イメージングアナライザー VIDEO DROP（メイワフォーシス株式会社）を用いて、EV 濃度を測定した。

4. マウス熱傷モデルに対する AMSC-EV の影響の検討

ラットの背部潰瘍モデルに対して間葉系幹細胞由来の EV を 2.0×10^8 個を投与した既報（Ferreira et al, 2017 ; Kim et al, 2023）を参考に、得られた 2 つの EV 分画をそれぞれ 1.0×10^9 個/mL, 1.0×10^8 個/mL, 1.0×10^7 個/mL の 3 種類の濃度に希釈した。

実験には ICR マウス（雄，8 週齢，体重 36g から 38 g）を用いた。三共ラボサービス株式会社より 7 週齢で購入し，購入後 1 週間の順化期間を設けた。実験動物は，第一章と同様の方法で飼育した。実験開始前日には，2.0 %イソフルラン-酸素混合ガスによる全身麻酔下で，3 MTM サージカルクリッパー（可動ヘッドタイプ）および除毛クリームを用いて体幹部の除毛を行った。

30 匹のマウスを用いて，マウス熱傷モデルを作製し，無作為に 9 群に分けた。各群は表 2 の通りである。Sham 群には AMSC-EV の代わりに PBS を投与した（図 15）。

表 2：各群の EV 分画，濃度，投与量，回数，時間

群名	分画	濃度（個/mL）	投与量（mL/創）	投与回数	投与時間
Fr2e7-2 群	2	1.0×10^7	0.2	4 回	熱傷創作成直後、12、24、48 時間後
Fr2e8-2 群	2	1.0×10^8	0.2	4 回	熱傷創作成直後、12、24、48 時間後
Fr2e9-2 群	2	1.0×10^9	0.2	4 回	熱傷創作成直後、12、24、48 時間後
Fr2e9-6 群	2	1.0×10^9	0.6	2 回	熱傷創作成直後、12 時間後
Fr3e7-2 群	3	1.0×10^7	0.2	4 回	熱傷創作成直後、12、24、48 時間後
Fr3e8-2 群	3	1.0×10^8	0.2	4 回	熱傷創作成直後、12、24、48 時間後
Fr3e9-2 群	3	1.0×10^9	0.2	4 回	熱傷創作成直後、12、24、48 時間後
Fr3e9-6 群	3	1.0×10^9	0.6	2 回	熱傷創作成直後、12 時間後
Sham 群	-	-	0.2	4 回	熱傷創作成直後、12、24、48 時間後

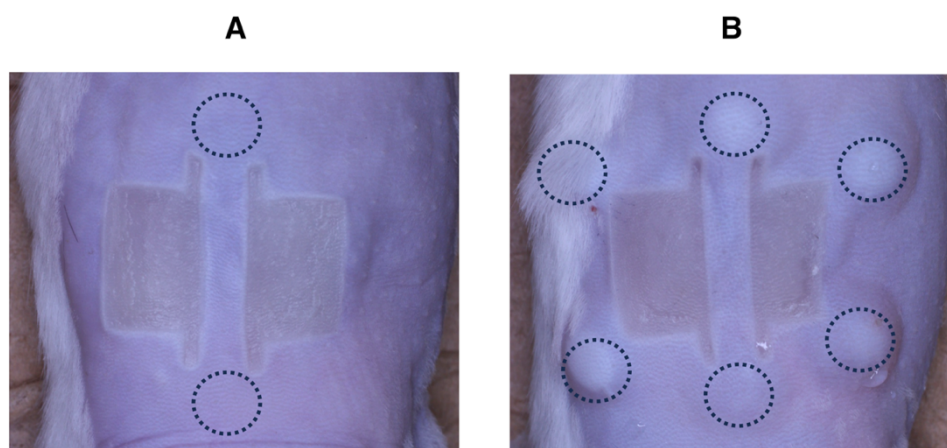


図 15. **A**：0.2 mL/創の投与例。**B**：0.6 mL/創の投与例。いずれも点線円 1 か所あたりに 0.1 mL 投与している。

熱傷創作成 96 時間後に写真撮影を行い，ImageJ を用いて生存面積割合を解析した。熱傷創作成 96 時間後の評価を行う前の時点で 5 匹のマウスが死亡し，またモデル作製時の手技上の問題により 6 つの創が評価から除外された。

各群の生存面積割合は以下の通りであった：Fr2e7-2 群 $6.5 \% \pm 2.0 \%$ ，Fr2e8-2 群 $12.6 \% \pm 2.0 \%$ ，Fr2e9-2 群 $11.1 \% \pm 1.5 \%$ ，Fr2e9-6 群 $8.3 \% \pm 2.4 \%$ ，Fr3e7-2 群 $12.0 \% \pm 1.7 \%$ ，Fr3e8-2 群 $9.3 \% \pm 1.8 \%$ ，Fr3e9-2 群 $9.0 \% \pm 1.7 \%$ ，Fr3e9-6 群 $16.3 \% \pm 1.4 \%$ ，Sham 群 $6.1 \% \pm 2.9 \%$ 。また，比較として第一章で作成した 15s 群を Control 群 $9.6 \% \pm 0.6 \%$ として解析に含めた（図 16）。

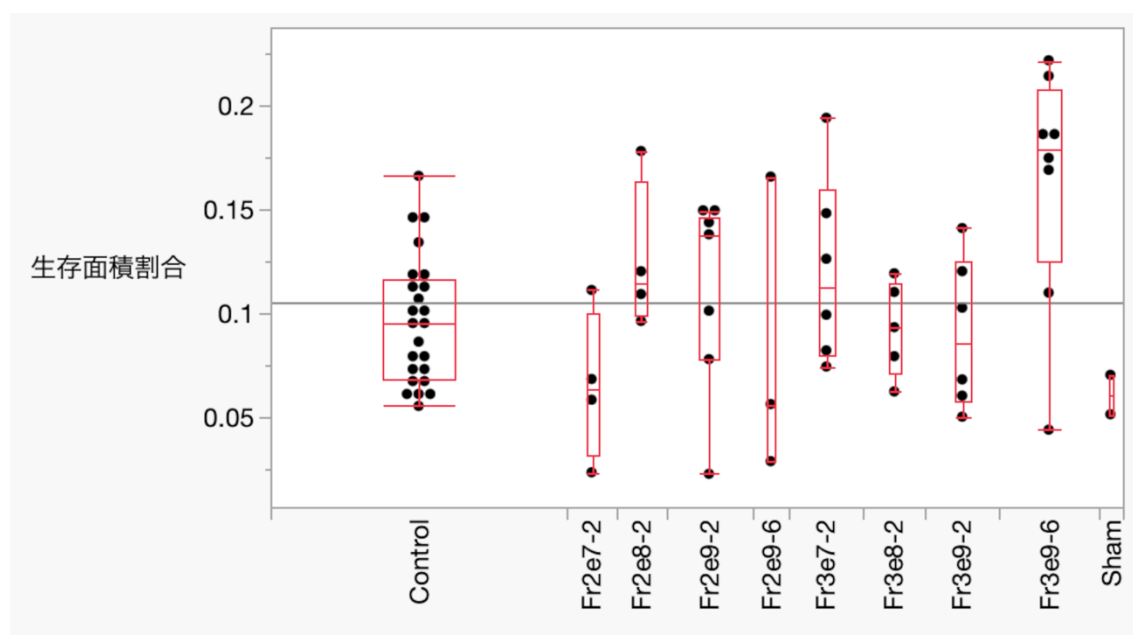


図 16. AMSC-EV 投与各群と生存面積割合の関係。

AMSC-EV 投与により，生存面積割合が増加している群を認めるものの，Control 群と比べて悪化している群も認めた。また，分画や濃度および投与量・投与回数による明らかな傾向は認められなかった。

5. AMSC 培養上清の準備

3 継代目から 4 継代目の AMSC を培養し，サブコンフルエントの状態に達した時点で，AMSC を PBS で 2 回洗浄し，残留する血清成分を除去した。その後，培地を抗生物質無添加の Alpha minimum essential medium (α -MEM) (Thermo Fisher Scientific) に交換し，同条件下で 48 時間の培養を行った。得られた上清液は，細胞残渣を除去するために $0.2 \mu\text{m}$ 組織培養フィルターユニット Rapid-Flow, 250 mL, PES で濾過した (Takahashi et al, 2021)。使用まで直ちに -80°C で保存した。

6. AMSC 培養上清の濃縮

既報では得られた培養上清液を 3 kDa から 10 kDa のろ過膜で限外ろ過することで濃縮させることが報告されている (Amirpour et al, 2019 ; Jha et al, 2021 ; Pokrovskaya et al, 2020 ; Zhang et al, 2021)。成長因子や EV を濃縮することを目的と考え、5 kDa のろ過膜を用いて限外ろ過を行うことにした。

前項で得られた培養上清の一部を VIVASPIN 20, MWCO 5,000, PES (フナコシ株式会社) を用いて 8 倍に濃縮し、使用まで直ちに -80°C で保存した。

7. 投与方法の検討

Comb モデルに対する介入研究では、局所注射での投与が多い (Abbas et al, 2018 ; Eyuboglu et al, 2018 ; Hosni Ahmed et al, 2017)。潰瘍のように傷がある場合は、塗布することも効果的であると考えられる。ラットを用いた創傷研究では静脈内投与も一般的な投与方法であるが、マウスの場合、尾静脈に確実に繰り返し薬剤を投与することは、手技的に困難であると考えられた。腹腔内投与は比較的簡便で、再現性を持って投与が可能な方法であると考えられた (Abd-Allah et al, 2015)。

8. マウス熱傷モデルに対する AMSC 培養上清の影響の検討

31 匹のマウスを用いて、マウス熱傷モデルを作製し、無作為に 8 群に分けた。各群は表 3 の通りである。Sham 群には AMSC 培養上清の代わりに α -MEM を投与した (図 17)。

表 3 : 各群の投与物質, 部位, 量, 時間

群名	投与物質	濃縮	投与部位	投与量	投与時間
CM-wic 群	AMSC 培養上清	-	創近傍皮下	0.5 mL/創	熱傷創作成直後
CM-ip 群	AMSC 培養上清	-	腹腔内	1.0 mL/匹	熱傷創作成直後
CM5-wic 群	AMSC 培養上清	8 倍	創近傍皮下	0.5 mL/創	熱傷創作成直後
CM5-ip 群	AMSC 培養上清	8 倍	腹腔内	1.0 mL/匹	熱傷創作成直後
CM5-iwic 群	AMSC 培養上清	8 倍	創内皮下	0.5 mL/創	熱傷創作成直後
Sham-wic 群	α -MEM	-	創近傍皮下	0.5 mL/創	熱傷創作成直後
Sham-ip 群	α -MEM	-	腹腔内	1.0 mL/匹	熱傷創作成直後
Sham-iwic 群	α -MEM	-	創内皮下	0.5 mL/創	熱傷創作成直後

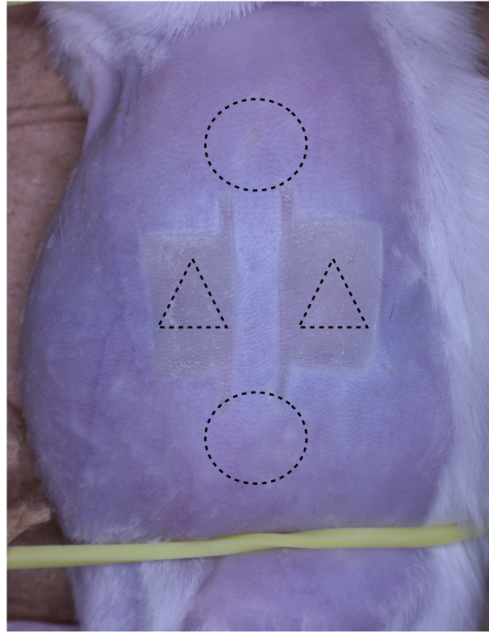


図 17. 点線円は創近傍皮下の注射部位を示す。点線三角は創内皮下の注射部位を示す。いずれも 1 か所あたりに 0.25 mL 投与 (0.5 mL/創)。

熱傷創作成 96 時間後に写真撮影を行い、ImageJ を用いて生存面積割合を解析した。熱傷創作成 96 時間後の評価を行う前の時点で 2 匹のマウスが死亡し、またモデル作製時の手技上の問題により 6 つの創が評価から除外された。

各群の生存面積割合は以下の通りであった：CM-wic 群 $8.1 \% \pm 1.5 \%$ ，CM-ip 群 $9.5 \% \pm 1.5 \%$ ，CM5-wic 群 $12.9 \% \pm 1.0 \%$ ，CM5-ip 群 $14.1 \% \pm 1.0 \%$ ，CM5-iwic 群 $12.7 \% \pm 1.2 \%$ ，Sham-wic 群 $8.1 \% \pm 1.5 \%$ ，Sham-ip 群 $9.0 \% \pm 1.4 \%$ ，Sham-iwic 群 $12.5 \% \pm 2.2 \%$ 。また、比較として第一章で作成した 15s 群を Control 群 $9.6 \% \pm 0.6 \%$ として解析に含めた (図 18)。

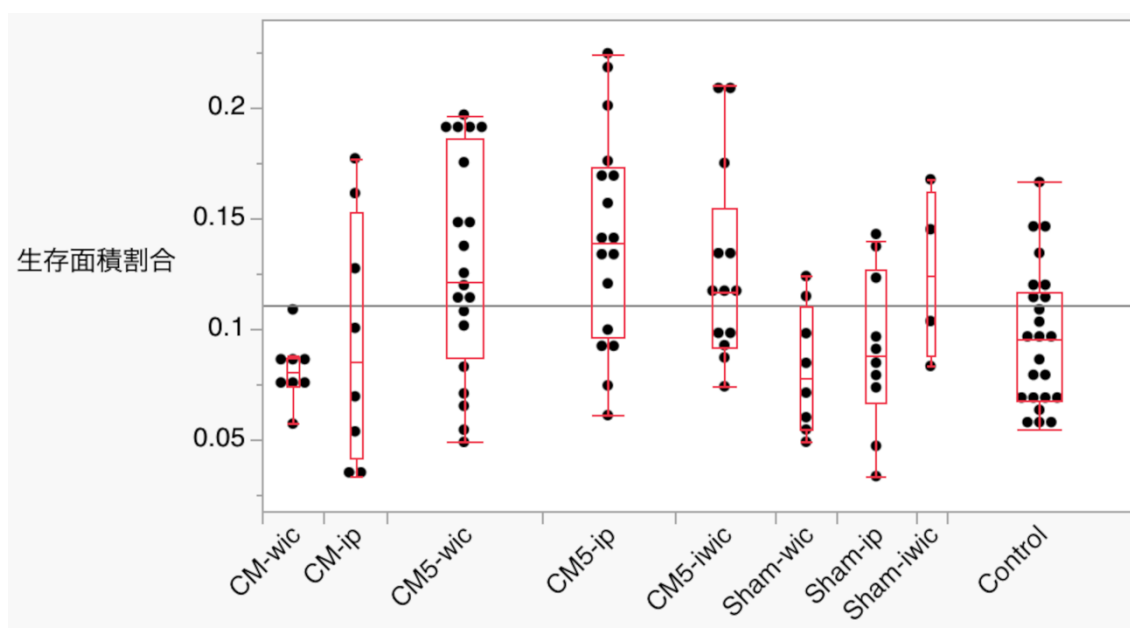


図 18. 各群の熱傷創作成 96 時間後の生存面積割合。

濃縮していない培養上清群と比べて、8 倍に濃縮した群では生存面積割合の平均値が高かった。その中でも、**CM5-ip** 群は四分位範囲が狭く、かつ生存面積割合の平均値が最も高い結果であった。

上記結果より、マウス熱傷モデルに対する AMSC 由来物質投与による **Burn wound conversion** 抑制効果に関しては、8 倍に濃縮した AMSC 培養上清を熱傷創作成直後に 1.0 mL 腹腔内注射することが、最も効果的な介入方法であると示唆された。

本実験

方法

1. AMSC の準備

AMSC および培養液は、株式会社カネカにより提供された。3 継代目から 4 継代目の細胞を用い、温度 37 °C、酸素濃度 21 %、二酸化炭素濃度 5 % の条件下でサブコンフルエントに達するまで培養した。

2. AMSC 由来物質の準備

サブコンフルエントの状態に達した時点で、AMSC を PBS で 2 回洗浄し、残留する血清成分を除去した。その後、培地を抗生物質無添加の α -MEM に交換し、同条件下で 48 時間の培養を行った。得られた上清液は、細胞残渣を除去するために 0.2 μ m 組織培養フィルターユニット Rapid-Flow, 250 mL, PES で濾過した (Takahashi et al, 2021)。さらに、得られた上清液を VIVASPIN 20, MWCO 5,000, PES を用いて、限外ろ過によって 8 倍に濃縮した後、使用まで直ちに -80 °C で保存した。また、比較のために、抗生物質無添加の α -MEM を同様に 0.2 μ m 組織培養フィルターユニット Rapid-Flow, 250 mL, PES で濾過し、直ちに -80 °C で保存した。

3. 実験群とプロトコール

実験には ICR マウス (雄, 8 週齢, 体重 36g から 38 g) を用いた。三共ラボサービス株式会社より 7 週齢で購入し、購入後 1 週間の順化期間を設けた。実験動物は、第一章と同様の方法で飼育した。実験開始前日には、2.0 % イソフルラン-酸素混合ガスによる全身麻酔下で、3 M™ サージカルクリッパー (可動ヘッドタイプ) および除毛クリームを用いて体幹部の除毛を行った。

第一章と同様の方法で、38 匹のマウス熱傷モデルを作製し、CM5-ip 群 ($n = 15$)、Sham-ip 群 ($n = 12$)、Control 群 ($n = 11$) の 3 群に無作為に分けた。また侵襲を与えず同じ環境で飼育を行ったマウスを正常群 ($n = 2$) とした。

前項で準備した AMSC 由来物質と α -MEM を実験の前日に 4 °C の冷蔵庫に移し、緩徐に溶解させておき、投与の 30 分前に常温で復温させた。CM5-ip 群では熱傷創作成直後に、AMSC 由来物質 1 mL を腹腔内に投与した。Sham-ip 群では

熱傷創作成直後に、 α -MEM 1 mL を腹腔内に投与した。

熱傷創作成 48 時間後に、CM5-ip 群より 6 匹、Sham-ip 群より 6 匹、Control 群より 6 匹、正常群より 2 匹ずつ、MDA assay 用にマウスを安楽死させた。熱傷創作成 96 時間後に、第一章同様に写真撮影を行い、ImageJ を用いて生存面積割合を解析した。その後、Ribonucleic Acid (RNA) 単離用に、残ったすべてのマウスを安楽死させた。なお、熱傷創作成 96 時間後に行う生存面積割合の解析には、第一章で作成した 15s 群 (24 の創傷) を Control 群に含めた。

4. MDA assay による組織酸化ストレスレベルの評価

前項で MDA assay のために、熱傷創作成 48 時間後に安楽死させたマウスより、前章の図 5A 同様に創間隙の Zone of stasis から皮膚および皮下組織を採取し、直ちに液体窒素を用いて凍結した後、 -80°C で保存した。凍結保存した組織は、Micro Smash MS-100 (TOMY, 東京) を使用して破砕した後、マロンジアルデヒド測定キット (株式会社 同仁化学研究所, 熊本) とマイクロプレートリーダー SpectraMax Paradigm (モレキュラーデバイスジャパン株式会社, 東京) を用いた吸光度測定を行い、MDA 濃度を測定した。

5. リアルタイム定量 Polymerase chain reaction (PCR) による炎症性サイトカイン、成長因子および細胞死制御関連遺伝子の発現の評価

第3項でRNA抽出のために熱傷創作成96時間後に安楽死させたマウスより、前章の図 5A 同様に創間隙の Zone of stasis から皮膚および皮下組織を採取し、直ちに RNeasy Lysis Solution (Qiagen, Crawley, UK) に浸漬させた。保存した組織は Micro Smash MS-100 を使用して破砕した後、スピンカラム法にて total RNA を抽出した。ゲノム DNA のコンタミネーションを防ぐために Deoxyribonuclease (DNase) 処理を行った。一連の操作に用いた試薬は RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit, RNase-Free DNase Set (いずれも QIAGEN, Hilden, Germany) である。得られた RNA 濃度は分光光度計 (Nano Drop ND-1000; Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

続いて、1 μg の total RNA から逆転写反応により Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を作成した。逆転写酵素として High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) による逆転写反応条件は $37^{\circ}\text{C} \cdot 60$ 分, $95^{\circ}\text{C} \cdot 5$ 分, $4^{\circ}\text{C} \cdot \infty$ とした。

初期熱変性 95 °C・10 分，熱変性 95 °C・15 秒，アニーリング伸長反応 60 °C・1 分 × 40 サイクルのプロトコルでリアルタイム定量 PCR を行った。PCR 装置は StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) を使用した。cDNA 5 µL および Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) 10 µL を含む total 20 µL のリアクションミックスを用い，インターカレーション法により PCR 増幅産物生成量を測定し， $\Delta\Delta CT$ 法により解析した。内在性コントロールとして *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1* (*Hprt1*) を用いた。使用したプライマーを表 4 に示す (全てタカラバイオ株式会社，草津)。

表 4：使用したプライマー一覧

Gene	Accession number	Primer sequences	Product size (base pair)
<i>Il1b</i>	NM_008361.4	MA218637-F: CCAGGATGAGGACATGAGCAC MA218637-R: TGTTGTTTCATCTCGGAGCCTGTA	144
<i>Il6</i>	NM_031168.2	MA225139-F: GTCGGAGGCTTAATTACACATGTTC MA225139-R: GCAAGTGCATCATCGTTGTTC	101
<i>Il10</i>	NM_010548.2	MA273475-F: GCCTTCAGCCAGGTGAAGAC MA273475-R: GGGCATCACTTCTACCAGGTAA	150
<i>Vegfa</i>	NM_001110267.1	MA259034-F: CGAGGCAGCTTGAGTTAAACGA MA259034-R: CGTGGTGGTGACATGGTTAATC	141
<i>Hmgb1</i>	NM_010439.4	MA224232-F: GGAACAACACTGCAGCAGATGA MA224232-R: CCTTTAGCTCTGTAGGCAGCAATA	151
<i>Bcl2</i>	NM_009741.5	MA027977-F: TCGCCCTGTGGATGACTGAG MA027977-R: AGGCTGAGCAGGGTCTTCAGAG	151
<i>Hprt1</i>	NM_013556.2	MA031262-F: TTGTTGTTGGATATGCCCTTGACTA MA031262-R: AGGCAGATGGCCACAGGACTA	189

6. 統計学的解析

すべてのデータは平均値 ± 標準誤差で示した。2 群間の比較には Student の t 検定を用い，3 群以上の比較には一元配置分散分析を行い，その後 Tukey-Kramer 法による多重比較検定を施した。すべての統計解析は JMP version 17.0 を用いて実施し， $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

1. 実験動物の使用状況と解析対象の概要

40 匹のマウスのうち 18 匹は、熱傷創作成 48 時間後の評価時点で MDA assay のために安楽死させた。熱傷創作成 96 時間後の評価時点で、Control 群の 1 匹については、実験開始時と比較して 20 %以上の体重減少を認めたため安楽死させ、生存面積割合の評価および RNA 単離検体から除外した。熱傷創作成中の手技上の問題により除外したマウスはいなかった。よって 19 匹のマウスから得られた 38 の創傷における生存面積割合を、熱傷創作成 96 時間後に評価した。

2. 生存面積割合

熱傷創作成 96 時間後に ImageJ を用いて解析した生存面積割合は、CM5-ip 群で $17.5 \% \pm 0.8 \%$ 、Sham-ip 群で $8.5 \% \pm 1.0 \%$ 、Control 群で $9.9 \% \pm 0.6 \%$ であった。生存面積割合に関する Tukey-Kramer 法の結果、CM5-ip 群と Sham-ip 群の間および CM5-ip 群と Control 群の間で両側 $p < 0.001$ の有意差が認められた (図 19)。

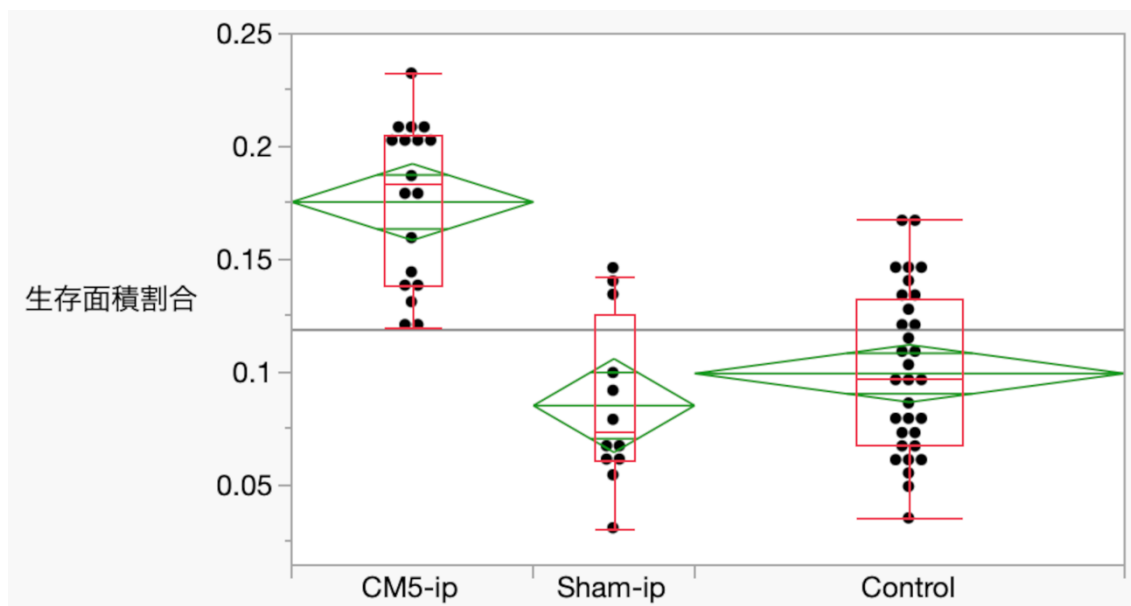


図 19. 各群の熱傷創作成 96 時間後の生存面積割合。

3. MDA assay

熱傷創作成 48 時間後に行った MDA assay において、MDA 濃度は CM5-ip 群で $7.0 \pm 2.9 \mu\text{mol/L}$ 、Sham-ip 群で $7.8 \pm 2.5 \mu\text{mol/L}$ 、Control 群で $10.0 \pm 2.5 \mu\text{mol/L}$ 、正常群で $3.9 \pm 2.9 \mu\text{mol/L}$ であった。Tukey-Kramer 法の結果、いずれの群間にも有意差は認められなかった (図 20)。なお CM5-ip 群のうち 1 検体、正常群のうち 1 検体は計測エラーとなったため、解析から除外した。

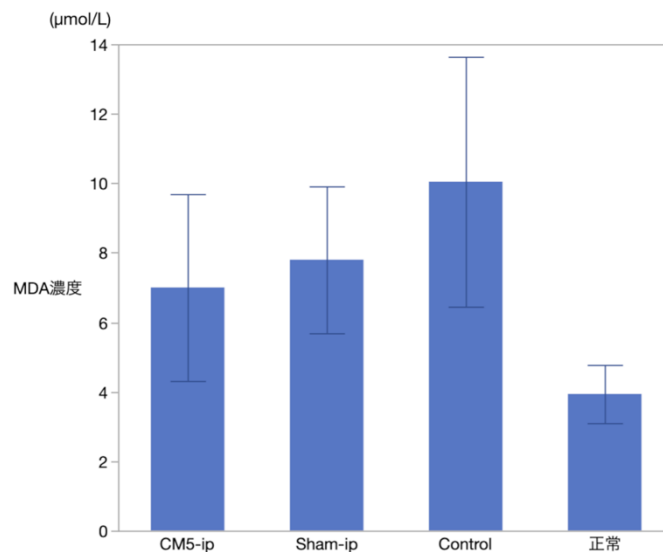


図 20. 各群の熱傷創作成 48 時間後の MDA 濃度。

4. リアルタイム定量 PCR

熱傷創作成 96 時間後に行ったリアルタイム定量 PCR において messenger RNA (mRNA) の発現は以下の通りであった。*Il1b*: Control 群 (介入なし); 1.00, Sham-ip 群 (α -MEM を 1 mL 腹腔内投与); 0.06, CM5-ip 群 (8 倍に濃縮した AMSC 由来物質を 1 mL 腹腔内投与); 0.23。 *Il6*: Control 群; 1.00, Sham-ip 群; 0.04, CM5-ip 群; 0.90。 *Il10*: Control 群; 1.00, Sham-ip 群; 0.09, CM5-ip 群; 0.05。 *Vegfa*: Control 群; 1.00, Sham-ip 群; 0.63, CM5-ip 群; 0.47。 *Hmgbl*: Control 群; 1.00, Sham-ip 群; 0.01, CM5-ip 群; < 0.01 。 *Bcl2*: Control 群; 1.00, Sham-ip 群; 0.02, CM5-ip 群; < 0.01 。

なお採取した 38 つの検体から total RNA の抽出を試みたが、total RNA が検出されたのは Control 群から 1 つ、Sham-ip 群から 1 つ、CM5-ip 群から 2 つのみであった。また total RNA が検出された CM5-ip 群の検体のうち 1 つは、リアルタイム定量 PCR において、上記 mRNA の発現が認められなかったため、解析から除外した。

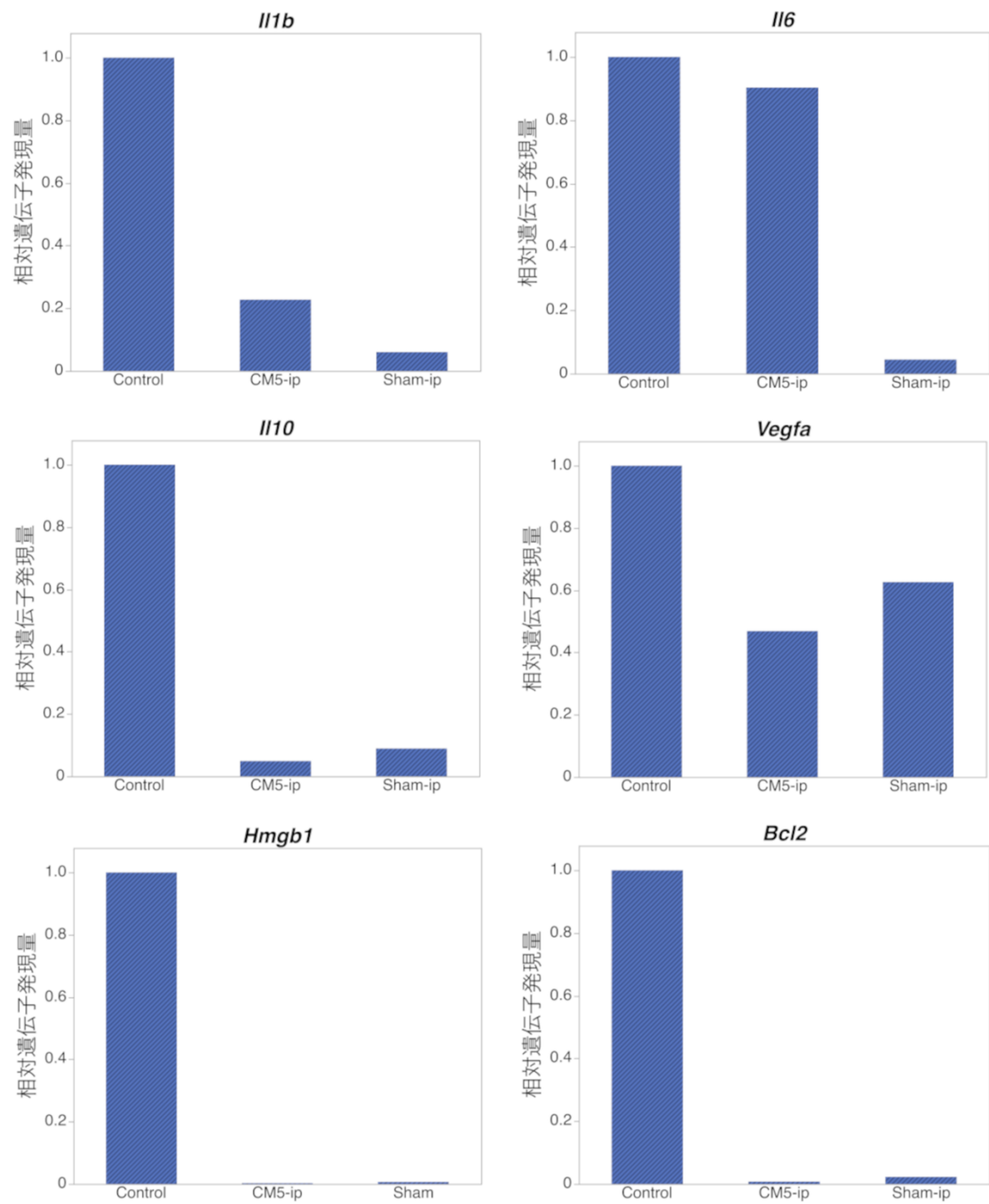


図 21. 各群の熱傷創作成 96 時間後の Zone of stasis における *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Vegfa*, *Hmgb1*, *Bcl2* のリアルタイム定量 PCR 結果。各グラフの縦軸は相対遺伝子発現量を表し、各群を横軸に並べた。

考察

本研究では、Burn wound conversion を模した新しいマウス熱傷モデルにおいて、AMSC 由来物質の治療効果を検討した。予備実験を通じて投与方法を最適化し、本実験において 8 倍に濃縮した AMSC 培養上清の腹腔内投与が、熱傷創作成 96 時間後の生存面積割合を改善することを明らかにした。

CM5-ip 群では生存面積割合が $17.5 \% \pm 0.8 \%$ となり、Sham-ip 群 ($8.5 \% \pm 1.0 \%$) および Control 群 ($9.9 \% \pm 0.6 \%$) と比較して統計学的に有意な改善を示した ($p < 0.001$)。この結果は、AMSC 由来物質が Zone of stasis における Burn wound conversion を効果的に抑制したことを示している。

予備実験において、EV 投与と培養上清投与の両方を検討した結果、培養上清の方が安定した Burn wound conversion 抑制効果を示すことが明らかとなった。これは、EV が単一の細胞外小胞画分であるのに対し、培養上清には EV 以外に多様な生理活性物質が含まれているためと考えられる。間葉系幹細胞は、VEGF, bFGF, PDGF 等の成長因子や抗炎症性サイトカインを分泌することが知られており、これらの複合的な作用が治療効果に寄与していると推察される。また、8 倍濃縮により治療効果が向上したことから、有効成分の濃度依存性が示唆される。腹腔内投与が最も効果的であったことについては、全身循環を介した組織への物質送達により、創傷部位への効率的な有効成分の到達が可能となったためと考えられる。

MDA assay の結果、CM5-ip 群では $7.0 \pm 2.9 \mu\text{mol/L}$ となり、Control 群 ($10.0 \pm 2.5 \mu\text{mol/L}$) と比較して数値的な改善傾向を示したものの、統計学的有意差は認められなかった。この結果については、AMSC 由来物質が軽度の抗酸化作用を有する可能性を示唆するものの、サンプルサイズの制限による統計学的検定力の不足も考慮する必要がある。本研究の MDA assay では、測定時のエラーにより CM5-ip 群から 1 検体、正常群から 1 検体を解析から除外せざるを得なかった。その結果、各群のサンプルサイズが小さくなり、統計学的検定力が低下した可能性がある。また、予算的制約により追加実験を実施できなかったことも、この問題を解決できなかった要因である。したがって、抗酸化作用に関する評価は限定的であり、より大規模な検討が必要である。間葉系幹細胞由来物質の抗酸化作用については、過去の研究においても報告されている (Abbas et al, 2018 ; Abbas et al, 2019 ; Tutak et al, 2022) が、その効果は他の作用機序と比較して限定的である可能性が高い。本研究においても、生存面積割合の顕

著な改善に対して、MDA 濃度の変化が軽微であったことから、抗酸化作用以外の機序が主要な治療効果に寄与していると推察される。

リアルタイム定量 PCR による遺伝子発現解析においては、重大な技術的問題が発生した。38 検体から total RNA の抽出を試みたが、最終的に解析可能であったのは Control 群、Sham-ip 群、CM5-ip 群から各 1 検体のみであった。この結果は極めて深刻な問題であり、統計学的検討は不可能であった。この問題の主な原因として、熱傷創組織に特有の性状が考えられる。実際、正常皮膚検体からの total RNA 抽出は問題なく行われており（非公開データ）、熱傷による組織変性、炎症反応に伴う RNA 分解酵素の活性化、組織の壊死や線維化などが、RNA 抽出を困難にしていた可能性がある。特に、熱傷創作成 96 時間後という時点では炎症反応が強く、RNA の分解が進行していたと推察される。さらに、得られた少数の検体においても、多くの遺伝子で極端に低い発現値が認められた。これらの発現データが実際の生理学的状態を反映しているか、あるいは RNA の品質低下や測定誤差に起因する技術的問題であるかの判断は困難である。したがって、今回得られたリアルタイム定量 PCR 結果から治療効果に関する生物学的な結論を導出することは適切ではないと考えられる。なお、ラットを用いた Comb モデルにおいては、Zone of stasis における組織内タンパク質や遺伝子発現に関する検討は報告されている（Abbas et al, 2018 ; Hosni Ahmed et al, 2017）が、RNA 抽出における技術的困難について言及した報告は、調査の限りでは確認できなかった。

これらの問題の解決には、RNA 抽出方法の改良、より早期の時点での検体採取、組織保存方法の最適化などが必要であると考えられるが、予算的制約によりタンパク質での評価や追加実験を実施することはできなかった。

結論

【本研究から得られた新知見】

- Burn wound conversion の研究に適した新たなマウスモデルを確立した。
- 100 °C に加熱した金属テンプレートをマウスの側腹部に 15 秒間接触させることで、効率的かつ高い再現性で Burn wound conversion を模倣した創傷を作成することができた。
- Zone of stasis において熱傷早期に皮膚付属器および皮下筋層に変性が認められた場合、後に Burn wound conversion が生じる可能性が高いことが示唆された。
- 新しいマウス熱傷モデルにおいて、8 倍に濃縮した AMSC 培養上清の腹腔内投与により、熱傷創作成 96 時間後の生存面積割合が有意に改善することを明らかにした。
- また、AMSC-EV よりも AMSC 培養上清の方が、多様な生理活性物質の複合的作用により安定した治療効果を示すことが判明した。

【新知見の意義】

Burn wound conversion の病態生理を解明するために、これまで数多くの基礎研究が行われてきた。本研究で確立した新たなマウス熱傷モデルを用いることで、従来よりも多角的なアプローチが可能となり、Burn wound conversion の病態生理に関する理解が一層深まることが期待される。

さらに、Zone of stasis の経時的変化を観察することで、Burn wound conversion が生じる過程における組織学的変化を明らかにすることができた。特に、Zone of stasis において受傷早期の時点で皮膚付属器および皮下筋層に変性を認めた場合、後に壊死性変化が生じる可能性が高いという所見は、Burn wound conversion に対する早期介入の必要性および早期診断の可能性を示唆する重要な知見である。

濃縮した AMSC 培養上清の腹腔内投与が、Burn wound conversion に対して有効な全身治療となり得ることを示唆した。重篤な熱傷における Burn wound conversion の抑制という臨床的に重要な課題に対する新たな治療戦略の可能性を提示した。

【今後の展開】

Burn wound conversion の抑制効果を示すさまざまな薬剤に関する研究報告はあるものの、病態生理が複雑であるため、根本的な原因の解明や確立された治療法には未だ至っていない。本研究で確立した新たな熱傷モデルを活用することで、今後はマウスを用いた再現性の高い基礎研究が可能となる。マウスを用いることで、他の動物種と比べて遺伝子改変技術の適用が容易であるため、Burn wound conversion の分子生物学的機序の解明がさらに進展することが期待される。

また、AMSC 培養上清を用いた熱傷治療の臨床応用に向けたエビデンスの構築が期待される。

【今後の課題】

MDA assay およびリアルタイム定量 PCR における技術的問題の解決、特に熱傷組織からの RNA 抽出方法の改良と統計学的検定力を確保するための適切なサンプルサイズでの追加検証が必要である。

また、ラットを用いた既存の研究において Burn wound conversion の抑制に有効とされた薬剤が、マウスを用いた本モデルにおいても同様の効果を示すかどうかを検証する必要がある。その上で、標的と考えられる分子生物学的機序に着目し、該当遺伝子をノックアウトしたマウスを用いることで、病態生理の詳細な解明および薬剤の作用機序の理解が進むことが期待される。さらに、これらの知見を基に、安全性を十分に考慮した上で、将来的な臨床応用につなげていくことが求められる。

謝辞

本研究は、JSPS 科研費 22K16993 の助成を受けたものである。

本研究の全てに亘ってご指導，ご協力，ご援助いただいた北海道大学 山本有平 名誉教授ならびに大学院医学研究院 機能再生医学講座 形成外科学教室員の皆様，北海道大学大学院薬学研究院 分子細胞医薬学 大西俊介 教授ならびに大久保直登 先生に深く深謝申し上げます。

また，動物実験において施設の管理やマウスの飼育を行っていただいた北海道大学 大学院医学研究院 附属動物実験施設職員の皆様に深く感謝申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Abbas OL, Özatik O, Gönen ZB, Öğüt S, Entok E, Özatik FY, Bahar D, Bakir ZB and Musmul A (2018) Prevention of burn wound progression by mesenchymal stem cell transplantation: deeper insights into underlying mechanisms. *Ann Plast Surg* 81, 715-724.
- Abbas OL, Özatik O, Gönen ZB, Öğüt S, Özatik FY, Salkın H and Musmul A (2019) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and dental pulp as sources of cell therapy for zone of stasis burns. *J Invest Surg* 32, 477-490.
- Abd-Allah SH, El-Shal AS, Shalaby SM, Abd-Elbary E, Mazen NF and Abdel Kader RR (2015) The role of placenta-derived mesenchymal stem cells in healing of induced full-thickness skin wound in a mouse model. *IUBMB Life* 67, 701-709.
- Abdullahi A, Amini-Nik S and Jeschke MG (2014) Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci* 71, 3241-3255.
- Adediran SG, Dauplaise DJ, Kasten KR, Tschöp J, Dattilo J, Goetzman HS, England LG, Cave CM, Robinson CT and Caldwell CC (2010) Early infection during burn-induced inflammatory response results in increased mortality and p38-mediated neutrophil dysfunction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299, R918-925.
- Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, et al (2007) Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol* 7, 11.
- Amirpour N, Amirizade S, Hashemibeni B, Kazemi M, Hadian M and Salehi H (2019) Differentiation of eye field neuroectoderm from human adipose-derived stem cells by using small-molecules and hADSC-conditioned medium. *Ann Anat* 221, 17-26.
- Arno AI, Amini-Nik S, Blit PH, Al-Shehab M, Belo C, Herer E, Tien CH and Jeschke MG (2014) Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem Cell Res Ther* 5, 28.
- Beffa DC, Fischman AJ, Fagan SP, Hamrahi VF, Paul KW, Kaneki M, Yu YM, Tompkins RG and Carter EA (2011) Simvastatin treatment improves survival in a murine model of burn sepsis: Role of interleukin 6. *Burns* 37, 222-226.

Begieneman MP, Kubat B, Ulrich MM, Hahn NE, Stumpf-Stolker Y, Tempelaars M, Middelkoop E, Zeerleder S, Wouters D, van Ham MS, et al (2012) Prolonged C1 inhibitor administration improves local healing of burn wounds and reduces myocardial inflammation in a rat burn wound model. *J Burn Care Res* 33, 544-551.

Bohannon JK, Cui W and Toliver-Kinsky T (2009) Endogenous Fms-like tyrosine kinase-3 ligand levels are not altered in mice after a severe burn and infection. *BMC Immunol* 10, 47.

Bohr S, Patel SJ, Sarin D, Irimia D, Yarmush ML and Berthiaume F (2013) Resolvin D2 prevents secondary thrombosis and necrosis in a mouse burn wound model. *Wound Repair Regen* 21, 35-43.

Chen L, Tredget EE, Wu PY and Wu Y (2008) Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3, e1886.

Chen Y, Zhang X, Liu Z, Yang J, Chen C, Wang J, Yang Z, He L, Xu P, Hu X, et al (2021) Obstruction of the formation of granulation tissue leads to delayed wound healing after scald burn injury in mice. *Burns Trauma* 9, tkab004.

Choi J, Kim R, Kim J, Jeong W, Park SW, Lee HW and Chung HY (2018) Nicorandil reduces burn wound progression by enhancing skin blood flow. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 71, 1196-1206.

Cribbs RK, Luquette MH and Besner GE (1998) A standardized model of partial thickness scald burns in mice. *J Surg Res* 80, 69-74.

El Ayadi A, Salsbury JR, Enkhbaatar P, Herndon DN and Ansari NH (2021) Metal chelation attenuates oxidative stress, inflammation, and vertical burn progression in a porcine brass comb burn model. *Redox Biol* 45, 102034.

Eski M, Ozer F, Firat C, Alhan D, Arslan N, Senturk T and Işık S (2012) Cerium nitrate treatment prevents progressive tissue necrosis in the zone of stasis following burn. *Burns* 38, 283-289.

Eyuboglu AA, Uysal CA, Ozgun G, Coskun E, Markal Ertas N and Haberal M (2018) The effect of adipose derived stromal vascular fraction on stasis zone in an experimental burn model. *Burns* 44, 386-396.

Fan J, Meng Q, Guo G, Xie Y, Li X, Xiu Y, Li T and Ma L (2010) Effects of early enteral nutrition supplemented with arginine on intestinal mucosal immunity in severely burned mice. *Clin Nutr* 29, 124-130.

Fan J, Meng Q, Guo G, Xie Y, Xiu Y, Li T, Feng W and Ma L (2009a) Effects of enteral nutrition supplemented with glutamine on intestinal mucosal immunity in burned mice. *Nutrition* 25, 233-239.

Fan J, Xie Y, Li X, Guo G, Meng Q, Xiu Y, Li T, Feng W and Ma L (2009b) The influence of Peyer's patch apoptosis on intestinal mucosal immunity in burned mice. *Burns* 35, 687-694.

Fang Q, Guo S, Zhou H, Han R, Wu P and Han C (2017) Astaxanthin protects against early burn-wound progression in rats by attenuating oxidative stress-induced inflammation and mitochondria-related apoptosis. *Sci Rep* 7, 41440.

Ferreira ADF, Cunha PDS, Carregal VM, da Silva PC, de Miranda MC, Kunrath-Lima M, de Melo MIA, Faraco CCF, Barbosa JL, Frezard F, et al (2017) Extracellular vesicles from adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells accelerate migration and activate AKT pathway in human keratinocytes and fibroblasts independently of miR-205 activity. *Stem Cells Int* 2017, 9841035.

Finnerty CC, Przkora R, Herndon DN and Jeschke MG (2009) Cytokine expression profile over time in burned mice. *Cytokine* 45, 20-25.

Fourman MS, Phillips BT, Crawford L, McClain SA, Lin F, Thode HC, Jr., Dagum AB, Singer AJ and Clark RA (2014) Indocyanine green dye angiography accurately predicts survival in the zone of ischemia in a burn comb model. *Burns* 40, 940-946.

Hosni Ahmed H, Rashed LA, Mahfouz S, Elsayed Hussein R, Alkaffas M, Mostafa S and Abusree A (2017) Can mesenchymal stem cells pretreated with platelet-rich plasma modulate tissue remodeling in a rat with burned skin? *Biochem Cell Biol* 95, 537-548.

Howell K, Posluszny J, He LK, Szilagyi A, Halerz J, Gamelli RL, Shankar R and Muthu K (2012) High MafB expression following burn augments monocyte commitment and inhibits DC differentiation in hemopoietic progenitors. *J Leukoc Biol* 91, 69-81.

Huber NL, Bailey SR, Schuster R, Ogle CK, Lentsch AB and Pritts TA (2012) Prior thermal injury accelerates endotoxin-induced inflammatory cytokine production and

intestinal nuclear factor- κ B activation in mice. *J Burn Care Res* 33, 279-285.

In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE and Kanhai HH (2004) Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 22, 1338-1345.

Inoue Y, Liu YM, Otawara M, Chico Calero I, Stephanie Nam A, Yu YM, Chang P, Butler KL, Nazarian RM, Goverman J, et al (2018) Resolvin D2 limits secondary tissue necrosis after burn wounds in rats. *J Burn Care Res* 39, 423-432.

Irons RF, Cahill KW, Rattigan DA, Marcotte JH, Fromer MW, Chang S, Zhang P, Behling EM, Behling KC and Caputo FJ (2018) Acceleration of diabetic wound healing with adipose-derived stem cells, endothelial-differentiated stem cells, and topical conditioned medium therapy in a swine model. *J Vasc Surg* 68, 115s-125s.

Jackson DM (1953) The diagnosis of the depth of burning. *Br J Surg* 40, 588-596.

Jha KA, Gentry J, Del Mar NA, Reiner A, Sohl N and Gangaraju R (2021) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell concentrated conditioned medium alters the expression pattern of glutamate regulatory proteins and aquaporin-4 in the retina after mild traumatic brain Injury. *J Neurotrauma* 38, 1702-1716.

Jiang Z, Wu J, Qiu Y and Shen G (2023) Perfusion analysis using high-definition indocyanine green angiography in burn comb model. *J Burn Care Res*, 373-383.

Kim J, Kim EH, Lee H, Sung JH and Bang OY (2023) Clinical-scale mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle therapy for wound healing. *Int J Mol Sci* 24, 4273.

Lee Y, Ricky S, Lim TH, Kim H, Lee EJ, Song Y, Lee S and Jang Y (2023) An atmospheric plasma jet induces expression of wound healing genes in progressive burn wounds in a comb burn rat model: A pilot study. *J Burn Care Res* 44, 685-692.

Liu QY, Yao YM, Zhang SW, Yan YH and Wu X (2011) Naturally existing CD11c^{low} CD45RB^{high} dendritic cells protect mice from acute severe inflammatory response induced by thermal injury. *Immunobiology* 216, 47-53.

Lu M, Zhao J, Wang X, Zhang J, Shan F and Jiang D (2022) Research advances in prevention and treatment of burn wound deepening in early stage. *Front Surg* 9, 1015411.

Macri LK, Singer AJ, Taira BR, McClain SA, Rosenberg L and Clark RA (2013)

Immediate burn excision fails to reduce injury progression. *J Burn Care Res* 34, e153-160.

Mieczkowski M, Mrozikiewicz-Rakowska B, Kowara M, Kleibert M and Czupryniak L (2022) The problem of wound healing in diabetes-from molecular pathways to the design of an animal model. *Int J Mol Sci* 23, 7930.

Muthu K, He LK, Szilagyi A, Stevenson J, Gamelli RL and Shankar R (2009) Propranolol restores the tumor necrosis factor- α response of circulating inflammatory monocytes and granulocytes after burn injury and sepsis. *J Burn Care Res* 30, 8-18.

Nakae H and Wada H (2002) Characteristics of burn patients transported by ambulance to treatment facilities in Akita Prefecture, Japan. *Burns* 28, 73-79.

Nakasone A, Shibata S, Suzuki S, Yamashita Y and Ohyama K (2007) Laser burn wound healing in naso-labial region of fetal and neonatal mice. *Oral Dis* 13, 45-50.

Naldaiz-Gastesi N, Bahri OA, López de Munain A, McCullagh KJA and Izeta A (2018) The panniculus carnosus muscle: an evolutionary enigma at the intersection of distinct research fields. *J Anat* 233, 275-288.

Öksüz S, Ülkür E, Öncül O, Köse GT, Küçükodac Z and Urhan M (2013) The effect of subcutaneous mesenchymal stem cell injection on statis zone and apoptosis in an experimental burn model. *Plast Reconstr Surg* 131, 463-471.

Palackic A, Jay JW, Duggan RP, Branski LK, Wolf SE, Ansari N and El Ayadi A (2022) Therapeutic strategies to reduce burn wound conversion. *Medicina (Kaunas)* 58, 922.

Palmer JL, Deburghgraeve CR, Bird MD, Hauer-Jensen M and Kovacs EJ (2011) Development of a combined radiation and burn injury model. *J Burn Care Res* 32, 317-323.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

Plackett TP, Gamelli RL and Kovacs EJ (2010) Gender-based differences in cytokine production after burn injury: a role of interleukin-6. *J Am Coll Surg* 210, 73-78.

Pokrovskaya LA, Nadezhdin SV, Zubareva EV, Burda YE and Gnezdyukova ES (2020)

Expression of RUNX2 and osterix in rat mesenchymal stem cells during culturing in osteogenic-conditioned medium. *Bull Exp Biol Med* 169, 571-575.

Posluszny JA, Jr., Muthumalaiappan K, Kini AR, Szilagyi A, He LK, Li Y, Gamelli RL and Shankar R (2011) Burn injury dampens erythroid cell production through reprioritizing bone marrow hematopoietic response. *J Trauma* 71, 1288-1296.

Reddy AS, Abraham A, McClain SA, Clark RA, Ralen P, Sandoval S and Singer AJ (2015) The role of necroptosis in burn injury progression in a rat comb burn model. *Acad Emerg Med* 22, 1181-1186.

Regas FC and Ehrlich HP (1992) Elucidating the vascular response to burns with a new rat model. *J Trauma* 32, 557-563.

Rosique MJ, Rosique RG, Faria FM, Oliveira CC, Farina JA, Jr. and Évora PRB (2017) Methylene blue reduces progression of burn and increases skin survival in an experimental rat model. *Burns* 43, 1702-1708.

Salibian AA, Rosario ATD, Severo LAM, Nguyen L, Banyard DA, Toranto JD, Evans GRD and Widgerow AD (2016) Current concepts on burn wound conversion-A review of recent advances in understanding the secondary progressions of burns. *Burns* 42, 1025-1035.

Shalom A, Kramer E and Westreich M (2011) Protective effect of human recombinant copper-zinc superoxide dismutase on zone of stasis survival in burns in rats. *Ann Plast Surg* 66, 607-609.

Singer AJ, McClain SA, Taira BR, Rooney J, Steinhauft N and Rosenberg L (2010) Rapid and selective enzymatic debridement of porcine comb burns with bromelain-derived Debrase: acute-phase preservation of noninjured tissue and zone of stasis. *J Burn Care Res* 31, 304-309.

Singer AJ, Taira BR, Lin F, Lim T, Anderson R, McClain SA and Clark RA (2011) Curcumin reduces injury progression in a rat comb burn model. *J Burn Care Res* 32, 135-142.

Singer AJ, Towery H and McClain SA (2018) Effect of tadalafil on reduction of necrosis in the ischemic zone in a rat comb burn model. *Burns* 44, 1427-1432.

Singer AJ, Zhang N and Baer E (2020) Comparison of a topical surfactant and a topical antibiotic in the rat comb burn model. *Burns* 46, 1674-1680.

Singer DD, Singer AJ, Gordon C and Brink P (2013) The effects of rat mesenchymal stem cells on injury progression in a rat model. *Acad Emerg Med* 20, 398-402.

Singh V, Devgan L, Bhat S and Milner SM (2007) The pathogenesis of burn wound conversion. *Ann Plast Surg* 59, 109-115.

Smith RD, Jr., Carney BC, Garg G, Monger KW, Prinzeze NJ, Shupp JW and Moffatt LT (2021) Modeling burn progression using comb burns: The impact of thermal contact duration on model outcomes. *J Surg Res* 260, 155-162.

Song J, Finnerty CC, Herndon DN, Boehning D and Jeschke MG (2009) Severe burn-induced endoplasmic reticulum stress and hepatic damage in mice. *Mol Med* 15, 316-320.

Song J, Wolf SE, Herndon DN, Wu XW and Jeschke MG (2008) Second hit post burn increased proximal gut mucosa epithelial cells damage. *Shock* 30, 184-188.

Takahashi H, Ohnishi S, Yamamoto Y, Hayashi T, Murao N, Osawa M, Maeda T, Ishikawa K, Sakamoto N and Funayama E (2021) Topical application of conditioned medium from hypoxically cultured amnion-derived mesenchymal stem cells promotes wound healing in diabetic mice. *Plast Reconstr Surg* 147, 1342-1352.

Tobalem M, Harder Y, Rezaeian F and Wettstein R (2013) Secondary burn progression decreased by erythropoietin. *Crit Care Med* 41, 963-971.

Tobalem M, Harder Y, Schuster T, Rezaeian F and Wettstein R (2012) Erythropoietin in the prevention of experimental burn progression. *Br J Surg* 99, 1295-1303.

Tobalem M, Wettstein R, Tschanz E, Plock J, Lindenblatt N, Harder Y and Rezaeian F (2020) The burn comb model revisited. *Burns* 46, 675-681.

Türkaskan T, Yogan N, Cimşit M, Solakoglu S, Ozdemir C and Ozsoy Z (2010) Is HBOT treatment effective in recovering zone of stasis? An experimental immunohistochemical study. *Burns* 36, 539-544.

Tutak FN, Doğan F and Annaç E (2022) The effect of mesenchymal stem cell lyophilizate on the recovery of the zone of stasis following thermal burns. *Burns* 48, 1221-1229.

Wang J, Wang CZ, Salsbury JR, Zhang J, Enkhbaatar P, Herndon DN, El Ayadi A and Ansari NH (2021a) Thermal injury induces early blood vessel occlusion in a porcine model of brass comb burn. *Sci Rep* 11, 12457.

Wang M, Xu X, Lei X, Tan J and Xie H (2021b) Mesenchymal stem cell-based therapy for burn wound healing. *Burns Trauma* 9, tkab002.

Wardhana A, Basuki A, Aurora L and Marsigit J (2020) Comprehensive perception of burn conversion: a literature review. *Ann Burns Fire Disasters* 33, 89-96.

White-Dzuro CG, Burns B, Pollins A, Rector JA, Assi PE, Thomas HC, Jackson K, Perdakis G, Al Kassis S, Bellan LM, et al (2022) Successful prevention of secondary burn progression using infliximab hydrogel: A murine model. *Burns* 48, 896-901.

Wu Y, Chen L, Scott PG and Tredget EE (2007) Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 25, 2648-2659.

Zhang C, Wang T, Zhang L, Chen P, Tang S, Chen A, Li M, Peng G, Gao H, Weng H, et al (2021) Combination of lyophilized adipose-derived stem cell concentrated conditioned medium and polysaccharide hydrogel in the inhibition of hypertrophic scarring. *Stem Cell Res Ther* 12, 23.

Zhang QH, Li JC, Dong N, Tang LM, Zhu XM, Sheng ZY and Yao YM (2013) Burn injury induces gelsolin expression and cleavage in the brain of mice. *Neuroscience* 228, 60-72.