

platelet-derived growth factor (PDGF) generates robust force in restrained matrices [Kolodney and Elson, 1993], whereas both LPA and PDGF stimulate floating matrix contraction (FMC) equally [Grinnell et al., 1999; Shreiber et al., 2001]. FMC has exhibited something of an enigma since LPA stimulation of fibroblasts in floating matrices causes activation of the small G protein Rho (GTP loading) [Grinnell et al., 2003], but blocking Rho kinase with Y27632 does not inhibit matrix contraction [Lee et al., 2003]. The current studies were carried out to determine the signaling mechanisms of bFGF-stimulated fibroblast–collagen matrix contraction.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and trypsin solution were obtained from Nihon Seiyaku (Tokyo, Japan). Bovine serum albumin (BSA) and LPA were obtained from Sigma, Steinheim (St. Louis, MO). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Cytosystems (Castle Hill, NSW, Australia). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG H + L and goat anti-rabbit IgG H + L antibodies were obtained from ICN Biomedicals, Inc. (Aurora, OH). Enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting reagent was obtained from Amersham Pharmacia Biotechnologies (Piscataway, NJ). Vitrogen "100" collagen was obtained from Cohesion (Palo Alto, CA). Rac activation assay kit and Cdc42 activation assay kit were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). G-LISA™ RhoA activation assay biochem kit was obtained from Cytoskeleton (Denver, CO). Lipofectin was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). C3 exotransferase, Y27632 and LY294002 were obtained from Calbiochem-Novabiochem Corp. (La Jolla, CA). Mouse anti-vinculin antibodies were purchased from Sigma Chemicals. FITC-conjugated phalloidin and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG H + L antibodies were obtained from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were obtained from Millipore Corp. (Bedford, MA). Western blotting reagent was obtained from Amersham Pharmacia Biotechnologies. Fluoromount G was obtained from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL). Chemotaxicell, 8- μ m-pore polycarbo-

nate filter, was obtained from Kurabo (Osaka, Japan).

Monolayer and Collagen Matrix Culture

After informed consent was given, dermal fibroblasts were obtained from five healthy volunteers. Skin specimens were cut into small pieces, and outgrown fibroblasts were trypsinized and grown in DMEM supplemented with 10% FBS at 37°C in 5% CO₂ and 95% humidified air incubator. The culture medium was changed every 3 days. Cells were used within 10th passages. Cells were harvested by 0.25% trypsin for 1 min, followed by treatment with DMEM with 10% FBS. For monolayer culture experiments, harvested cells were seeded at a density of 4×10^4 cells on 22 mm² glass coverslips (Fisher Scientific, Chicago, IL), which were coated with collagen (50 μ g/ml for 30 min), and then incubated in DMEM containing 5 mg/ml BSA, the respective growth factors and inhibitors, as indicated.

Collagen matrix cultures were prepared using Vitrogen "100" collagen as previously described [Abe et al., 2003; Grinnell et al., 2003]. Briefly, neutralized collagen solution (1.5 mg/ml) containing harvested cells (10⁶ cells/ml unless indicated otherwise) were prewarmed to 37°C for 4 min, and then aliquots (200 μ l) were placed on an area outlined by a 12-mm-diameter circular score within a well of 24-well-culture plates (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) and allowed to polymerize for 1 h at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. To initiate FMC, matrices were gently released from the culture dish with a spatula into 0.8–1.0 ml of DMEM containing 5 mg/ml BSA (DMEM/BSA), the respective growth factors and inhibitors, as indicated. For stressed matrix contraction (SMC), polymerized matrices were cultured 24 h in 1.0 ml of DMEM/10% FBS containing 50 μ g/ml ascorbic acid before release.

Matrix contraction was carried out for the times shown in the text, after which the samples were fixed for 10 min at room temperature with 3% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) (150 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 6 mM Na₂HPO₄, pH 7.2). To quantify contraction, fixed matrices were washed, placed on a flat surface, and the diameters were measured. Contraction data were presented as the change in diameter (starting-final) in millimeters. All experiments were carried out in

duplicate, and every experiment was repeated three times or more. Data points and error bars in the figures represent averages and standard deviations. Where error bars cannot be seen, the data points overlapped.

To load fibroblasts with C3 exotransferase (C3), Lipofectin was used as a delivery system. Lipofectin/C3 was prepared in 120 μ l of DMEM and diluted with additional DMEM after 1 h at 22°C to give a final concentration of 10 μ g/ml Lipofectin and 5 μ g/ml C3. Subsequently, the cells were incubated with the Lipofectin/C3 mixture or Lipofectin prepared identically except without C3 for 30 min at 37°C. Following treatment with Lipofectin/C3 or Lipofectin alone, the cells were rinsed and further incubated with DMEM and 10% FBS for 60 min at 37°C before harvesting.

SDS-PAGE and Immunoblotting

Rac and Cdc42 activation were assessed by the respective assay kit. SDS-PAGE and immunoblotting were performed following instructions. Briefly, cells were extracted in Mg^{2+} lysis buffer. Samples were clarified by centrifugation for 10 min at 16,000g (Beckman Microfuge), and the supernatants were either incubated with reagents for the Ras-GTP pull-down assay or else dissolved in 1 \times reducing sample buffer (250 mM Tris, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 40% glycerol, 20% mercaptoethanol, 0.04% bromphenol blue) and boiled for 5 min. Equal amounts of protein were subjected to SDS-PAGE electrophoresis using 10% acrylamide minislab gels. Transfer to PVDF membranes was carried out at 100 V for 1 h. The membranes were blocked with 5% milk (for anti-Rac antibody) in TTBS (0.1% Tween-20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.5) or 3% BSA (for anti-Cdc42 antibody) in TTBS, and then incubated with anti-Rac antibody (1:500) or anti-Cdc42 antibody (1:500) in blocking solution at 4°C for 12 h. After washing with TTBS, membranes were incubated with either HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody in 5% milk in TTBS (for anti-Rac antibody) or HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody in 3% BSA in TTBS (for anti-Cdc42 antibody) for 1.5 h. After washing with TTBS, membranes were visualized by the ECL system.

RhoA Activation Assay

RhoA activation was assessed by G-LISA™ RhoA activation assay biochem kit. Lumines-

cence assay was performed following according to the instructions. Data were read at 100 gain, 100 ms integration time on luminometer. In each experiment, the Luminescence was calculated from the values of triplicate wells.

Immunofluorescence Microscopy

Cells in matrices or on coverslips were fixed for 10 min with 3% paraformaldehyde in PBS at room temperature, blocked with 2% glycine/1% BSA in DPBS (150 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM KH_2PO_4 , 6 mM Na_2HPO_4 , 0.5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, pH 7.2) for 30 min, and then permeabilized for 15 min with 0.5% triton X-100 in DPBS. Subsequently, the samples were washed with DPBS and treated for 10 min with 1% BSA in DPBS. Primary antibody against vinculin was diluted in 1% BSA in DPBS (1:200) and reacted with cells for 1 h at 37°C. After washing with DPBS, samples were treated for 10 min with 1% BSA in DPBS, and then FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody in 1% BSA in DPBS (1:300) was added to cells for 30 min at 37°C. After washing with DPBS, samples were treated for 10 min with 1% BSA in DPBS, and then incubated with RITC-conjugated phalloidin in 1% BSA (8 U/ml) for 30 min at 37°C. After additional washes, samples were mounted on glass slides with Fluoromount G. Observed images were collected with an Olympus DP70 camera and Olympus DP Controller system.

Cell Migration Assay

Fibroblast migration was quantified by a modification of Boyden chamber technique using Chemotaxicell. Briefly, cells were suspended in DMEM/BSA at 2×10^5 cells/200 μ l and placed in the top well. The bottom well was filled with 600 μ l of DMEM/BSA containing bFGF and was separated from the top well by Chemotaxicell. The chambers were incubated for 12 h at 37°C in a moist 5% CO_2 atmosphere. The number of cells that had migrated into the lower compartment was then counted in triplicate by phase-contrast microscopy, and expressed as a percentage of the total number of cells added to the upper well.

Wound Healing Assay

Cells were grown in 60 mm culture dishes until confluent, and the cell monolayer was then wounded by a sterile plastic 200 μ l micropipette tip. In the case of treatment with Y27632 or LY294002, cells were preincubated with the

compound for 20 min before wounding. The cells were washed twice with DMEM and incubated under a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 24 h at 37°C in DMEM in the presence or absence of bFGF. Then, they were observed under phase-contrast microscopy at indicated time points.

Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm SD. Statistical analyses of the experiments about the effects of bFGF on the RhoA activation were performed with software program Statview (version 4.0; Abacus Concepts, Berkeley, CA). The group data were subjected to analysis of variance testing to determine the overall impact of sample treatments within an experiment, with additional post hoc testing by using the Fisher protected least significant difference (PLSD) test to determine the statistical significance of individual sample treatments on the parameters in question. The analysis of variance results is reported as significant only if both the analysis of variance and the Fisher PLSD tests yielded a probability (*P*) value of 0.05 or lower.

RESULTS

bFGF and Collagen Matrix Contraction

Figure 1A shows the representative result of floating collagen matrices 4 h after contraction in the presence or absence of bFGF. The diameter of the matrices was 10.5 mm at the time contraction was initiated. In DMEM alone, the matrix scarcely contracted. The matrix diameter markedly decreased when fibroblasts were stimulated with 1 ng/ml of bFGF. Figure 1B shows the results of matrix contraction at the various concentrations of bFGF. The FMC rate was highest around 1 ng/ml of bFGF. On the other hand, bFGF did not promote SMC at any concentration (data not shown).

PI3K Inhibitor, LY294002, Rho Inhibitor, C3 Exotransferase and Rho Kinase Inhibitor, Y27632, Blocked bFGF-Stimulated Floating Matrix Contraction

Studies were carried out to elucidate the mechanisms of FMC by using two different kinase inhibitors, LY294002 for phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and Y27632 for Rho kinase. Figure 2A shows the results of experiments measuring the collagen matrix contraction stimulated with 1 ng/ml of bFGF in the

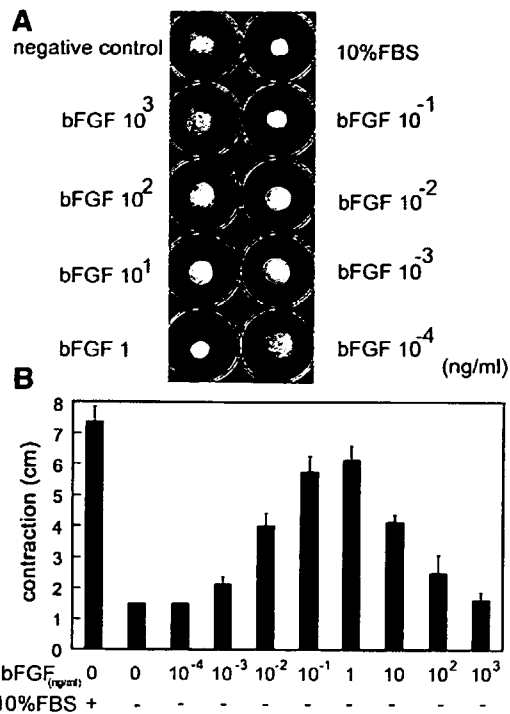


Fig. 1. Dose-dependence study of matrix contraction in the presence of various concentrations of bFGF. Collagen matrices containing fibroblasts were released from culture dishes to initiate contraction immediately after polymerization. Contraction medium was DMEM/BSA containing bFGF at indicated concentrations. At the end of the incubations, 4 h for floating matrices, samples were fixed and the extent of matrix contraction was measured as a decrease in matrix diameter (A). The rates of floating matrix contraction were highest around 1 ng/ml of bFGF (B).

presence or absence of LY294002. LY294002 completely inhibited bFGF-stimulated matrix contraction. Figure 2B shows the effect of Y27632 in the same experimental system. Y27632 also completely inhibited bFGF-stimulated matrix contraction. Consistent with previous studies [Lee et al., 2003], addition of Rho kinase inhibitor, Y27632, had little effect on LPA-stimulated contraction of floating matrices. To study the effect of C3 exotransferase, a specific inhibitor of Rho activity [Narumiya et al., 1988], on contraction of floating collagen matrices, C3 was loaded into fibroblasts in monolayer culture using Lipofectin. Fibroblasts treated with Lipofectin/C3, but not Lipofectin or C3 alone, showed arborized spreading morphology (data not shown). Figure 2C presents a typical experiment showing that cells treated with Lipofectin/C3 were unable to contract floating collagen matrices

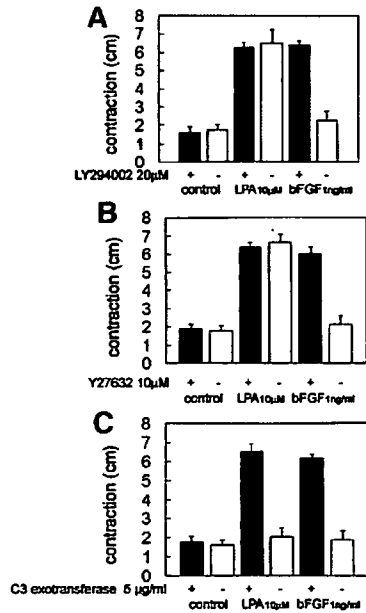


Fig. 2. Phosphatidylinositol-3-kinase dependence, Rho and Rho kinase dependence of collagen matrix contraction. Polymerized collagen matrices containing cells were released from culture dishes and incubated 15 min in DMEM/BSA and 10 μ M LPA or 1 ng/ml bFGF as shown. Where indicated 20 μ M LY294002 (A) or 10 μ M Y27632 (B) were added 15 min before the stimulation of growth factors. For study the effect of C3 exotransferase (C) on contraction of floating collagen matrices, fibroblasts in monolayer culture were incubated for 30 min at 37°C with Lipofectin (10 μ g/ml) mixed with or without C3 (5 μ g/ml) as indicated. Subsequently, the cells were tested for contraction. At the end of incubations, samples were fixed and the extent of matrix contraction was measured as a decrease in matrix diameter.

regardless of whether bFGF or LPA was used to stimulate contraction, whereas cells treated with Lipofectin alone were unaffected. Therefore, the small G-protein Rho appeared to be required for bFGF-stimulated matrix contraction.

bFGF Accelerated Cell Migration

The results indicated that bFGF-stimulated FMC was Rho kinase-dependent. Since, Rho kinase has been reported to play a role in cell migration as well as fibroblast–collagen matrix contraction [Ehrlich et al., 1991; Parizi et al., 2000; Takayama and Mizumachi, 2001], cell migration assay was performed. Figure 3 shows that cell migration stimulated with bFGF was enhanced in a dose-dependent manner. Figure 4A shows the representative results of wound healing assay in the presence or absence of bFGF. These two results may indicate that bFGF accelerate cell migration around at 100 ng/

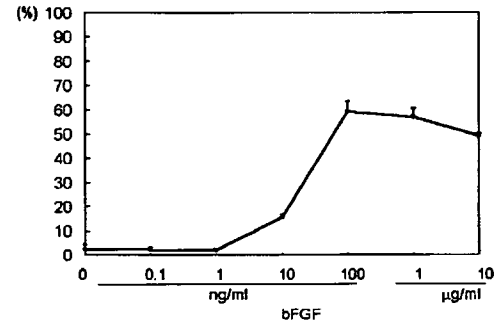


Fig. 3. Cell migration stimulated with bFGF in dose-dependent manner. Cells were stimulated with various concentrations of bFGF using the Boyden chamber technique.

ml of bFGF. Figure 4B shows the typical findings of wound healing assay to examine the effects of LY294002 and Y27632 in the

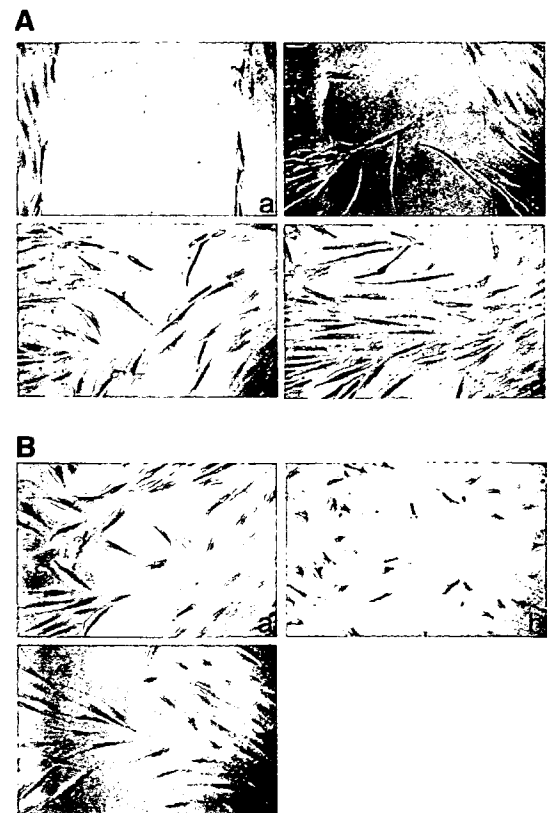


Fig. 4. Wound healing assay. A: Effects of bFGF on cell migration in an assay of wound healing. Monolayers of fibroblasts were wounded and then cultured for 0 (a) or 24 h in the presence of 1 (b), 10 (c) or 100 (d) ng/ml of bFGF. B: Effects of LY294002 or Y27632 on bFGF-promoted cell migration in an assay of wound healing. Monolayers of fibroblasts were wounded and then cultured with 100 ng/ml bFGF in the absence (a) or presence of 10 μ M Y27632 (b) or 20 μ M LY294002 (c).

presence of 100 ng/ml of bFGF. Addition of LY294002 had little effect on bFGF-stimulated cell migration although addition of Y27632 was markedly inhibited.

bFGF and Cell Spreading on Collagen-Coated Coverslips

Further experiments were carried out to examine whether or not the bFGF-stimulated Rho kinase-dependent mechanism of force generation also could be demonstrated during cell spreading on collagen-coated coverslips following LPA stimulation. Figure 5 shows that in bFGF-containing medium, fibroblasts spread with prominent stress fibers (actin staining). In the presence of Rho kinase inhibitor (+Y27632), stress fiber formation was abolished. Instead of broad lamellae, cells revealed long dendritic extensions. In the presence of PI3K inhibitor (+LY294002), fibroblasts spread and elongated, and instead of broad lamellae, cells had long dendritic extensions. Fibroblasts incubated on collagen-coated coverslips in LPA-containing medium also developed stress fibers, but tended to be much less polarized than those in bFGF-containing medium. Fibroblasts in medium containing LPA and Rho kinase inhibitor (LPA + Y27632) became more polarized but, unlike cells in bFGF medium, often retained

regions of broad lamellae and also developed stress fibers. In the presence of PI3K inhibitor, fibroblasts spread and elongated similar to fibroblasts under bFGF stimulation. Fibroblasts incubated on collagen-coated coverslips in LPA-containing medium also developed stress fibers, but tended to be much less polarized than cells in bFGF-containing medium.

Figure 6 shows that in bFGF-containing medium, fibroblasts spread with prominent stress fibers and focal adhesions (vinculin). In the presence of Rho kinase inhibitor (+Y27632), focal adhesions and stress fibers were mostly lost, instead of broad lamellae, cells had long, dendritic extensions. However, in the presence of PI3K inhibitor (+LY294002), focal adhesions were maintained. Thus, fibroblasts on collagen-coated surfaces in bFGF-containing medium are proved to require Rho kinase to generate tractional force for flattening and for formation of stress fibers and focal adhesions.

bFGF and Rac Activation

It is reasonable to consider that, in floating matrices, the Rac signaling pathway may be involved in the upstream of Rho kinase. Consequently, subsequent studies focused on Rac, a member of the Rho family. Pull-down assays to

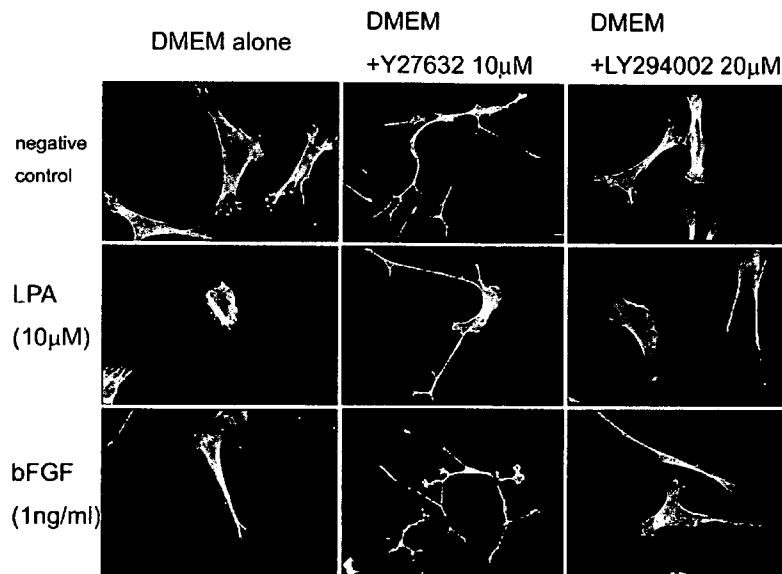


Fig. 5. Phosphatidylinositol-3-kinase dependence and Rho kinase dependence of fibroblast spreading on collagen coated coverslips. Cells were incubated on collagen-coated coverslips in DMEM and 5 mg/ml BSA for 15 min with or without 10 μ M Y27632 or 20 μ M LY294002 as indicated, and then stimulated with 10 μ M LPA or 1 ng/ml bFGF. After a 4 h incubation, samples were fixed and stained to visualize actin.

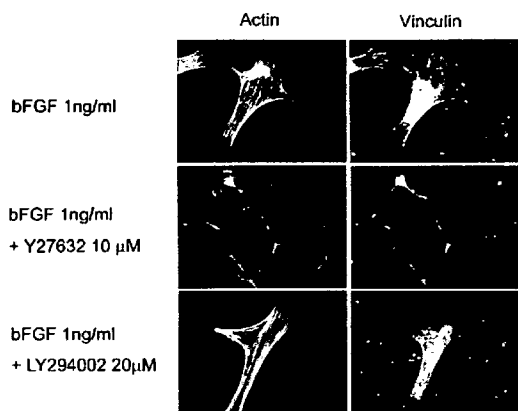


Fig. 6. Phosphatidylinositol-3-kinase dependence and Rho kinase dependence of bFGF promoted fibroblast spreading on collagen-coated coverslips. Cells were incubated on collagen-coated coverslips in DMEM and 5 mg/ml BSA for 15 min with or without 10 μ M Y27632 or 20 μ M LY294002 as indicated, and then stimulated with 1 ng/ml bFGF. After a 4 h incubation, samples were fixed and stained to visualize actin and vinculin.

detect GTP-loaded Rac were carried out to know whether or not the Rac activation was involved in the bFGF-mediated collagen matrix contraction. Figure 7A shows a representative result from three experiments. bFGF stimulation

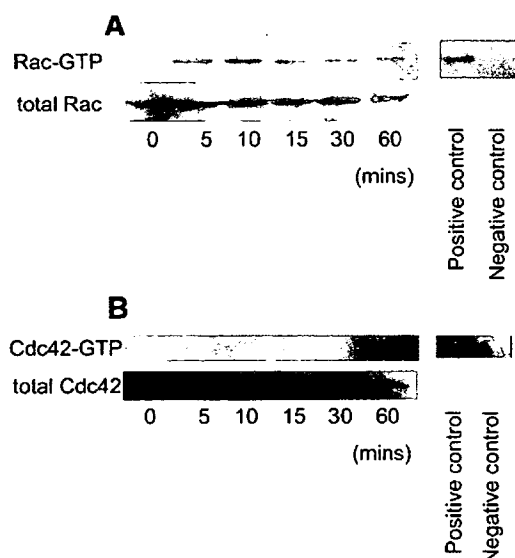


Fig. 7. GTP-loading of Rac or Cdc42 in fibroblasts stimulated with bFGF. Fibroblasts were cultured on collagen-coated coverslips in DMEM and 5 mg/ml BSA for 30 min and then stimulated with 1 ng/ml bFGF. At the times indicated, cell extracts were prepared and subjected to pull-down assay analyses. Samples of the extracts and pull-down pellets were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting for Rac (A) and Cdc42 (B).

caused transient Rac activation as compared with unstimulated cells. In parallel experiments, Figure 7B shows a representative result of GTP-loaded Cdc42. bFGF did not activate Cdc42 in human dermal fibroblasts.

bFGF and RhoA Activation

Final experiments were carried out to make a quantitative analysis of Rho activation stimulated with bFGF by G-LISATM. Data shown in Figure 8 were read at 100 gain, 100 ms integration time on a luminometer. bFGF stimulation caused significant Rho activation as compared with unstimulated cells.

DISCUSSION

Form and function of multicellular organisms depend on cell proliferation, migration, and differentiation. Fibroblasts synthesize and degrade extracellular matrices to organize and maintain connective tissues during matrix development and in response to injury and fibrotic diseases. Studies on cells in three-dimensional matrices also suggest that reciprocal and adaptive mechanical interactions play a role in the regulation of morphogenesis. Therefore, fibroblasts cultured in collagen matrices have been used as a model system to study how cells organize connective tissue. Previous studies have shown that LPA-stimulated floating collagen matrix contraction is independent of Rho kinase whereas PDGF-stimulated contraction is Rho kinase-dependent [Abe et al., 2003].

Recently, human recombinant bFGF has been available for the treatment of non-healing skin ulcer [McGee et al., 1988]. The effect of

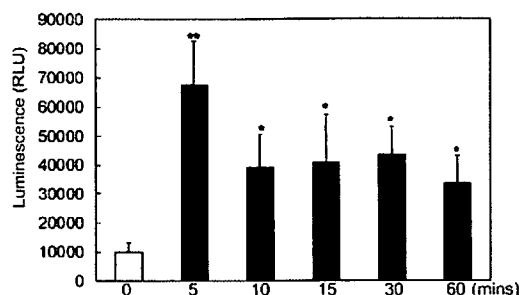


Fig. 8. Quantitative analysis of GTP-loading of Rho in fibroblasts stimulated with bFGF. Fibroblasts were cultured on collagen-coated coverslips in DMEM and 5 mg/ml BSA for 30 min and then stimulated with 1 ng/ml bFGF. At the times indicated, cell extracts were prepared and analyzed bFGF by G-LISATM. Each column represents mean \pm SD from five separate experiments. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ versus 0 min.

bFGF for cell proliferation is well documented in previous studies [Gospodarowicz et al., 1987; Gospodarowicz, 1988; Rifkin and Moscatelli, 1989]. However, little is known about its biological effects in wound healing processes [Grinnell et al., 1999; Ono, 2002; Spyrou and Naylor, 2002; Akasaka et al., 2004; Ono et al., 2004]. In particular, only limited information is available on the signal transduction pathways that regulate dermal wound healing promoted by bFGF. The present studies aimed to learn more about the effects of bFGF on wound healing using the fibroblast–collagen matrix contraction assay system. bFGF promoted FMC but not SMC, which is similar to those effects under PDGF. Contraction of floating and stressed collagen matrices may also reflect different aspects of cell motility. Fibroblasts in floating collagen matrices are round-shaped during contraction [Grinnell et al., 1999], whereas cells in stressed matrices assume a spread morphology with prominent stress fibers and withdraw their extensions during contraction [Mochitate et al., 1991; Tomasek et al., 1992; Lee et al., 1993]. Under FMC, contraction probably depends on tractional forces that accompany the protrusion of cell extensions [Harris et al., 1981]. Under SMC, the stress fibers themselves can contract once there is no longer a rigid substratum to maintain isometric tension [Burridge, 1981]. Our results using three inhibitors suggest that bFGF-stimulated FMC respectively utilizes PI3K, Rac, Rho and Rho kinase-dependent mechanisms.

Although cell migration is indispensable to cutaneous wound healing, the details of wound healing promoted by bFGF are still unclear. We could confirm the effect of bFGF for fibroblast migration by two different methods, wound healing assay and Boyden chamber technique. It is of note that Rho kinase inhibitor suppressed bFGF-stimulated fibroblast motility, but PI3K inhibitor had little effect. Taken together, the results suggest that bFGF may stimulate fibroblast motility through Rho kinase activation, but not by PI3K. There is no doubt that other signal transduction pathways may be involved in bFGF-stimulated fibroblast motility. There are large differences between in bFGF concentrations required for FMC and cell migration. However, we have already reported that collagen matrix contraction and cell behaviors are completely different depending on stimulators [Abe et al., 2003].

The results imply that human fibroblast spreading on collagen-coated coverslips in the presence of bFGF may have a Rho kinase-dependent mechanism for exerting force. Blocking Rho kinase in the presence of bFGF caused loss of most stress fibers and focal adhesions, and the cells fanned out in one direction suggesting the induced formation of lamellipodia by bFGF. Activation of Cdc42 triggers actin polymerization and bounding to form either filopodia or shorter cell protrusions called microspikes [Aspenstrom et al., 2004; Begum et al., 2004; Kurokawa et al., 2004; Hall, 2005]. Activation of Rac promotes actin polymerization at the cell periphery leading to the formation of sheet-like lamellipodial extensions and membrane ruffles [Aspenstrom et al., 2004; Begum et al., 2004; Kurokawa et al., 2004; Hall, 2005]. Activation of Rho promotes both the bundling of actin filaments with myosin II filaments into stress fibers and associated proteins to form focal contacts ruffles [Aspenstrom et al., 2004; Kurokawa et al., 2004; Hall, 2005]. Therefore, we asked whether or not bFGF could activate Rac and Rho in human dermal fibroblast. Rac-GTP pull-down and Rho-GTP chemiluminescence assays demonstrated that transient Rac and RhoA activation occurred in fibroblasts with bFGF stimulation, but Cdc42 was not activated. Ras superfamily GTPases not only regulate growth and differentiation, but also link cell surface receptors to actin cytoskeleton. These GTPases regulate actin dynamics and regulate fundamental processes such as cell movement, cell cycle progression, cytokinesis as well as gene expression in the nucleus [Hall, 1998; Giancotti and Ruoslahti, 1999]. Rac and Cdc42 are wound-activated and are respectively linked to the actin-polymerized structures “lamellipodia” and “filopodia” formation [Aspenstrom et al., 2004; Begum et al., 2004; Kurokawa et al., 2004]. Rac is essential for the formation of leading edge protrusions, and necessary for forward movement in the wound; Cdc42 is important for maintaining the polarized phenotype of migrating cells, whereas Ras is involved in stress fiber formation and focal adhesion turnover and is also required for cell movement [Chotani et al., 2000]. Thus, these small GTPases coordinately regulate cell movement [Nobes and Hall, 1999]. The present study strongly suggests that bFGF is involved in this fundamental process.

The present study demonstrated that PI3K, Rac, Rho, and Rho kinase are involved in bFGF-stimulated collagen matrix contraction. Moreover, bFGF accelerates dermal fibroblast motility via Rac activation but does not activate Cdc42. Clarification of downstream effectors on signal transduction may be an important clue to understand the role of bFGF in wound healing.

REFERENCES

- Abe M, Ho CH, Kamm KE, Grinnell F. 2003. Different molecular motors mediate platelet-derived growth factor and lysophosphatidic acid-stimulated floating collagen matrix contraction. *J Biol Chem* 278:47707–47712.
- Akasaka Y, Ono I, Yamashita T, Jumbow K, Ishii T. 2004. Basic fibroblast growth factor promotes apoptosis and suppresses granulation tissue formation in acute incisional wounds. *J Pathol* 203:710–720.
- Aspenstrom P, Fransson A, Saras J. 2004. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *J Biochem* 377:327–337.
- Begum R, Nur-E-Kamal MS, Zaman MA. 2004. The role of Rho GTPases in the regulation of the rearrangement of actin cytoskeleton and cell movement. *Exp Mol Med* 36:358–366.
- Brown RA, Prajapati R, McGrouther DA, Yannas IV, Eastwood M. 1998. Tensional homeostasis in dermal fibroblasts: Mechanical responses to mechanical loading in three-dimensional substrates. *J Cell Physiol* 175:323–332.
- Burridge K. 1981. Are stress fibres contractile? *Nature* 294:691–692.
- Chotani MA, Touhalsky K, Chiu IM. 2000. The small GTPases Ras, Rac, and Cdc42 transcriptionally regulate expression of human fibroblast growth factor 1. *J Biol Chem* 275:30432–30438.
- Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. 2002. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol* 14:633–639.
- Ehrlich HP, Rockwell WB, Cornwell TL, Rajaratnam JBM. 1991. Demonstration of a direct role for myosin light chain kinase in fibroblast-populated collagen lattice contraction. *J Cell Physiol* 146:1–7.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. 1999. Integrin signaling. *Science* 285:1028–1032.
- Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. 1987. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 8:95–114.
- Gospodarowicz D. 1988. Molecular and developmental biology aspects of fibroblast growth factor. *Adv Exp Med Biol* 234:23–39.
- Grinnell F. 2003. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* 13:264–269.
- Grinnell F, Ho CH, Lin YC, Skuta G. 1999. Differences in the regulation of fibroblast contraction of floating versus stressed collagen matrices. *J Biol Chem* 274:918–923.
- Grinnell F, Ho CH, Tamariz E, Lee DJ, Skuta G. 2003. Dendritic fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. *Mol Biol Cell* 14:384–395.
- Hall A. 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33:891–895.
- Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509–514.
- Harris AK, Stopak D, Wild P. 1981. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 290:249–251.
- Kolodney MS, Elson EL. 1993. Correlation of myosin light chain phosphorylation with isometric contraction of fibroblasts. *J Biol Chem* 268:23850–23855.
- Kurokawa K, Itoh RE, Yoshizaki H, Nakamura YO, Matsuda M. 2004. Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol Biol Cell* 15:1003–1010.
- Lee DJ, Ho CH, Grinnell F. 2003. LPA-stimulated fibroblast contraction of floating collagen matrices does not require Rho kinase activity or retraction of fibroblast extensions. *Exp Cell Res* 289:86–94.
- Lee TL, Lin YC, Mochitate K, Grinnell F. 1993. Stress-relaxation of fibroblasts in collagen matrices triggers ectocytosis of plasma membrane vesicles containing actin, annexins II and VI, and beta 1 integrin receptors. *J Cell Sci* 105:167–177.
- McGee GS, Davidson JM, Buckley A, Sommer A, Woodward SC, Aquino AM, Barbour R, Demetriou AA. 1988. Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J Surg Res* 45:145–153.
- Mochitate K, Pawelek P, Grinnell F. 1991. Stress relaxation of contracted collagen gels: Disruption of actin filament bundles, release of cell surface fibronectin, and down-regulation of DNA and protein synthesis. *Exp Cell Res* 193:198–207.
- Narumiya S, Sekine A, Fujiwara M. 1988. Substrate for botulinum ADP-ribosyltransferase, Gb, has an amino acid sequence homologous to a putative rho gene product. *J Biol Chem* 263:17255–17257.
- Nobes CD, Hall A. 1999. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 144:1235–1244.
- Ono I. 2002. The effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on the breaking strength of acute incisional wounds. *J Dermatol Sci* 29:104–113.
- Ono I, Yamashita T, Hida T, Jin HY, Ito Y, Hamada H, Akasaka Y, Ishii T, Jimbow K. 2004. Combined administration of basic fibroblast growth factor protein and the hepatocyte growth factor gene enhances the regeneration of dermis in acute incisional wounds. *Wound Repair Regen* 12:67–79.
- Parizi M, Howard EW, Tomasek JJ. 2000. Regulation of LPA-promoted myofibroblast contraction: Role of Rho, myosin light chain kinase, and myosin light chain phosphatase. *Exp Cell Res* 254:210–220.
- Robson MC, Phillips LG, Lawrence WT, Bishop JB, Youngerman JS, Hayward PG, Broemeling LD, Heggers JP. 1992. The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores. *Ann Surg* 216:401–408.
- Shreiber DI, Enever PA, Tranquillo RT. 2001. Effects of PDGF-bb on rat dermal fibroblast behavior in mechanically stressed and unstressed collagen and fibrin gels. *Exp Cell Res* 266:155–166.
- Spyrou GE, Naylor IL. 2002. The effect of basic fibroblast growth factor on scarring. *Br J Plast Surg* 55:275–282.
- Takayama Y, Mizumachi K. 2001. Effects of lactoferrin on collagen gel contractile activity and myosin light chain

- phosphorylation in human fibroblasts. *FEBS Lett* 508:111-116.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:349-363.
- Tomasek JJ, Haaksma CJ, Eddy RJ, Vaughan MB. 1992. Fibroblast contraction occurs on release of tension in attached collagen lattices: Dependency on an organized actin cytoskeleton and serum. *Anat Rec* 232:359-368.
- Tranquillo RT. 1999. Self-organization of tissue-equivalents: The nature and role of contact guidance. *Biochem Soc Symp* 65:27-42.
- Rifkin DB, Moscatelli D. 1989. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 109:1-6.

入院中の管理のポイント

褥瘡の予防法と治療法は？

石川 治* 松井佐知子**

Osamu ISHIKAWA

Sachiko MATSUI

● Key Words ● 褥瘡, 体圧分散, 体位変換, デブリドマン, 湿潤環境所屬 ●

はじめに

褥瘡は各科において遍く発症しうる疾患であり、医師・看護師はその予防と治療に関する基本的事項を理解しておかねばならない。現在、すべき予防措置を行わずに褥瘡が発症した場合、医学的に適切な治療が行われなかった場合などは訴訟の対象となる。

I. 褥瘡の予防

褥瘡を予防するためには、個々の患者がもつ褥瘡発生要因を適切な時期（原則として、入院時、あるいは急性期では1週間に1回、慢性期では1カ月に一度）に正しく評価（リスクアセスメント）しなければならない。褥瘡の予防の基本は、圧迫・ズレ・摩擦を最小限にし、栄養状態を整え、脆弱な皮膚を保護することである。

1. 圧迫に対するケア

1) 体位の整え

1) 原則的として体位変換時間は2時間ごとに行う。しかし、体圧分散寝具の使用の有無やその機能、および身体状況（ろい瘦、浮腫の程度）を考慮して体位変換時間の間隔を調整する。

2) 体位変換の角度は、腸骨部や大転子部などの骨突出部を圧迫しない30度側臥位とする。ろい瘦が著明で仙骨部骨突出がある場合は、仙骨部が圧迫されない90度側臥位がよい場合もある。

2) 体圧分散寝具の使用

体圧分散寝具は、身体と寝具の接触面積を広くすることにより褥瘡発生リスクのある部分にかかる圧力を減少させる。使用方法、素材、機能によって分類されており価格もさまざまである。それぞれの特徴を理解し、使用目的に応じて選択する。

2. “ズレ”に対するケア

ズレは皮膚・皮下脂肪組織と筋膜・筋肉との間で発生する。ズレにより血管が伸展され、より弱い圧迫で虚血が生じる。したがって、ギャッチアップは下肢側の挙上から行い、原則として角度は30度以下とする。なお、ギャッチアップ後は患者を一度ベッドから起こして皮膚のズレを解消させる（背抜き）。

3. 摩擦に対するケア

摩擦は身体の表面が寝衣・寝具に擦れることで生じる。皮膚が過度に乾燥・湿潤していると皮膚傷害が起こりやすくなる。骨突出部位を保護するために半透過性フィルムドレッシング材を貼付する。乾燥に対しては保湿剤、湿潤に対しては油性軟膏や亜鉛華軟膏などを塗布する。

4. 栄養の整え

身体計測・血液検査などで栄養状態を評価する。栄養状態に問題がある場合は、栄養必要量の設定を行い、経口摂取・経管栄養・経静脈栄養などで栄養補給する。NSTチームと協力して対応する。

* 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学, ** 同 附属病院看護部 (〒371-8511 前橋市昭和町3-39-15)

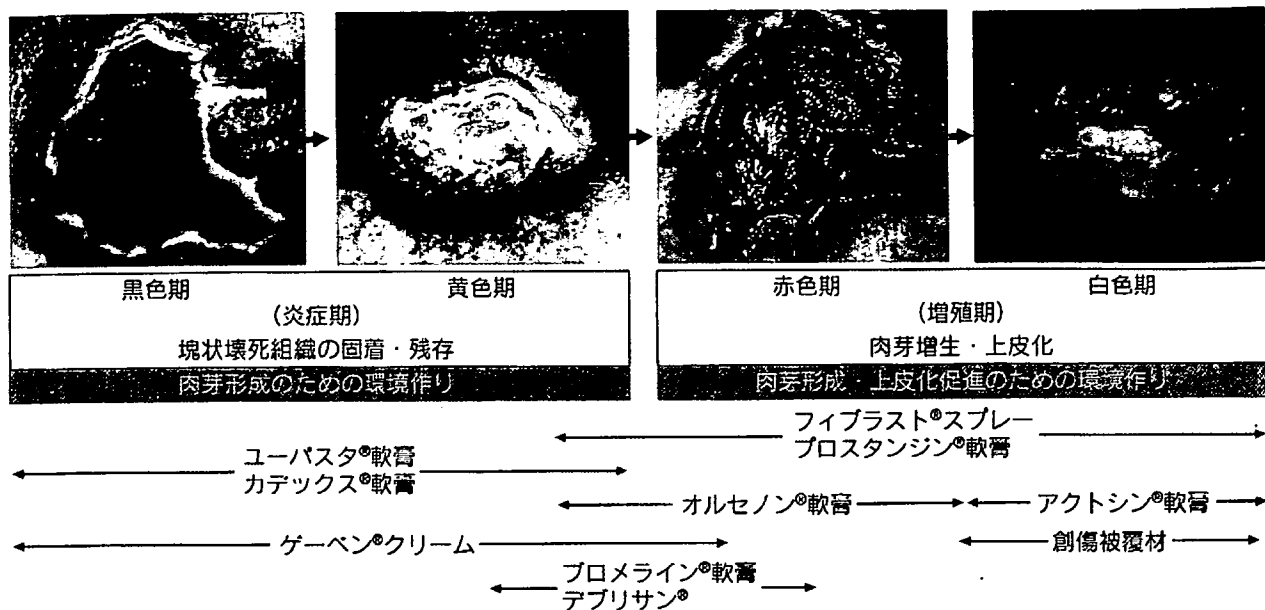


図 褥瘡創面の病期分類と治療薬・被覆材

5. スキンケア

1) 失禁による湿潤予防

失禁のタイプをアセスメントし、排泄物をできるだけ皮膚に接触させないようにする。高分子吸収ポリマーのオムツや陰茎固定型収尿器などの失禁装具を使用する。撥水性クリームや軟膏を予防的に塗布する。

2) 発汗による湿潤予防

通気性や吸水性の高い寝具や寝衣を選択する。

II. 褥瘡の治療

発症間もない褥瘡を急性期褥瘡と呼び、この段階では壊死の及んだ範囲と深さを正確に判定することはできない。急性期褥瘡には透明なポリウレタンフィルム材（オプサイト®, パーミエイドS®）などを貼付して毎日創を観察する。1~2週間以内に壊死の及んだ範囲が明らかとなる。斑状紫斑の存在は、壊死が真皮深層以下に及んだ深い褥瘡であることを示唆する。

1. 浅い褥瘡

壊死が真皮浅層までに止まる褥瘡は、創底が淡紅色調の“びらん”“浅い潰瘍”を呈する。浅い褥瘡であれば、創面の湿潤環境を保ちながら、創を

保護することにより1~2週間で治癒させることができる。ハイドロコロイド被覆材（デュオアクティブET®, テガソープライト®など）、あるいはポリウレタンフィルム材（オプサイト®, パーミエイドS®など）で被覆する。浸出液が多い場合、浸出液をドレナージするために小さい穴を数箇所開けたポリウレタンフィルム材で創を覆い、その上からガーゼで固定する。創面にガーゼを直接当てることは避ける。その理由として、ガーゼによる創面からの水分吸収による創の乾燥化、被覆時あるいはガーゼ交換時の摩擦や剝離による肉芽組織や再生表皮に対する物理的損傷、創の易汚染性などが挙げられる。

2. 深い褥瘡

壊死が真皮深層以下に及ぶ褥瘡は治癒までに数カ月、ときに1年以上を要する。褥瘡と手術創の大きな差異は、褥瘡には壊死組織が存在することである。壊死組織は生体にとっては異物と化しており、これを生体から切り離そうとする炎症反応（好中球やマクロファージからの蛋白分解酵素の放出）が起こる。一方、壊死組織は細菌感染の温床でもあり、感染が成立すると細菌感染に対する防御機構としての炎症反応も胎動する。これらの

炎症反応が続く限り肉芽形成は始まらない。したがって、この時期の治療目標は壊死組織の除去と感染制御である。

可能な限り壊死組織を外科的にデブリドマンし、抗菌作用を持つ外用薬（ユーパスタ[®]、カデックス[®]など）を使用する。乾固した壊死組織には水分を多く含む外用薬（ゲーベン[®]クリーム）を使用することで、デブリドマンがしやすくなる。外科的デブリドマンの適応のない症例、比較的少量の壊死組織が残存する褥瘡にはプロメライン[®]軟膏による化学的デブリドマンを行う。

創面の80%以上を肉芽組織が覆ったら、肉芽形成促進作用を持つ外用薬（フィブラスト[®]スプレー、オルセノン[®]軟膏、プロスタンジン[®]軟膏など）に変更する。この時期の治療目標は、創面の保護と適切な水分バランスの保持である。肉芽

組織が十分に欠損部分を補填して周囲との段差がなくなると創の収縮と上皮化が起こり、創は治癒する。上皮化が進行する時期ではアクトシン[®]軟膏や種々の被覆材が適している。

肉芽形成や上皮化が経過途中で停滞することがある。その主たる原因は、①壊死組織の残存とそれに伴う細菌の臨界的定着、②創面の乾燥である。①の場合は、肉芽組織がブヨブヨした浮腫状を呈するとともに、浸出液が増加して創周囲の皮膚が浸軟（角層がふやけて白色調となる）する。創面が乾燥すると肉芽組織は硬い白色調を呈し、創周囲の皮膚が堤防状に盛り上がるようになる。創面を読むことは経験を要するので、このような場合には専門医の診断を仰ぐのがよいであろう。

図に褥瘡の病期分類、各病期の治療目標と使用可能な薬剤などを示す。

* * *

3. 褥創

石川 治 (群馬大学)

要 約

高齢者社会の到来とともに、褥瘡患者が増加すると予測されている。褥瘡は皮膚科医が先頭に立って診療すべき難治性皮膚潰瘍である。適切な治療が行われなければ、創は治癒せず、時には壊死性筋膜炎、骨髄炎、敗血症などを併発して生命を脅かすこともある。ここでは、皮膚科医が知っておくべき基本的知識として、褥瘡の発症機序、基本的予防措置、局所治療、洗浄と消毒、栄養状態の改善について解説した。

1. 発症機序

褥瘡は皮膚局所への持続的圧迫がもたらす血流障害(直接要因)によって生ずる虚血性皮膚壊死である。圧迫は圧縮応力、引張応力、剪断応力を生み、これらが複雑に作用して血流を阻害する(図1)。皮膚にズレが生じて血管が引き伸ばされると、通常の半分以下の圧迫で血流が途絶える。

皮膚局所へ持続的圧迫が加わり褥瘡が発症し易くなる間接要因は複数存在するが(図2)、基本的には「体位変換が行われない」ことによる。「自分で体位変換ができない、あるいは自分で体位変換をしない」状態は、①寝たきり(寝かせきり)の高齢者、②手術患者、③神経・筋・関節などに障害をもつ患者に生じうる。このような患者に対しては、まず予防措置をとることが第一である。

2. 基本的予防措置

図1に挙げた負の因子の影響を軽減ないし除去することにより、褥瘡の予防ばかりでなく発症した褥瘡の治療を促進することができる。医師も心得ておくべき基本的予防措置を以下に挙げる。

①ベッド上の体位変換は2時間毎が原則

70~100mmHgの圧力が2時間皮膚に加わると組織損傷徴候が現れるとされている¹⁾²⁾。自力で体を動かせる人は無意識のうちに「寝返り」をうつことにより局所の持続的圧迫を回避している。体位変換は仰臥位

→右(左)側臥位→仰臥位→左(右)側臥位→仰臥位の順に行う。ただし、褥瘡発症リスクは患者の栄養状態(骨突出の程度)や体圧分散寝具の機能によって変わるので、2時間は目安として捉えるべきである。車椅子上では、15~20分に1回プッシュアップを行う。

②側臥位は30°が原則

30°側臥位では、骨突出がなく最も広い面積を持つ殿筋で体重を受けることができる。ただし、瘡瘍が高度な患者では、側臥位にした後に患者の殿部に手を差し込み、骨がベッドに当たらない角度とし、30°に固執する必要はない。なお、患者自身の力で30°を保持することは難しいので、種々の形や大きさのクッションを用いて姿勢を支持する。

③ギャッチアップ(ヘッドアップ)は30°までが原則

ギャッチアップ角度が45°では上半身の体重の50%が、70°では88%が仙骨部から尾骨部に集中する³⁾。ギャッチアップおよびダウン後は皮膚にズレが生じているので、患者を支えながら背中をベッドから一旦浮かして皮膚のズレを解消する(この操作を背抜きと呼ぶ)。

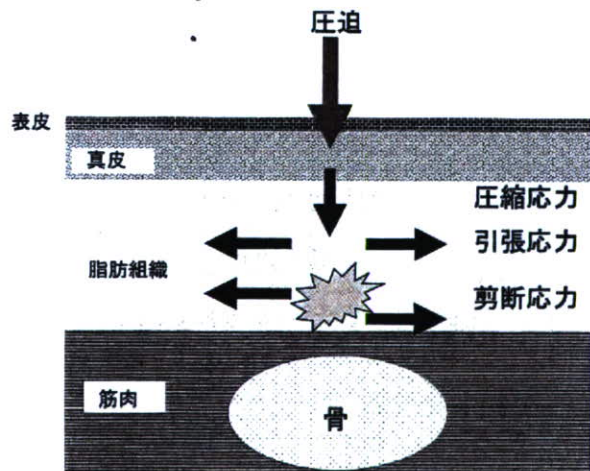


図1 圧迫によって生じる応力

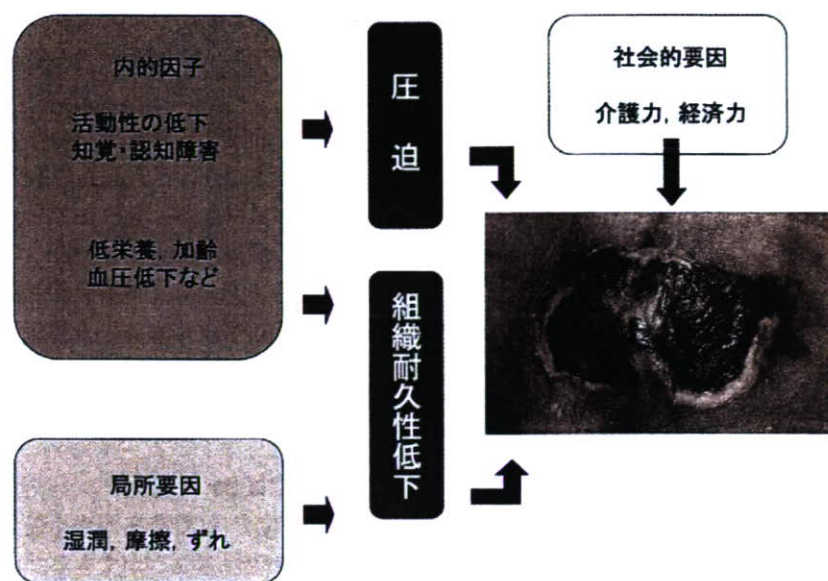


図2 褥瘡の発症要因

④踵部の除圧

下腿部に座布団やクッションを当て踵部を浮かせる。踵部に円座を使用してはならない。円座に接触する皮膚に引張力と圧迫が加わり虚血状態となる。

⑤体圧分散寝具の使用

体圧分散寝具は、寝具との接触面積を広くすることで骨突出部に加わる圧を分散させている。種々の素材(エア、ウオーター、ウレタンフォーム、ゲル、ゴムなど)がある。適切に使用することによって褥瘡発症率、深達性の重度褥瘡が有意に減少(約50%減少)することが確認されている。ただし、体圧分散寝具を使用しても体位変換は必要であり、過信は禁物である。手掌を上にして体圧分散寝具の下に差し入れ、中指と薬指を立てて仙骨部が触知できるかを探る。簡単に触れるようでは内圧が低すぎ、触れないようでは内圧が高すぎる。指を2.5cmほど立てたときに仙骨部を触れることができる状態が適切な内圧とされている⁴⁾。

3. 局所治療

褥瘡の局所治療についての基本的考え方は、原因を異にする種々の皮膚潰瘍の局所療法にも応用できる。皮膚科医には、褥瘡(皮膚潰瘍)の病期(状態)を判断し、その病期(状態)に対する治療方針をたて、適切な外用薬および創傷被覆材を選択使用できる能力が求められる。ただし、治療方針の決定に際しては、患

者の全身状態、活動性に関する今後の見通し、介護の質と量、費用対効果などを総合的に勘案すべきである。全身状態が安定している患者に適切なケア(減圧用具の使用、スキンケア、体位変換など)、全身管理、栄養管理、局所治療を行えば、ほとんどの褥瘡を保存的に治癒させることができる。

1) 褥瘡の分類

a) 発症からの経過による分類

発症間もない褥瘡を急性期褥瘡と呼ぶ。この時期では壊死の及ぶ範囲や深さはわからないが、1~2週間で健常皮膚との境界が明瞭となり、壊死範囲が明らかとなる。しかし、壊死の及ぶ深さ(深達度)を外観から判断することは難しく、デブリードメント後に初めて明らかとなる。皮下脂肪組織以下にまで壊死が及ぶ褥瘡では、治癒までに数カ月、時には1年以上の期間を要する。このような時期の褥瘡を慢性期褥瘡と呼ぶ。

b) 深達度による分類

従来、褥瘡の分類は深達度により行われてきた。分類法により若干の差はあるが、壊死の及ぶ深さが表皮にとどまる(I度)、真皮に達する(II度)、脂肪組織に達する(III度)、筋肉ないし骨組織に達する(IV度)、の4段階に大別できる。この分類は褥瘡重症度を評価するものであり、実際の治療における有用性は高くない。

c) 創面色調に基づいた病期分類 (図3)

褥瘡表面の色調から褥瘡が創傷治療過程のどの段階にあるかを判断する分類であり、臨床的有用性が高い。この分類は、壊死が脂肪組織以下に及ぶ深い褥瘡の創面が、黒色(期)→黄色(期)→赤色(期)→白色(期)と順次変化しながら治癒に向かうという事実に基づいている。黒色期は塊状の壊死組織の付着、黄色期は残存壊死組織を伴う滲出性変化を主体とし、これらを一括して炎症期と呼ぶ。赤色期は肉芽が形成される増殖期、白色期は創の収縮と上皮化を反映する成熟期である。実際の医療の現場では、この色調分類が病期毎の治療目標の設定と目標達成のための治療手段・治療薬の選択において有用性を発揮する。

2) 局所治療の基本

皮下脂肪組織以下に壊死の及ぶ深い褥瘡の治療目標は、黒色期～黄色期は「肉芽形成のための環境作り」、赤色期～白色期では「肉芽形成および表皮化促進のための環境作り」に分けて考えるとよい。前者は治療の初期の段階であり、壊死組織の除去、感染の制御を行う。後者は後期の治療であり、創面の保護と適度な水分バランスの保持を行う。

全ての病期に使用可能な外用薬や被覆材は存在しないので、創の状態を正しく評価し、適切な外用薬や被

覆材を選択し使用しなければならない。

①黒色期～黄色期(炎症期)

黒色期は黒色壊死組織が創面に固着した状態である。黒色期では壊死組織の除去と感染制御を治療目標とする。壊死組織は肉芽形成を妨げるばかりでなく、細菌感染の温床となるので速やかに除去することが望ましい。塊状壊死組織が存在すると、これを除去しようとする生体反応(炎症)が続くために肉芽形成機転が起こらない。

壊死組織の除去は外科的デブリドマンが第一選択の治療法である。抗菌作用のある外用薬を使用しながら、健常組織と壊死組織の境界が明瞭になった段階で行う。初回のデブリドマンで全ての壊死組織を除去することは不可能なので、こまめにデブリドマンを繰り返す。デブリドマン後は滲出液が増えるので抗菌作用と吸水作用を持つユーバスタ®軟膏、カデックス®軟膏などが適している。ゲーベン®クリームは約70%の水分を含むのでデブリドマン直後の滲出液の増える時期には不向きである。しかし、デブリドマンしにくい乾固した壊死組織に用いれば、壊死組織が浸軟してデブリドマンし易くなる。外科的デブリドマンが可能な症例でこれを行わないことは、何もしていないに等しいと肝に銘じておくべきである。

黒色期の褥瘡は感染を起こしやすいため、感染徴候

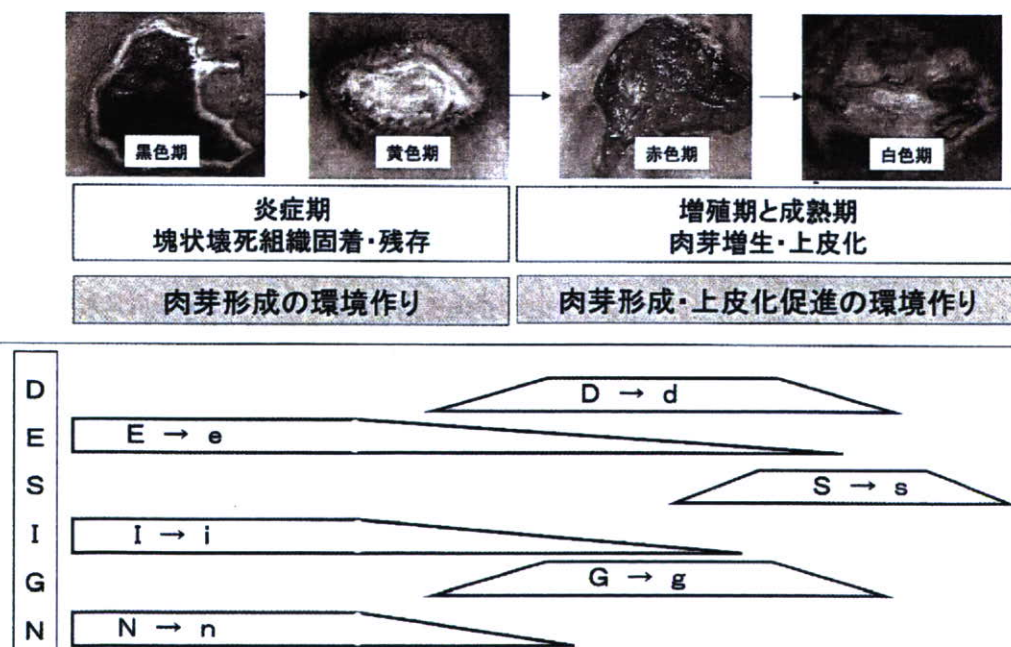


図3 褥瘡創面の病期分類と治療目標

(創周囲の発赤や腫脹、膿、悪臭の有無および発熱)を見逃さないようにしなければならない。切開排膿、壊死組織除去を速やかに行い、蜂窩織炎、骨髓炎、敗血症が疑われる場合には抗生物質の全身投与を行う。抗生物質の粉末や溶解液を褥瘡創面に使用すると耐性菌や薬剤アレルギーを誘導する危険性があるため、絶対に行ってはならない。

黄色期の治療も壊死組織の除去と感染の制御を中心に行う。次第に肉芽組織が増生してくるので、肉芽組織が創面の80%以上を覆ったら赤色期の治療へ移る。

②赤色期(増殖期)

創面は肉芽組織に覆われて赤色を呈する。赤色期では良性肉芽の増生を促し、欠損組織の補填を進める。フィブラスト[®]スプレーとオルセノン[®]軟膏が強い肉芽形成作用を持つようである。肉芽組織が周囲皮膚よりも高く盛り上がった場合には、アクトシン[®]軟膏やカーボワックスなどの水溶性基剤の軟膏に変更し、肉芽を引き締める。プロスタンディン[®]軟膏は油脂性基剤で刺激が少なく、肉芽形成作用も優れている。なお、肉芽面と周囲皮膚との段差がなくなった段階からはハイドロコロイドドレッシング材などの創傷被覆材を使用してもよい。ハイドロコロイドドレッシング材は浅い褥瘡、および赤色以降の褥瘡に最も適している。

③白色期(成熟期)

白色期の治療は深い褥瘡治癒過程の最終段階である。肉芽組織は成熟すると組織全体が収縮を起こす(組織再構築:tissue remodeling)。この収縮によって創の面積は縮小するが、残った創面は周囲からの上皮化で閉鎖される。白色期にはアクトシン[®]軟膏やハイドロコロイドドレッシング材などの創傷被覆材が適している。

3) DESIGN-P 分類による褥瘡の重症度および経過の評価

日本褥瘡学会による DESIGN(-P) 分類を用いて褥瘡の重症度を客観的に評価することができ、医療従事者の共通言語として使用できる。D は depth (深さ)、E は exsudate (浸出液の量)、S は size、I は inflammation/infection (炎症・感染)、G は granulation tissue (肉芽組織形成)、N は necrotic tissue (壊死組織)、P は pocket (ポケット) を意味する。さらに、各項目を

点数により段階的に細分類し、治療経過を客観的に評価するための褥瘡経過評価表がある(表)。ただし、各項目の重み付けの必要性が指摘されており、今後の検討課題となっている。

DESIGN(-P) 分類による褥瘡経過評価表を用いて創の状態を評価しながら、治療を行う。すなわち、D を d に、G を g にするように治療を行い(大文字が小文字になるように)、D が d となって S が s になり治癒させることを目指す。すなわち、合計点数が治療経過とともに減少していれば治療効果が上がっていると判断する。当然のことながら、D と S の変化は DESIGN(-P) 分類の他項目(EIGN-P) の変化の結果を反映しているとも言える。

4) 洗浄と消毒

消毒薬の持つ細胞毒性や綿球による物理的損傷の観点から、消毒操作の是非については議論のあるところである。創面に塗布された消毒薬の有効成分は数分以内に不活性化されてしまうため、消毒の効果は創表面の細菌にしか発揮されない。この程度の効果は、生理食塩水や水道水による加圧洗浄で問題なく代替されることを筆者は確認している(データ未発表)。どうしても創を消毒したい医師は、肉芽組織の存在しない黒色期から黄色期に限定すべきである。なお、洗浄の際には泡状にした弱酸性石鹸水で創面および周囲皮膚を愛護的に洗うことにより、より細菌数を減少させることができる。

5) 栄養状態の改善

低栄養状態は組織の浮腫を招いて循環障害をさらに悪化させるばかりでなく、創治癒を遅延させる。筆者は経口摂取可能な褥瘡患者の褥瘡のほとんどが、適切な局所治療によって治癒することを経験している。どうしても経口摂取ができない患者に対しては、経皮内視鏡的胃腸造設術により栄養補給を行うことが多くなってきた。最近では、多くの病院で NST (Nutrition Support Team) が立ち上げられて有効に機能し始めている。褥瘡チームと NST が協力して褥瘡患者の栄養状態を改善することにより、早期の創治癒が可能となるはずである。

「褥瘡の状態の評価」DESIGN: 褥瘡経過評価用

カルテ番号 ()
 患者氏名 ()

日時

Depth 深さ 創内の一番深い部分で評価し、改善に伴い創底が浅くなった場合、これと相応の深さとして評価する

d	0 皮膚損傷・発赤なし	3 皮下組織までの損傷	/	/	/	/	/	/
	1 持続する発赤	4 皮下組織を起える損傷	/	/	/	/	/	/
	2 真皮までの損傷	5 関節腔、体腔に至る損傷または、深さ判定が不能の場合	/	/	/	/	/	/

Exudate 浸出液

e	0 なし	E 3 多量：1日2回以上のドレッシング交換を要する						
	1 少量：毎日のドレッシング交換を要しない							
	2 中量：1日1回のドレッシング交換を要する							

Size 大きさ 皮膚損傷範囲を測定：[長さ (cm) × 短径 (cm)]

S	0 皮膚損傷なし	S 6 100以上						
	1 4未満							
	2 4以上16未満							
	3 16以上36未満							
	4 36以上64未満							
	5 64以上100未満							

Inflammation/Infection 炎症/感染

i	0 局所の炎症徴候なし	I 2 局所の明らかな感染徴候あり (炎症徴候、腫・悪臭など)						
	1 局所の炎症徴候あり (創周囲の発赤、腫脹、熱感、疼痛)	I 3 全身的影響あり (発熱など)						

Granulation tissue 肉芽組織

G	0 治癒あるいは創が浅いため肉芽形成の評価ができない	3 良性肉芽が創面の10%以上50%未満を占める						
	1 良性肉芽が創面の90%以上を占める	4 良性肉芽が創面の10%未満を占める						
	2 良性肉芽が創面の50%以上90%未満を占める	5 良性肉芽が全く形成されていない						

Necrotic tissue 壊死組織 混在している場合は全体的に多い病態をもって評価する

N	0 壊死組織なし	N 1 柔らかい壊死組織あり						
		N 2 硬く厚い密着した壊死組織あり						

Packet ポケット 毎回同じ体位で、ポケット全周 (横断面も含め) [直径 (cm) × 深度 (cm)] から測定の大きさを差し引いたもの

P	1 4未満	1 4未満						
	2 4以上16未満	2 4以上16未満						
	3 16以上36未満	3 16以上36未満						
	4 36以上	4 36以上						

なし 記載せず

部位 (仙骨部、坐骨部、大転子部、踵部、その他)

文 献

- 1) Kosiak M: Etiology of decubitus ulcers. *Arch Phys Med*, 42: 19-29, 1961.
- 2) Rogers J & Wilson LF: Preventing recurrent tissue break downs after pressure sore closures, *Plast Reconst Surg*, 56: 419-422, 1975.
- 3) 田中靖子ほか: 褥瘡発生予防と治療に関する研究 (第3報), 神戸看護大紀, 13: 1-11, 1994.
- 4) 須釜淳子: 褥瘡を予防する 適切な体位と寝具. 褥瘡のすべて. 宮地良樹, 真田弘美編, pp13-22, 初版, 永井書店, 東京, 2001.

参考図書

石川 治: 保存的治療. 褥瘡の予防・治療ガイドライン. 宮地良樹編, pp64-89, 初版, 照林社, 東京, 1998.



◆特集/実践創傷治療 ABC
褥瘡の評価と治療

石川 治*

Key words : 褥瘡の分類法, DESIGN 分類, デブリドマン(debridement), wound bed preparation, TIME

Abstract 褥瘡の局所治療において最も重要なポイントは wound bed preparation の実行である。壊死組織を除去して肉芽形成機転を胎動させ、細菌感染と滲出液を適切にコントロールすることにより肉芽組織の増生と上皮化を図る。肉芽形成が進んだにもかかわらず創治療が停滞する原因は、創の圧迫と不適切な水分バランスであることが多い。阻害因子を同定するには、創の状態を正しく把握できる観察力が不可欠である。

はじめに

褥瘡局所治療の概念は、さまざまな原因によって生じる慢性皮膚潰瘍の局所治療にも適応することができる。本稿では褥瘡局所治療の基本的事項と最近のトピックスについて説明する。

1. 発症からの経過による分類

発症間もない褥瘡では壊死の及ぶ範囲や深さを正確に把握できない。この時期の褥瘡を急性期褥瘡と呼ぶ。経過とともに周囲健全皮膚との境界が明瞭となり、壊死の及んだ範囲が明らかとなるが、壊死の及んだ深さ(深達度)を外観から判断することは難しく、デブリドマン後に初めて壊死の及んだ深さが明らかとなる。皮下脂肪組織以下にまで壊死が及んだ褥瘡では、治癒までに数か月、ときには1年以上の期間を要する。このような時期の褥瘡を慢性期褥瘡と呼び、急性期褥瘡と区別する。

発症間もない急性期褥瘡は紅斑、水疱を呈し、壊死の及ぶ範囲や深さは不明である。透明なポリウレタンフィルムを患部に貼布して患部を毎日観察していると、1~2週間で壊死の及んだ範囲が明

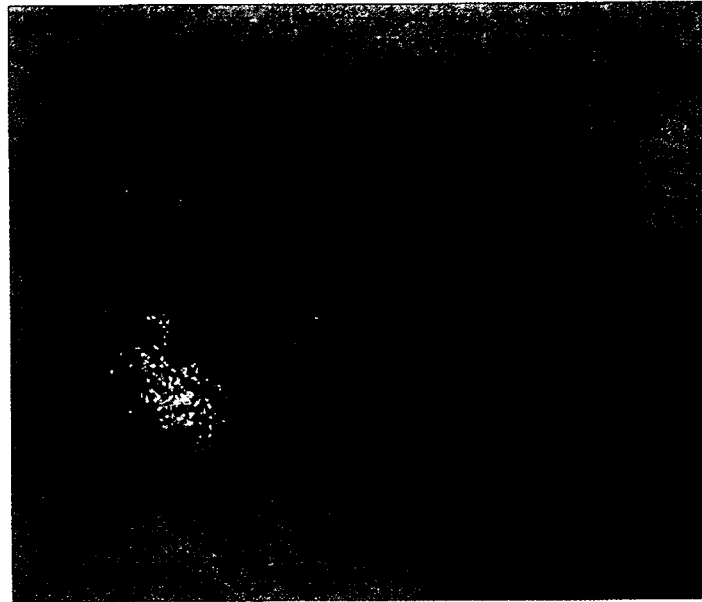


図 1. 急性期褥瘡

広がりを持つ紫斑の存在は、真皮深層以下に壊死が及んだことを示唆する。慢性期褥瘡へ移行する可能性が高い。

らかとなる。広がりを持つ紫斑の存在は壊死が真皮深層以下に及んだことを示唆しており(図1)、このような褥瘡は治癒までに時間のかかる慢性期褥瘡へと移行する可能性が高いと判断してよい。壊死の及ぶ深さが表皮にとどまる褥瘡には創傷被覆材を貼布して患部の保護を行う。真皮浅層にとどまる浅い褥瘡であれば後述の白色期の治療を行う。

* Osamu ISHIKAWA, 〒371-8511 前橋市昭和町 3-39-22 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学, 教授

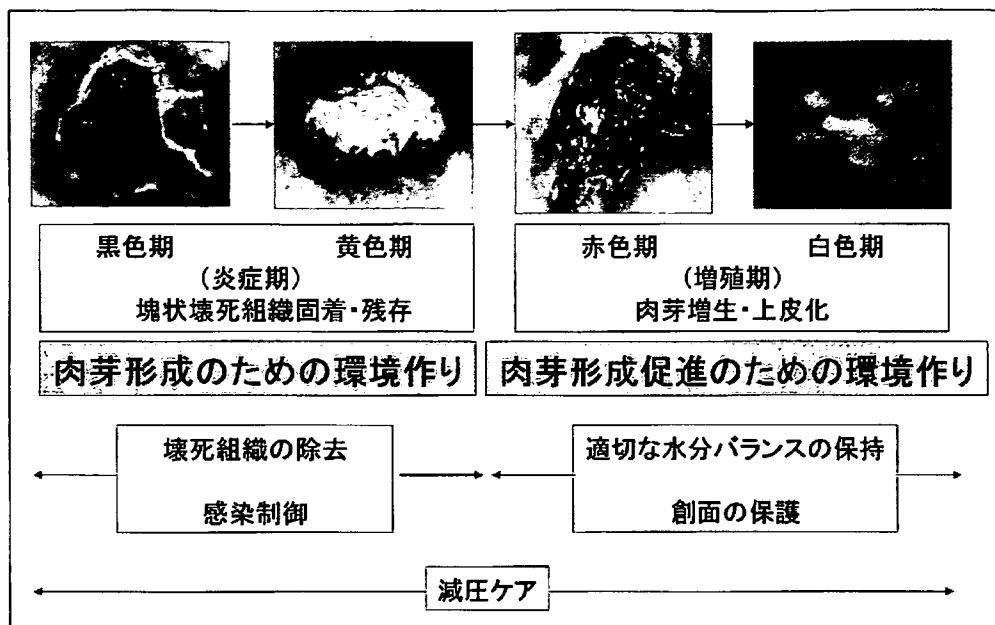


図 2. 褥瘡創面の色調による病期分類と治療目標

2. 褥瘡の重症度による分類

IAET (International Association for Enterosomal Therapy) 分類, NPUAP (National Pressure Ulcer Advisory Panel) 分類, Shea の分類などがある^{1)~3)}. 各分類によって微妙に定義が異なる. 本邦では, 1998 年に発刊された褥瘡の予防・治療ガイドラインに記載された分類を用いることが多い⁴⁾. すなわち, I 度は圧迫を除いても消褪しない紅斑, II 度は真皮にとどまる皮膚損傷(水疱, びらん, 浅い潰瘍), III 度は皮下脂肪組織までの損傷, IV 度は筋肉, 腱, 関節包, 骨に及ぶ損傷, 以上の 4 段階に分類する.

3. 褥瘡の病期分類

ヨーロッパでは色調による褥瘡の状態評価 (red-yellow-black wound description system) が以前から使用されていた⁵⁾. 本邦でも, 褥瘡創面の色調が創の治癒過程を反映しているとの考えに基づいて, 福井が新たな褥瘡病期分類法を提唱した⁶⁾. この分類法は, 褥瘡の治療・予防ガイドラインに引用されたのを契機として, 臨床現場で広く利用されるようになった. その後, 日本褥瘡学会が DESIGN(-P) 分類を提唱した⁷⁾.

褥瘡創面の色調による病期分類法と治療の実際⁸⁾ (図 2)

この分類は, 壊死が脂肪組織以下に及ぶ深い褥瘡の創面が, 黒色(期)→黄色(期)→赤色(期)→白

色(期)と順次変化しながら治癒に向かうという事実に基づいており, 簡便であり臨床的有用性が高い. 黒色期は塊状の壊死組織の付着, 黄色期は脂肪組織および筋肉主体の壊死組織の残存, 赤色期は肉芽形成, 白色期は創の収縮と上皮化を反映している.

医師は創面の色調を評価し, 各病期の治療目標の設定と目標達成のための治療手段・治療薬を選択して治療する. 具体的には, 黒色~黄色期(炎症期)では壊死組織除去, 感染の制御を行い「肉芽形成のための環境作り」を, 赤色~白色期(増殖期)では創面の適切な水分バランスの保持と保護を行い「肉芽形成および上皮化促進のための環境作り」を目指す. これらは, 後述する wound bed preparation および TIME の概念と一致している.

1. 黒色~黄色期(炎症期)の治療—デブリドマンの意義

壊死組織は肉芽形成を妨げるばかりでなく, 細菌感染の温床となるので速やかに除去することが望ましい. 壊死組織は生体にとっては異物と化しており, これを除去しようとする生体反応(炎症)が起こる. この炎症反応が持続する限り, 肉芽形成は始まらない. 従って, 壊死組織の除去によって炎症期をできるだけ短くすることが治癒期間の短縮につながる. 褥瘡におけるデブリドマンの有用性を検討した報告はないが, 糖尿病性潰瘍ではデブリドマンを頻回に行うことにより治癒が促進