

的に処理して特定の記載的な所見と関連づけた。

1) 分子篩クロマトをもちいた解析:

添付資料に示すように典型的な褥瘡肉芽組織において表面蛋白質を抽出し、変性溶媒下で分子篩によって分画した。フラクションをドットプロットするとともに、ヒアルロン酸への結合アッセイをおこなった。褥瘡では予想されたとおり急性創傷とは異なった蛋白パターンを呈した。またポイド分画のパーシカン[®]はヒアルロン酸に結合しなかった。さらにポイド分画をロータリーシャドウイング電子顕微鏡にて解析した。

2) 創表面からの TGF- β 結合蛋白質である LTBP-1 断片の意義と創傷治癒との関連性の統計的な解析:

複数の褥瘡創面から綿棒にて蛋白質を採取し、グアニジン塩酸にて抽出した後に免疫ブロット法にて解析した。LTBP-1 断片はプラスミンにて形成され、創表面から同定できた。LTBP-1 断片は浮腫性で肉芽形成時に有意に認められ、TGF- β 活性化におけるその断片の予想される生物学的な活性から説明された。さらに創傷表面分子断片の生物学的な意義 LTBP-1 分子を例として示した。

3) 簡便なドットプロットによる創面簡易評価の試み:

異なる分子の相対的な比が創の所見によって異なることを示した。例えばパーシカンのC末に対するモノクローナル抗体である2B1は壊死組織表面や創の摩擦が考えられる時に検出される一方で、ファイブロネクチンは比較的平坦な創と偽膜様の創に認められた。

D. 考察

本分担研究による創表面細胞外マトリックス蛋白解析を用いた褥瘡病態の分子診断の枠組みが整備されるとともに、今まで解明されていなかった慢性創傷の病態を解明する糸口を見つけた。創表面から検出される細胞外マトリックス分子は創傷治癒過程において遊離してきた分子であり、その意義と検出をすることで創の病態が類推可能になる。分子篩クロマトを用いた解析では高分子のマトリックス断片の存在も示されたものの、多くの蛋白質は中-低分子

領域に分画された。いわゆる褥瘡のような慢性創傷においては急性創傷と違った創表面蛋白プロファイルを示した。さらに強力な創傷治癒促進因子である TGF- β を細胞外に貯蔵し、遊離する機能をもつ LTBP-1 の分子断片がプラスミン依存性に創面から遊離されることを示した。これらは肉芽形成期に有意にみられた。一般に TGF- β は筋線維芽細胞の誘導など肉芽形成期に働き、むしろ上皮化を妨げる働きがある。それ故、この結果は臨床における創の病態を説明しうる。さらに簡易な病態分類のツールとして複数のモノクローナル抗体を用いた創表面の細胞外マトリックス分子の定性的解析が可能であった。これらの適切なマーカーを組み合わせることで褥瘡医療の標準化に用いることが可能である。

E. 結論

褥瘡創表面細胞外マトリックス蛋白解析において急性創傷との違いが示された。さらに成長因子や接着蛋白質の機能を説明しうる分子断片の検出と、創所見との関連性を見出した。また複数の細胞外マトリックス分子を定性的に解析する系を開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Mizuno K, Wachi H, Isogai Z, Yoneda M., Fujii S, Watanabe K, Seyama Y. Availability of Latent TGF- β binding protein-1 (LTBP-1) in Wound Healing. J Health Sci. 2009;in press.

2. 学会発表

- 村澤裕介, 折居千賀, 米田雅彦, 渡辺 研, 篠村多摩之, 木全弘治, 磯貝善蔵. 褥瘡創面におけるパーシカンの状態とその意味: マイクロファイブリルとヒアルロン酸をめぐる水のマトリックス. 第40回日本結合組織学会・第55回マトリックス研究会合同学術集会. 2008. 5. 29-31, 東京.
- Isogai Z, Murasawa Y, Mizuno K, Watanabe K

Yoneda M. Woundermatology: Analyzing ECM fragments in pressure ulcer wound. 4th National Meeting of American Society for Matrix Biology, 2008. 12. 7-11, San Diego, CA, U. S. A.

- ・ 村澤裕介、折居千賀、米田雅彦、渡辺 研、篠村多摩之、木全弘治、磯貝善蔵. 褥瘡創面におけるパーシカンの状態とその意味；マイクロファイブリルとヒアルロン酸をめぐる水のマトリクス. 第40回日本結合組織学会・第55回マトリックス研究会合同学術集会. 2008. 5. 29-31, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

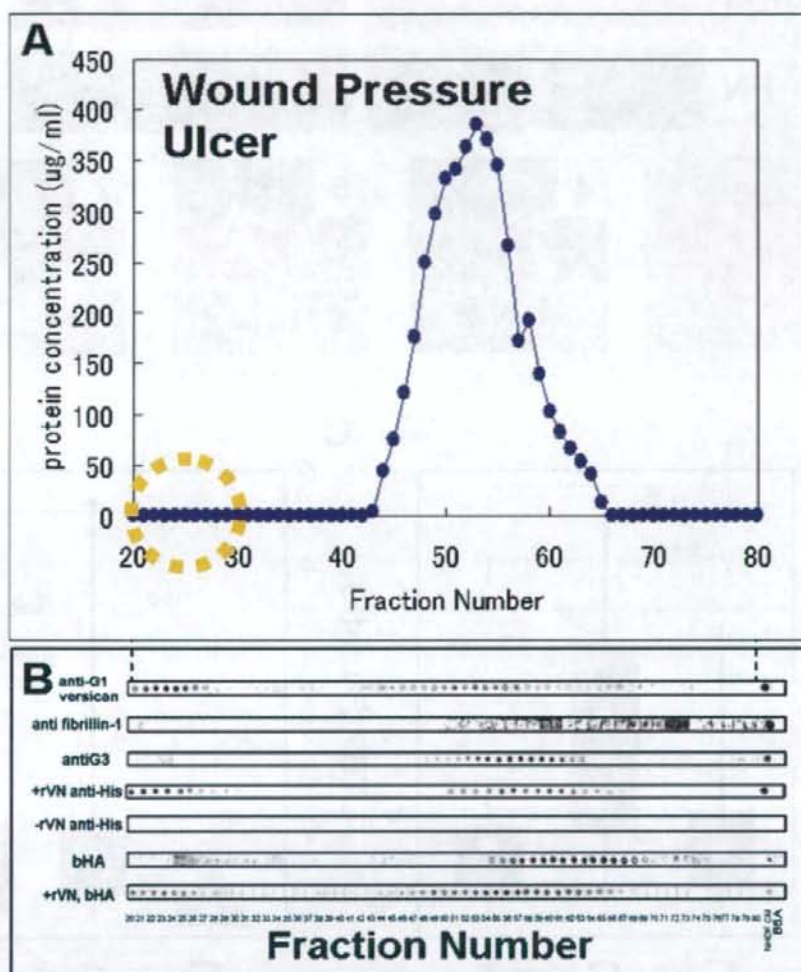
なし

研究協力者

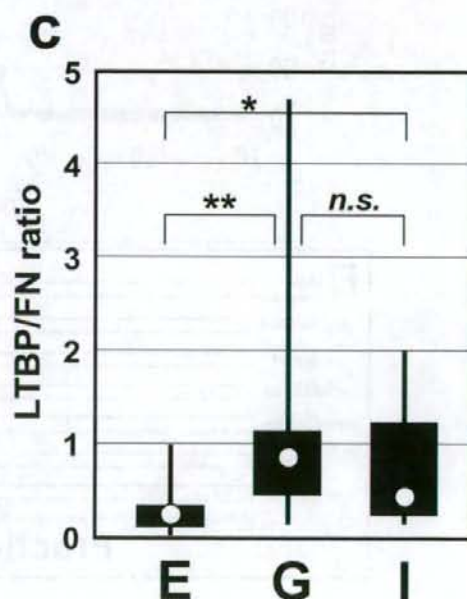
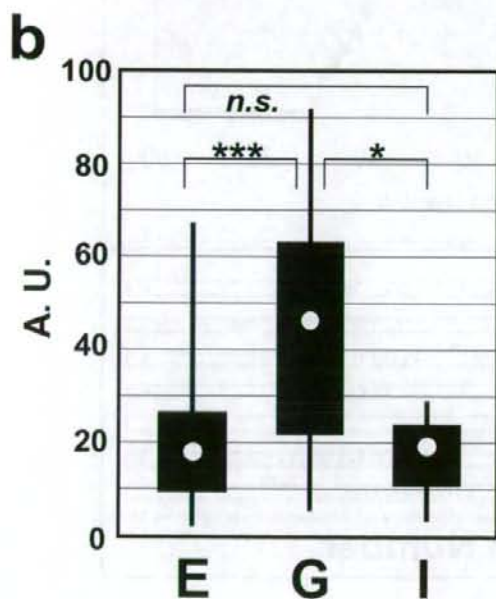
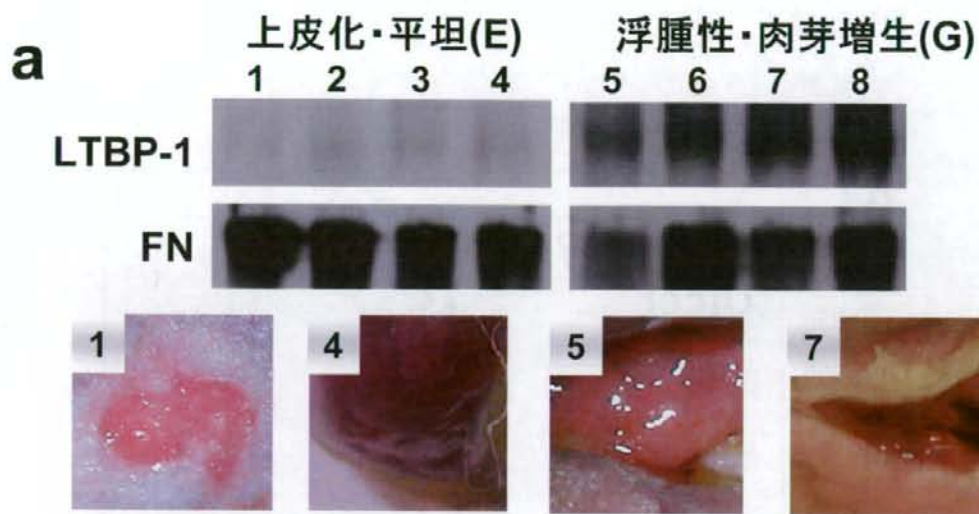
村澤 裕介 (国立長寿医療センター)

折居 千賀 (国立長寿医療センター)

分担研究報告
 褥瘡創表面蛋白解析とその意義
 (担当：渡辺 研)



浮腫性肉芽を呈した褥瘡創面から採取したガーゼを6モルグアニジン塩酸にて蛋白を抽出し、グアニジン塩酸存在下でCL-2Bセファロースを用いてゲルろ過にて分画した。各画分について蛋白定量した後に特異的抗体を用いたドットプロットと固層での結合アッセイをおこなった。高分子のポイド画分にはヒアルロン酸に結合しないパーシカンが存在した。



免疫ブロットによる異なる創表面からのLatent TGF-beta binding protien-1(LTBP-1)とファイブロネクチンの解析

- a) 創面によって表面蛋白質のパターンが異なる。浮腫性の肉芽組織からLTBP-1断片が認められる。
- b) 統計的解析によっても創所見によって差異がある。

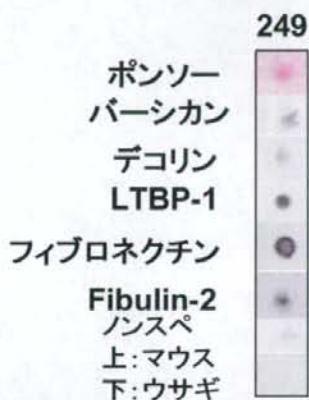
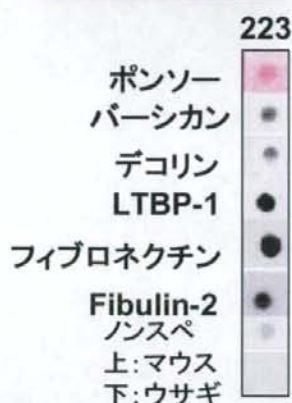
パーシカンは壊死と偽膜をみわけるマーカーになる

a)

壊死

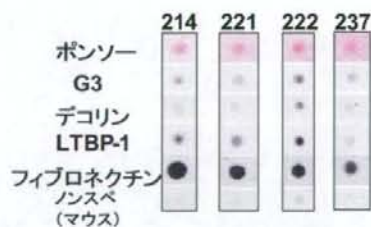
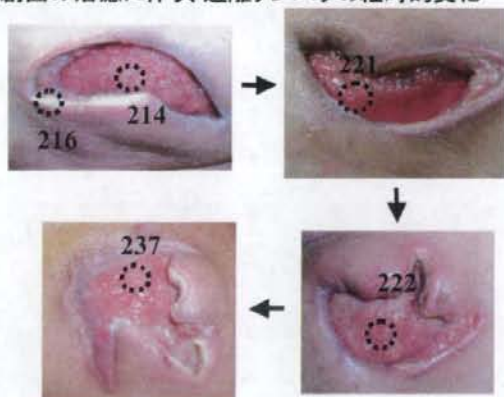


偽膜



b)

創面の治癒に伴う、遊離タンパクの経時的変化



複数の抗体を組み合わせた免疫ドットプロットによる創病態解析の試み。

a) 同じ白色で、壊死と偽膜を見分けるマーカーになりうる。

b) 創面治癒経過に応じた相対的な創表面細胞外マトリックス分子の変化

病理学的検討による褥瘡の病態解析

分担研究者 森 将晏 岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究要旨

褥瘡は圧迫、ずれ、感染などの外因と共に、年齢、栄養状態、などの内因および、病歴、治療等により多様な病態を示す。この多様な病態を解明し、分類することで早期の治癒を計ることが出来る。我々は現在までに褥瘡の肉眼所見と組織所見との関係、および細胞外マトリックス蛋白との関係について報告してきたが、今年度は褥瘡の治癒力に関係する増殖細胞に発現する蛋白(MIB-1)、および加齢関連蛋白(p16)について検討を行った。表皮の潰瘍辺縁部および肉芽層ではp16の発現が見られ、陽性細胞数はMIB-1陽性細胞数とは逆相関していた。線維化層にはMIB-1陽性細胞はほとんど見られないが、p16陽性細胞が多数見られる症例が存在した。年齢とは表皮p16陽性細胞数、および線維化層p16陽性細胞数と軽度の相関が見られ、罹病期間と線維化層p16陽性細胞数にも軽度の相関が見られた。これらのことからp16陽性細胞数は増殖の盛んな表皮および肉芽部ではMIB-1陽性細胞数と逆相関しており、細胞の加齢と共に増殖能が低下していることを伺わせた。また、表皮のp16陽性細胞数は患者の年齢と、線維化層のp16陽性細胞数は患者の年齢および、罹病期間と相関傾向を示しており、これらの因子が細胞の老化に関与し、褥瘡の治癒を遷延させていると考えられる。

A. 研究目的

褥瘡は肉眼的に多彩な像を示しており、その病態は多様である。多様な病態は本研究班で注目している細胞外の因子とともに、高齢者に多いことから細胞増殖に関わる因子も重要である。さらに潰瘍組織において細胞増殖を司る因子は非常に重要と予想される。今年度の本分担研究では褥瘡潰瘍組織における細胞増殖制御因子を免疫組織学的に検討した。

B. 研究方法

外科的治療目的で切除された褥瘡潰瘍組織18症例について加齢関連蛋白(p16)抗体および増殖細胞に対する抗体(MIB-1)にて染色した。評価は表皮、肉芽層、線維化層のそれぞれの部位で、p16陽性細胞が最も多い部分についてMIB-1陽性細胞、年齢、罹病期間と比較検討した。陽性細胞数は肉芽層および線維化層については以下のようにしてスコア化した。0:陰性、1:稀に陽性、2:10倍視野で陽性細胞が20個以下、3:10倍視野で20-50個の細胞が陽

性、4:10倍視野で50個以上の細胞が陽性。また、表皮については0:陰性、1:稀に陽性、2:1/3以下の基底細胞が陽性、3:1/3-2/3の基底細胞が陽性、4:2/3以上の基底細胞が陽性、とした。個人情報保護は指針に従った。

C. 研究結果

p16の発現は病変の部位により差が見られ、表皮では9/16例の潰瘍辺縁部にp16の発現が見られ、陽性細胞数はMIB-1陽性細胞数とは逆相関していた。肉芽層でもp16陽性細胞数とMIB-1陽性細胞数は逆相関していた。線維化層はもともと増殖細胞は少なく、両者の間に相関は見られなかった。年齢とは表皮p16陽性細胞数、および線維化層p16陽性細胞数と軽度の相関が見られ、罹病期間と線維化層p16陽性細胞数にも軽度の相関が見られた。

D. 考察

p16陽性細胞数は増殖の盛んな表皮および肉芽部で

はMIB-1陽性細胞数と逆相関しており、細胞の加齢と共に増殖能が低下していることを伺わせた。また、表皮のp16陽性細胞数は患者の年齢と、線維化層のp16陽性細胞数は患者の年齢および、罹病期間と相関傾向を示しており、これらの因子が細胞の加齢に関与していると考えられる。

E. 結論

高齢者や罹病期間の長い症例では、表皮や肉芽を形成する細胞に老化が起り、治癒が遅延することを明らかにした。そのため早期の適切な治療が大切である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ 森 将晏、小山恵美子、褥瘡潰瘍におけるリンパ管分布の組織学的検討、日本褥瘡学会誌、2008;10:23-7.

・ 森 将晏、遠藤明美、押本由美、背上げ時における殿部の圧迫を軽減するクッションの作成とその効果の検討、日本褥瘡学会誌、2009;11:40-6.

2. 学会発表

・ 森 将晏、褥瘡病理所見の多様性（ワークショップ）、第10回日本褥瘡学会学術集会、2008. 8. 29-30、神戸

・ 森 将晏、押本由美、小山恵美子、磯貝善蔵、褥瘡潰瘍における各種細胞外マトリックス蛋白の局在について、第10回日本褥瘡学会学術集会、2008. 8. 29-30、神戸

・ 押本由美、遠藤明美、森 将晏、繰り返しのずれ負荷が褥瘡形成に与える影響、第10回日本褥瘡学会学術集会、2008. 8. 29-30、神戸

・ 道繁祐紀恵、森 将晏、除圧を考慮した側臥位角度の検証－標準マットレスと体圧分散マットレスを用いて－、第10回日本褥瘡学会学術集会、2008. 8. 29-30、神戸

・ 遠藤明美、押本由美、道繁祐紀恵、森 将晏、フアー第一位時の臀部圧軽減に効果的な背上げ方法の検討、第34回日本看護研究学会学術集会、2008. 8. 20-21、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究協力者

小山恵美子（倉敷平成病院）

褥瘡創面に応じた外用薬物療法の製剤学的基盤

分担研究者 藤井 聡 名古屋市立大学大学院薬学研究科病態解析学分野・教授

研究要旨

褥瘡の科学的根拠に基づいた医療（Evidence Based Medicine 以下 EBM）は、現在なお確立されていないものが多い。その大きな要因は本研究班で明らかにしたような褥瘡の生物学的多様性ともいえる。褥瘡創面の多くは細菌がコロナイゼーションした状態であるものの、消毒剤の使用をめぐる、臨床現場において長年議論がなされている。細胞傷害性を懸念して消毒剤の使用を極力控えるようすすめる医療者も多い一方、日本褥瘡学会が 2005 年に発表した褥瘡局所治療ガイドラインでは感染が十分に制御できていない褥瘡には躊躇せず消毒剤を使用することが薦められている。本分担研究では、褥瘡治療の代表的消毒剤であるヨウ素製剤で適正使用を確立することを目的に、現在臨床で使用されている外用ヨウ素製剤の反応特性を明らかにした。実際の創面由来の褥瘡滲出液も用いて検討した結果、殺菌作用の点から創面でも持続して効果を発揮できるカデックス軟膏が有利であると考えられた。一方細胞傷害性の点からは創面に対して強く反応しすぎないユーバスタの方が有利であると考えられた。肉芽の形成が進行した褥瘡では細胞傷害性がより強いと考えられるカデックス軟膏は使用を控えた方がよく、ユーバスタはそのような褥瘡に対しても適用可能である可能性が考えられた。本研究で得られた結果は、現在まで注目されていなかった創傷の薬理学、薬理学に値するものであり、褥瘡治療における適正な外用薬物使用の指針になる。

A. 研究目的

褥瘡の創面のほとんどは創面細菌とのいわば共存した状態である。これらの感染の制御と創傷治癒とのバランスが褥瘡の外用薬物療法治療に必要とされている。

それらの目的のために、本邦で褥瘡に用いられる外用ヨウ素製剤であるユーバスタ（白糖・ポビドンヨード配合剤）とカデックス軟膏（ヨウ素・カデキソマー）が上市されている。これらの薬剤ではヨウ素は、ヨードフォアと呼ばれるヨウ素内包型高分子ポリマーとして存在する。ヨードフォア中のヨウ素の存在様式がユーバスタ（I₃）とカデックス軟膏（I₂）で異なることに着目し、存在様式の違いによって反応性に差異が生じているかを明らかにすることを目的とした。また、ユーバスタ、カデックス軟膏、ヨードコート

モデルからの吸水性を評価することによりヨウ素製剤の同等性を比較することも目的とした。

B. 研究方法

さまざまな濃度のユーバスタおよびカデックス軟膏と、チロシン、レシチン、および褥瘡滲出液を、PBS 中、30℃温浴下で、それぞれ反応させ、反応液を経時的に採取し、デンプン-ヨウ化カリウム溶液中で、チオ硫酸ナトリウムにより滴定した。その後、滴定量から反応液中の残存ヨウ素量を算出した。ヨウ素の放出性と創面モデルからの吸水性評価にはシリコン膜を隔壁とした並列拡散セルの一方に、PBS にヨウ素濃度 0.1w/v%で溶解したユーバスタ、カデックス軟膏、ヨードコート

子型ヨウ素量を求めた。別に、300k 分子量カットの透析膜を隔壁としたフランツセルの下側に 5%BSA-Hanks 緩衝液を入れ、上側に薬剤を各々1.2g 装着させた。30℃の条件で各製剤が吸収した水の量を経時的に計測した。

C. 研究結果

反応時間に対して残存ヨウ素量を片対数プロットしたところ、結果はいずれも直線的な減少を示した。したがって、これらの反応におけるヨウ素の消失は、一次反応速度式に従うと考えられた。この式に基づいて反応速度定数を求め、新たに、初期ヨウ素濃度に対して反応速度定数をプロットした。カデックス軟膏とレシチンの反応を除いた3つの反応において、グラフは、ヨウ素濃度 0.07w/v%付近で反応速度定数が最小値となるU字型カーブを描いた。すなわち、0.07w/v%以下では、ユーバスタ (I_3) およびカデックス軟膏 (I_2) とともに、チロシンおよびレシチン両者に対して、濃度反比例的な反応効率を示すことがわかった。これは、通常の希薄溶液で考えられる濃度非依存的な一定の反応効率とは全く異なる現象であった。また、両ヨウ素製剤ともにほとんどの濃度で、チロシンに対する反応性がレシチンに対する反応性を上回っていた。一方、0.07w/v%~0.1 w/v%のカデックス軟膏に限っては、その反応性が逆転していた。したがって、 I_3 と I_2 の、チロシンおよびレシチンに対する反応選択性は、低濃度 (0.01~0.07w/v%) の領域では似ているが、0.07w/v%~0.1 w/v%の領域では異なる挙動を示すことが明らかとなった。このことから、臨床において使用する濃度 (約 0.1w/v%) では、ユーバスタはチロシン選択性が強く、カデックス軟膏はレシチン選択性が強いと言える。ヨウ素の放出性と創面モデルからの吸水性評価では溶解時の分子型ヨウ素の濃度はカデックス軟膏が最も高く、ヨードコート、ユーバスタの順であった。カデックスから遊離した分子型ヨウ素量はユーバスタの9倍であった。吸水性を吸水速度で比較すると、ユーバスタが最も速く1時間で自重の2.3倍を吸収して完全に溶解した吸水速度はヨードコート、カデックスの順に低下し、時間とともに徐々に吸水速度

が遅くなった。

D. 考察

褥瘡滲出液を用いた研究では、ユーバスタはカデックス軟膏の約4倍の反応効率を示した。臨床において、ヨウ素製剤はまず滲出液と反応し、次にそれを透過して創面に作用する。したがって今回の結果から、ユーバスタは、滲出液中でカデックス軟膏より多くのヨウ素を消費し、創面と反応し得る残存ヨウ素がカデックス軟膏よりも少なくなっていることが示唆された。したがって、殺菌作用の観点からは、持続的にヨウ素を放出できるカデックス軟膏の方が有利であり、細胞傷害性の観点からは、創面に対してよりマイルドな作用を示すユーバスタの方が有利であると予測された。この予測は、滲出液の少ない褥瘡に対してカデックス軟膏はユーバスタよりも明らかに予後を悪くするという専門家による臨床経験と一致するものであった。溶解試験でも溶解時の総ヨウ素濃度は等しいにもかかわらずヨウ素製剤から遊離した分子型ヨウ素量が異なることから、殺菌作用および創傷面への毒性が異なると考えられる。

E. 結論

本分担研究の結果から殺菌作用の点からは、創面でも持続して効果を発揮できるカデックス軟膏が有利であると考えられる。細胞傷害性の点からは、創面に対して強く反応しすぎないユーバスタの方が有利であると考えられる。ヨウ素製剤を使用する際には製剤の特性に留意した使い分けが必要であることが示された。褥瘡の病態に応じた薬物療法の薬学的な基盤としての本研究の重要性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Noda Y, Fujii K, Fujii S. Critical evaluation of cadexomer-iodine ointment and povidone-iodine sugar ointment. Int J Pharm.

2009;in press.

- ・ 藤井 聡. 抗凝療法の現状と今後の展開 3 静脈血栓塞栓症に対する抗凝固療法—薬剤特性— International Review of Thrombosis. 2008;3:31-35.

2. 学会発表

- ・ Fujii S. Interaction between inflammation and fibrinolysis and its pharmacological control. Pan-Pacific International Partnership Conference on Pharmaceutical and Life Sciences (The 4th US-Japan Joint Conference) (生命薬科学環太平洋国際パートナーシップ会議). 2008. 2. 22, 名古屋
- ・ 藤井 聡. 血栓症治療薬の現状. 日本薬学会第128年会. 2008. 3. 26, 横浜
- ・ 藤井 聡, 磯貝 善哉. 創傷治癒モデル動物と褥瘡の病態との関連性. 第10回日本褥瘡学会学術集会. 2008. 8. 29, 神戸
- ・ 藤井 聡. くすりを創る、マウスから学ぶ、病氣と闘う. 名古屋市立大学薬学部平成20年度オープンキャンパス. 2008. 8. 4, 名古屋
- ・ 藤井 聡. 文部科学省 平成20年度サイエンスパートナーシップ・プロジェクト事業 講座型学習活動プランA 臨床薬剤師への教育と研究「医師が望むこれからの薬剤師」 2008. 8. 8, 名古屋
- ・ Furumoto T, Fujii S, Goto D, Tsutsui H. Daidzein, Soy Phytoestrogen, Selectively Ameliorates Obesity-Related Hypertension in Mice and Humans Without Affecting Other Metabolic Derangements. 8th International Symposium on the Role of Soy in Health Promotion and Chronic Disease Prevention and Treatment. 2008. 11. 11, 東京
- ・ Fujii S, Miyagawa R, Iwaki S, Nakamura T, Noda Y. Pathobiological Aspects of Thrombotic Tendency in Metabolic Syndrome and a Potential Favorable Action of Oligonol as an Antioxidant. Functional Polyphenol Symposium 2008. 7. 25, 札幌
- ・ 野田 康弘, 藤井 聡, 永田 実. ヨウ素製剤

の滲出液中における反応性の解析. 第10回日本褥瘡学会学術集会. 2008. 8. 30, 神戸

- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

研究協力者

野田 康弘 (金城学院大学)

水野 晃治 (星薬科大学)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名・ページ・出版年
<u>磯貝善蔵</u>	高齢者医療の中での褥瘡	皮膚病診療	2008;30 Supple. 108
<u>磯貝善蔵</u>	褥瘡対策チームの薬剤師-医師の観点から	月刊薬事	51, 187- 190, 2009
Abe M, Yokoyama Y, Syuto T, Ishibuchi H, <u>Ishikawa O.</u>	Interleukin-6 counteracts effects of cyclosporin A on extracellular matrix metabolism by human dermal fibroblasts.	Cell Tissue Res	2008;333:281-8
立花隆夫, 松井優子, 須釜淳子, 中山健夫, <u>古田勝経</u> 他	学術委員会報告-DESIGN改訂について (添付書類にはなし)	日本褥瘡学会誌	2008;10:586-96
<u>森 将晏</u> , 小山恵美子	褥瘡潰瘍におけるリンパ管分布の組織学的検討	日本褥瘡学会誌	2008;10:23-7
<u>森 将晏</u> , 遠藤明美, 押本由美	背上げ時における殿部の圧迫を軽減するクッションの作成とその効果の検討	日本褥瘡学会誌	2009;11:40-6
Noda Y, Fujii K, <u>Fujii S.</u>	Critical evaluation of cadexomer-iodine ointment and povidone-iodine sugar ointment.	Int J Pharm	2009;in press

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名・出版地	出版年・ページ
<u>磯貝善蔵</u>	褥瘡		高齢者を診療する医師のための研修カリキュラム	財団法人長寿科学振興財団	2008;93-6
<u>石川 治</u>	急性期褥瘡と慢性期褥瘡 (経過による分類)は?		現場の疑問に答える褥瘡診療Q&A	中外医学社・東京	2008;132-3
<u>石川 治</u>	褥瘡	日本老年医学会編	老年医学テキスト	メディカルレビュー社・東京	2008;116-2 1
永井弥生, <u>石川 治</u>	褥瘡がみえる-褥瘡アセスメントに苦慮しているあなたのために (添付書類にはなし 書籍全体のため)	永井弥生, <u>石川 治</u>	褥瘡がみえる-褥瘡アセスメントに苦慮しているあなたのために	南江堂・東京	2008. 4

古田勝経	抗潰瘍治療薬ーどの外用剤がどの程度水を吸うの？	宮地良樹 他 編	皮膚病治療薬 Q&A	中外医学社・東京	2008;123-4
古田勝経	褥瘡の外用療法は？どんな外用剤があるの	宮地良樹 他 編	褥瘡診療 Q&A	中外医学社・東京	2008;168-7 7
森口隆彦, 真田弘美, 古田勝経 他	在宅褥瘡予防・治療ガイドブック (添付書類にはなし)	日本褥瘡学会 編	在宅褥瘡予防・治療ガイドブック	照林社・東京	2008
古田勝経	褥瘡 (添付書類にはなし)	池田宇一 他 編	病気と薬パーフェクトガイド 2008	南山堂・東京	2008;1203-6

IV. 研究成果の刊行物・別刷

次ページより

高齢者医療の中での褥瘡

磯貝 善蔵

(国立長寿医療センター先端医療部先端薬物療法科)

ここ国立長寿医療センターは、2004年3月に高齢者医療に関するさまざまな問題を解決していくために、愛知県に設立されたわが国で6番目のナショナルセンターです。皮膚科医として着任した私に与えられた主要課題は褥瘡でありまして、ここでの褥瘡の診療と管理、研究を任せられることになりました。それまでは褥瘡診療に関して多くの経験はなく、むしろ膠原病や血管炎の診療を中心にしていましたが、このセンターのさまざまなスタッフに協力していただき、一歩ずつ勉強してまいりました。褥瘡に詳しい薬剤師の古田勝経副薬剤師部長のご協力が支えになりました。

しかし褥瘡診療を勉強していく過程においては驚くことばかりでした。学会に参加してみても褥瘡に関する診療体系が確立されておらず、ラップ療法などのさまざまな方法が医療現場で行われている状況です。さらにチーム医療といっても診療に参加する職種もさまざまで、医師の役割と責任の所在も曖昧に感じました。また高齢者医療では社会的な要素が大きく関与するため、患者さんの個性が強く標準化しにくいと感じました。褥瘡医療の現場は必死ではあるのですが、治癒や改善という結果が出なければ精神的に疲弊することになります。そこで自分の置かれた立場である病院皮膚科医であり研究機関勤務としての立場を最大限活かして、褥瘡医療の問題を解決していこうとしました。

第一に病院皮膚科医としての褥瘡への取り組み方を工夫しました。高齢者はさまざまな臓器に疾患を抱えており、包括的な診療と専門的な診療を上手に使い分けることが求められています。皮膚科医は包括的な視点と局所的な視点をバランスよく使い分けることができるので、高齢者に対する良質な病院医療を行ううえで重要な職種と思います。病院皮膚科医は他科医師のみならず薬剤師、看護師、理学療法士、ソーシャルワーカーなどの情報交換や相談をする機会がとて多く、彼らは病院皮膚科医の理解者、協力者です。たとえば褥瘡医療に重要な患者さんの併存疾患の予後や安定性、リハビリテーション、看護上の問題点、薬

剤や創傷被覆剤の種類や使用法、退院後の医療、介護サービスの相談などは彼らとの有機的なつながりを持ち、かつ皮膚科医の責任をもって行ってまいりました。私にとっては退院支援会議への出席や地域の一般医との交流も高齢者を取り巻く医療体制を学ぶためのよい機会でした。その上立って褥瘡対策チームの医師がきちんとイニシアチブをとる褥瘡対策チームを構築してまいりました。

診療上心がけたのは、日常診療の中で褥瘡の本質を細かに観察することでした。処置はいわば分割された手術であるにも関わらず、現在まであまり研究されていませんでした。しかし、現場の高齢の褥瘡患者さんやその家族は、できれば処置で治癒することを切に望んでいます。処置の意味を考えながら毎日変化する褥瘡の臨床を診療するのは、病院皮膚科医の義務であるとともに醍醐味であると思います。

研究機関勤務としてはセンター内の運動器疾患研究部と医療工学研究部、そして群馬大学皮膚科、愛知県立看護大学との共同研究を通して褥瘡の疾患としての研究を行っています。褥瘡は医師の関心が十分ではなく、現行の保険診療制度と病院皮膚科医の相対的不足の中で皮膚疾患としての研究の側面が不十分で、むしろケアの延長として看護領域で注目されてきました。しかしながら、褥瘡はしばしば重症の感染性皮膚潰瘍となり、生命予後的にも患者さんや家族の苦痛としても重大な疾患です。疾患としての研究においてはまず褥瘡を疾患レベルまで引き上げることを目標に臨床的、基礎的なアプローチを行ってきました。そのためには疾患をもつ患者さんを治療する現場が大切で、現場からの問題点をどのように研究に翻訳するかを考えてきました。

わが国での医療を支えてきたのは使命感と責任感のある現場医療者であり、昨今いわれている医療崩壊は現場力の低下であるといわれています。褥瘡は多大な現場のチーム力が必要な疾患であり、現場に携わる病院皮膚科医の力量が求められるとともに、その力を最大限発揮できる疾患と感じています。

褥瘡対策チームの薬剤師

——医師の視点から

磯貝 善蔵

ISOGAI Zenzo

▶ 褥瘡対策チームの構成

褥瘡診療にはチーム医療が重要であることは広く認識されており、厚生労働省の告示においても病院における褥瘡対策チームの設置が事実上義務づけられている¹⁾。その告示では、専任の医師と看護師が褥瘡対策チームの必要条件であることが定められている。このような褥瘡対策チームの設置が必要とされた背景には、褥瘡対策は専門的な知識と技術を必要とすることと、病院横断的な対応が必要とされることが理由である。

褥瘡医療の難しい部分は、予防と治療を並行して行う必要があることである。一般に褥瘡対策チームを構成する専門職種は医師、看護師、薬剤師、管理栄養士、理学療法士である。薬剤師はそのなかでも治療部分に大きな力を発揮する職種であり(図1)、専門性を十分に活かして病院での褥瘡対策チーム医療に関わり患者に貢献することが求められている。

医師は褥瘡対策チームの専任となることが定められているが、専従(それだけに従事すること)という立場ではなく、また医師の専門性に関しては規定がない^{1),2)}。そのため、すべての褥瘡対策チーム医師が褥瘡に精通することは現時点では期待しがたい。さらに褥瘡を有する患者を比較的多く診療するような中小規模の病院では、皮膚科などの専門性をもつ医師が常勤していないことが多いのが実情である。医師は本来、対策チームを総括するとともに治療の中心となり、予防と治療を統合する立場の職種である。

薬剤師のチーム医療への参画は今日では一般的である。本稿では褥瘡対策チームでの必要性と役割について、実際に褥瘡対策チームにおいて臨床に携わる医師の立場から述べることにする。

▶ 褥瘡医療の概要と 褥瘡対策チーム薬剤師の必要性

褥瘡はかつて看護の恥とよばれ、疾患としての診療体系が確立されていなかったことは否めない。それゆえに褥瘡はいったん形成されると治癒しないと長年信じられていた。近年、褥瘡に関する知見が増加し、科学的な手法が導入されることによって褥瘡は治癒すべき疾患に変化しつつある。われわれも褥瘡診療のなかで疾患としての医学的な基盤を整備する研究を進めているが、それらの臨床現場への還元にはまだ時間が必要である。病態が解明され治療が体系化されるにしたがって、褥瘡の本質を理解し医師とともに薬物療法を実践できる薬剤師の力

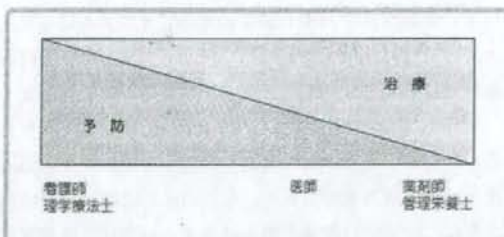


図1 褥瘡対策チームにおける標準的な役割分担

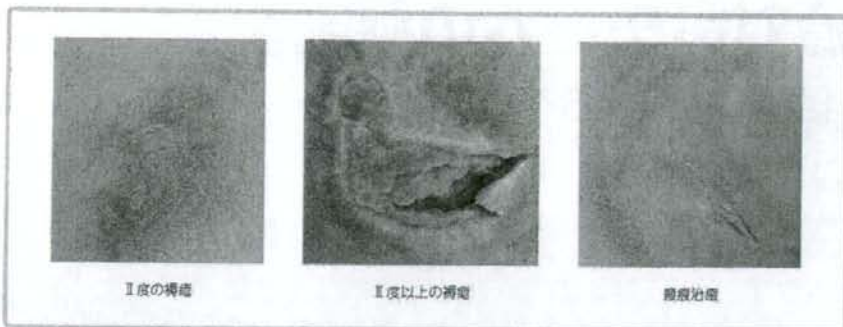


図2 褥瘡の深さによる違い

が必要となってきた。その意味でいえば、褥瘡の疾患としての解明、病態の多様性や治療の根拠が示されつつある現在こそ、褥瘡対策チーム薬剤師が必要とされる状況であるといえる。

▶ 褥瘡を理解するために

褥瘡とは、皮膚表層と骨の間にある軟部組織が圧迫などの外力を受けることで発症する虚血性皮膚潰瘍と定義されている。しかし、褥瘡の病因と病態に相当する悪化要因や治癒阻害要因は非常に多様で複雑である。個々の患者でそれらの要因を明らかにし、要因に応じた対策や治療が行われることが理想である。そのためには褥瘡という疾患が十分解明され、それを正しく理解することが必要である。これは肺炎などの疾患とまったく同様である。

褥瘡への正しい理解には正常の皮膚、皮下組織の構造と機能をおおまかに理解することが大切である。特に、皮膚の物理学的な機能と創傷治癒のメカニズムは重要である。皮膚は、機能の異なった層から形成され、最外層の表皮は分化して角層を形成し、真皮は線維芽細胞とそれが産生する豊富な細胞外マトリックスから形成される。細胞外マトリックスは真皮の機能を果たすための線維構造体に組み立てられる。真皮の多くは膠原線維で形成され、皮下には衝撃を和らげるような脂肪組織が存在する。加齢とともに真皮の物理学的な機能は低下し、皮膚がたるみをもつようになる。さらに皮下脂肪組織や筋肉が減少するために、クッションとしての組織も

減少していく。

褥瘡では、図2に示されるようにⅡ度（真皮）までの浅い褥瘡と、Ⅲ度以上の深い褥瘡に大別するのがわかりやすい。Ⅲ度以上の深い褥瘡は、真皮や皮下脂肪組織が元通りになることである再生によって治癒するわけではなく、肉芽組織の増生をともなって瘢痕治癒する（図2）。このことは、Ⅱ度の褥瘡が上皮化のみを必要とするのとは治癒機転が異なることを理解する必要がある³⁾。

▶ 褥瘡医療における薬物療法の位置づけと重要性

褥瘡の病態は非常に多様である。その多様性は福井の色分類のような病期による分類、また日本褥瘡学会の提唱しているDESIGN分類によって認識されている³⁾。また合併する感染症も種類があり、しばしば重大な問題になる⁴⁾。これらさまざまな褥瘡の病態に対して使用される薬剤も同様に多岐にわたるので、専門医でさえも把握が困難であることが多い。薬剤師は高い専門性をもって薬物治療に参画することでチーム医療に貢献できる。

褥瘡の治療は薬物療法、外科的治療、理学的治療に大別される。創傷被覆剤も広義には薬物療法に含まれるとしてよい。再建手術以外の治療はいわゆる保存的治療とよばれることはあるが、これは正確に実態を反映するのではなく外用薬物治療とよぶべきである。高齢者の褥瘡においては再建に関する手術治療が容易に行える褥瘡はまれであり、万一そのような場合においても、患者やその家族は最も適切な外用治療と手術療法との差異がど

のようなものであるかを知りたがっている。そのため、褥瘡に対する外用薬物治療は治療上最も重要と位置づけられる。

▶ 褥瘡対策チーム薬剤師の専門性

褥瘡対策チームの薬剤師には褥瘡の薬剤の知識（他稿参照）とともに、褥瘡に関する大まかな病態の理解が必要である。褥瘡、皮膚潰瘍を対象とした薬剤は主剤の効能によって分類されているが、基剤もそれと同様、もしくはそれ以上に重要である⁵⁾。なぜならⅢ度より深い褥瘡の治療に必要な肉芽組織は表皮に覆われていないために、組織の水分調節能力が十分でなく、外用剤の水分調節能に影響されやすいからである。さらに肉芽組織は血管に富み、膠原繊維が乏しく変形しやすい。そのため物理学的にも化学的にも薬剤の選択が重要である。さらに在宅においては、外用剤を実際に外用するという行為でさえ、介助者などの社会的な要因に大きく左右される⁶⁾。このように、褥瘡の外用薬物治療は内用剤や注射剤と違った視点が求められている。

褥瘡対策チーム薬剤師は、臨床場において多岐にわたる褥瘡治療薬や材料に精通して、病態に基づいた薬剤の提案ができることが望ましい。さらに創傷被覆材は現在上市されているものでも数多くあるので、それらの位置づけと外用剤と使い分けができることも求められる。しかし、創傷に用いられる薬剤の薬理学的な情報は現時点では十分とはいえない。さらに創傷という自然治癒すべき疾患では、その効果判定が容易でない面がある。実際に褥瘡対策チームに参画して薬理学の臨床的応用を実践し、経験することは大きな意味があると考えられる。

基剤の特性に留意した外用療法の実践には、褥瘡の病態を把握する必要がある。簡潔に分けると、①急性期で壊死組織の除去を必要とするのか、②肉芽組織の増生を目的とするのか、③上皮化を目的とするのか、④感染の制御を目的とするのか——であり、本来的には医師の仕事ではある。それを踏まえて、主剤の作用と基剤の特性を活かしながら外用治療を選択することが重要であり、薬剤師の専門性が発揮される。これらの治療方針の選択は、褥瘡外用治療の基礎知識（他稿参照）とともに臨床

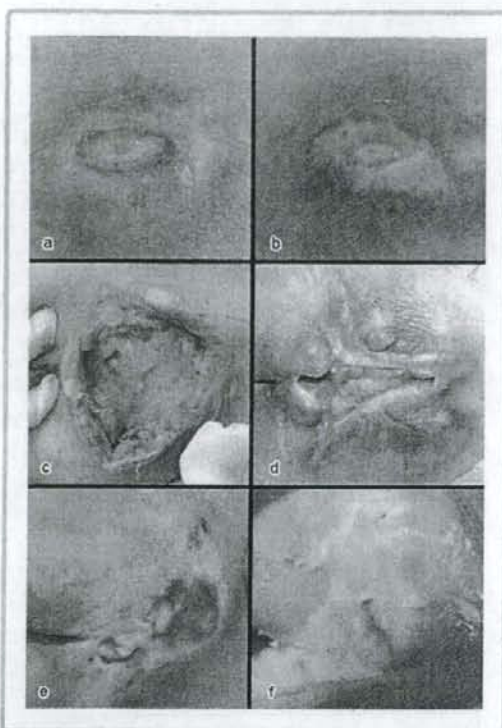


図3 褥瘡チーム医療の実際

現場において褥瘡担当医と連携し、実践することで身につく部分が多い。真剣に褥瘡医療に取り組んでいる医師は、熱意と実力のある薬剤師を必要としている。

▶ 創から病態を読み取る——実例の紹介

国立長寿医療センターでは、前述したように薬剤師との連携において良好な治療結果を得ている。医師は褥瘡病態の多様性を診断し、専門的な薬物治療の基礎となる病態を解析する姿勢が大切である。

①大転子部褥瘡：白色の組織が見えるが創はⅢ度以上ではない。真皮が一部壊死しているが、すべては壊死していないと判断した（図3a）。薬剤師の提案によって、外科的にアブリードマンせず、水分を与える外用剤であるゲーベンクリームやオルセノン軟膏を用いた化学的なアブリードマン（壊死組織除去）をしながら創

の治療を導いた(図3bはaの7週後の経過)。

- ②仙骨部褥瘡:他院で数カ月治療するもポケットが閉鎖せず。浮腫の顕著な肉芽と病態診断した(図3c)。外科的ポケット切開とともに、薬剤師の提案によってテーピングによる外力の調整とユーバスタコワ軟膏を用いた浮腫性肉芽の制御を行い、創は著明に改善した(図3dはcの10週後の経過)。
- ③仙骨部褥瘡:創縁の段差がなく肉芽が平滑で、上皮化が期待できる病態と診断した(図3e)。そのため薬剤師の提案で、リフラップ軟膏・テラジアバスタブレンド外用剤によって上皮化を図る方針とした。その後、図3fのように速やかに上皮化している(3週後の経過)。

このように、薬剤師の専門性を活かして褥瘡診療に参加し、チーム医療の喜びを感じていただければ幸いです。

●引用文献

- 1) 日本褥瘡学会・編:褥瘡対策の指針,照林社,2002,pp5-26
- 2) 日本褥瘡学会・編:平成18年度診療報酬改定褥瘡関連項目に関する指針,2006,pp1-38
- 3) 村木良一:褥瘡ケアの実際 医師の立場から,調剤と情報,13:24-30,2007
- 4) 磯貝善哉:褥瘡の病態と分類,調剤と情報,13:10-14,2007
- 5) 古田勝経:薬局別冊 褥瘡外用療法の新ミツ,南山堂,2006,pp25-38
- 6) 磯貝善哉:高齢者外用治療の標準化にむけて,Home Care Medicine,7(4):88,2006

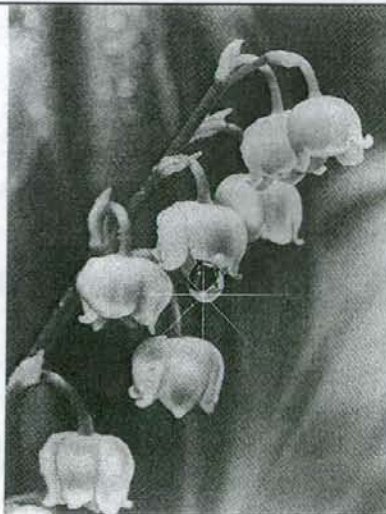
セルニルトン錠は、植物花粉のエキスを主成分とする製剤で、薬理学的に抗炎症作用、利尿促進作用、抗前立腺肥大作用を有し、慢性前立腺炎及び初期前立腺肥大症に効果が認められています。

薬価基準収載品

販売元
扶桑薬品工業株式会社

製造販売元
東亜薬品工業株式会社

資料請求先
東亜薬品工業株式会社 学術部
〒100-0006
東京都千代田区有明町1-10-1



前立腺疾患治療剤

セルニルトン錠

■組成
1錠中セルニチンゴーレンエキス6.3mgを含む消色の錠剤

■用法・用量
1回2錠、1日2~3回経口投与

■効果・効果
1)慢性前立腺炎
2)初期前立腺肥大症による次の諸症状
排尿困難 頻尿 尿後及び尿後感
排尿痛 尿線細小 会陰部不快感

■使用上の注意
副作用
本剤は使用成績調査等の副作用発現頻度が明確となる調査を実施していないため、発現頻度については承認時及び1997年6月迄の文献報告を参考に集計した。
副作用評価可能症例は984例で、副作用発現例は28例(2.85%)で、その大部分(24例,2.44%)は、胃腸障害、胃部不快感、食欲不振等の消化器症状であった。

	0.1~5%未満	頻度不明
皮膚痒		発疹、蕁麻疹等の過敏症状*
消化器	嘔気、食欲不振、胃部不快感、便秘等	

注)このような症状があらわれた場合には、投与を中止するなど適切な処置を行うこと。
*副作用自発報告を含むため頻度不明。
○その他の使用上の注意については添付文書をご参照下さい。

2005年7月作成

Interleukin-6 counteracts effects of cyclosporin A on extracellular matrix metabolism by human dermal fibroblasts

Masatoshi Abe · Yoko Yokoyama · Tomoko Syuto · Hirohisa Ishibuchi · Osamu Ishikawa

Received: 31 October 2007 / Accepted: 30 April 2008 / Published online: 14 June 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract Although the actions of cyclosporin (CyA) on keratinocyte are well established, little is known about its effects on dermal fibroblasts. Interleukin-6 (IL-6) is one of the inflammatory cytokines playing a pivotal role in certain skin diseases such as psoriasis. The aim of this study has been to determine whether CyA modifies the metabolism of extracellular matrix (ECM) by human fibroblasts in vitro. CyA altered the morphology of fibroblasts in the collagen matrix. Fibroblast proliferation was suppressed by CyA at 100 and 10 ng/ml. The production of type I collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 was also suppressed by CyA at 1000 ng/ml, and co-stimulation with IL-6 enhanced decreased production at 1000 and 100 ng/ml CyA. The production of matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) was also suppressed by CyA in a dose-dependent manner. In contrast, the decreased production of MMP-1 was restored at 0.1–100 ng/ml CyA in the presence of IL-6. Regardless of the presence or absence of IL-6, the production of MMP-2 decreased at 1000 and 100 ng/ml, whereas the production of MMP-9 was unchanged. The production of transforming growth factor- β decreased at 100 ng/ml CyA. This study thus indicates that CyA influences ECM metabolism and the proliferation of human dermal fibroblasts, and that the effects of CyA are modulated by IL-6. CyA might also, in part, improve psoriatic skin by regulating the remodeling of ECM and by its action on immunocompetent cells.

Introduction

Psoriasis vulgaris is a chronic inflammatory skin disease of unknown etiology characterized by dermal infiltration of neutrophils and lymphocytes and abnormal epidermal proliferation. The clinical efficacy of cyclosporin (CyA) in the treatment of severe psoriasis is well established. In 1972, CyA was isolated from the soil fungi, *Trichoderma polysporum* and *Cylindrocarpon lucidum*, during a search for an anti-fungal agent (Borel et al. 1976). CyA has been primarily used for organ transplantation patients to suppress organ rejection. Since the first successful treatment of psoriasis with CyA (Mueller and Herrmann 1971), this immunosuppressive drug has been used for severe psoriasis (Griffiths et al. 1986; Finzi et al. 1989; Ho et al. 1990; Borel 1990). Although the most important pharmacological action of CyA is the inhibition of cytokine production, mainly of IL-2 secreted by activated T cells (Kato et al. 1987; Picascia et al. 1987; Sasaki et al. 1988), its pharmacological effects in psoriasis are not fully understood.

Although the effects of CyA on keratinocytes are well documented, little is known about the effects on dermal fibroblasts (Pricano et al. 1996; Lago et al. 2007). Recently, CyA has been reported to modify the synthesis and degradation of extracellular matrix (ECM) by osteoblasts and gingival fibroblasts (Boltchi et al. 1999; Fu et al. 1999; Forni et al. 2001; Bostorm et al. 2005; Bullon et al. 2007). The histopathological changes in affected skin before and after CyA administration without topical-treatment or phototherapy are obvious in psoriasis vulgaris. Typical manifestation of papillomatosis is completely restored with CyA treatment. This finding raises the possibility that CyA is involved in the remodeling of ECM. The present study aims at determining whether CyA modifies the ECM metabolism of human fibroblasts.

Keywords Psoriasis vulgaris · Cyclosporin · Fibroblast · Interleukin-6 · Extracellular matrix · Remodeling

M. Abe (✉) · Y. Yokoyama · T. Syuto · H. Ishibuchi · O. Ishikawa
Department of Dermatology,
Gunma University Graduate School of Medicine,
3-39-22, Showa-machi,
Maebashi 371-8511, Japan
e-mail: masaabe@med.gunma-u.ac.jp

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 human recombinant interleukin (IL)-6 were from Sigma, Steinheim (St. Louis, Mo.). Fetal bovine serum (FBS) was from Cytosystems (Castle Hill, NSW, Australia). Vitrogen "100" collagen was from Cohesion (Palo Alto, Calif.). The procollagen type-I C-peptide enzyme immunoassay (EIA) kit was from Takara Shuzo (Kyoto, Japan). Matrix metalloproteinase (MMP)-1, 2, and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 EIA kit were obtained from DAIICHI Fine Chemical (Toyama, Japan). The Quantikine human transforming growth factor (TGF)- β 1 immunoassay was obtained from R&D Systems (Minneapolis, Minn.). Rhodamine isothiocyanate (RITC)-conjugated phalloidin was from Molecular Probes (Eugene, Ore.). Fluoromount G was from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, Ala.). The Cell-Titer 96 AQ One Cell Proliferation Assay was obtained from Promega (Madison, Wis.). Acid guanidinium thiocyanate-phenol extraction reagent (Isogen) was obtained from Nippongene (Toyama, Japan). TaqMan Reverse Transcription (RT) reagents, the Applied Biosystemic 7500 Real Time PCR system (for the polymerase chain reaction; PCR), and TaqMan probes and primers were from Applied Biosystems (Foster, Calif.). Trypan blue solution was from Mediatech (Herndon, Va.).

Monolayer and collagen matrix culture

After informed consent was given, dermal fibroblasts were obtained from four 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 under 5% CO₂ and 95% humidified air in an incubator. The culture medium was changed every 3 days. Cells were used within 7 passages. Cells were harvested with 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, Ill.), which were coated with collagen (50 μ g/ml for 30 min), and then incubated in DMEM containing 5 mg/ml BSA with various concentrations of CyA and 10 ng/ml IL-6.

Collagen matrix cultures were prepared by using Vitrogen "100" collagen as previously described (Grinnell 2003; Abe et al. 2003). Briefly, neutralized collagen solution (1.5 mg/ml) containing harvested cells (10^5 cells/ml) was prewarmed to 37°C for 4 min, and then aliquots (500 μ l) were placed in a well of a 24-well culture plate (Greiner Bio-one, Frickenhausen,

Germany) and allowed to polymerize for 1 h at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. Polymerized matrices were cultured for 4 h in DMEM containing 5 mg/ml BSA and various concentrations of CyA and IL-6.

Immunofluorescence microscopy

Cells on coverslips or in matrices were fixed for 10 min with 3% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature, blocked with 2% glycine/1% BSA in DPBS (150 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 6 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 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. RITC-conjugated phalloidin was diluted in 1% BSA in DPBS (8 U/ml) and reacted with cells for 30 min at 37°C. After additional washes, samples were mounted on glass slides with Fluoromount G. Observed images and the major axis of cells were collected with an Olympus DP70 camera and an Olympus DP Controller system.

Assay of fibroblast proliferation

Harvested cells were seeded at a density of 10^3 cells in 96-well plastic plates (Corning, N.Y.) and then cultured, with or without 0.1–1000 ng/ml CyA stimulation, in DMEM supplemented with 10% FBS at 37°C under 5% CO₂ and 95% humidified air in an incubator. Fibroblast proliferation was assessed with an MTS assay kit. In each experiment, absorbance at 490 nm was calculated from triplicate wells. Cell viability was assessed by light microscopy and dye exclusion with trypan blue; cell numbers were evaluated by direct counting performed with a hemocytometer. We measured proliferation at incubation periods of 12, 24, 48, 72, and 96 h.

Assay of effect of CyA on ECM metabolism of human dermal fibroblasts

To study the production and mRNA expression of each collagenous protein, harvested cells were seeded at a density of 10^5 cells in 6-well plastic plates (Corning) and then cultured in DMEM supplemented with 10% FBS at 37°C under 5% CO₂ and 95% humidified air in an incubator for 48 h. The medium was then replaced with FBS-free DMEM. After 24 h of serum deprivation, the medium was changed to DMEM containing 5 mg/ml BSA with various concentrations of CyA and IL-6.

Preliminary experiments were carried out to check the time course of production and mRNA expression for each collagenous protein. We established the optimum incubation period of 24 h for protein production and 6 h for mRNA expression; these were used for subsequent experiments.

Assay of type I procollagen

Measurement of procollagen type I C-peptide in the supernatant is regarded as a valid technique for the quantification of type I collagen synthesis (Abe et al. 2001). Therefore, type I collagen production was assessed by measuring the procollagen type I C-peptide concentration by using an EIA assay. In each experiment, the procollagen type I C-peptide concentration was calculated from the values of triplicate wells.

Assay of MMPs, TIMP-1, and TGF- β

The production of MMP-1, -2, and -9, TIMP-1, and TGF- β by fibroblasts was assessed by measuring their concentration with EIA kits. In each experiment, the concentration was calculated from triplicate wells.

Quantitative PCR and RT-PCR

Total RNA from the cell layer was isolated by a single-step method with an acid guanidinium thiocyanate-phenol extraction reagent (Isogen) and treated with RNase-free DNase according to the manufacturer's instructions. Then, 1 μ g RNA was reverse-transcribed to cDNA with TaqMan reverse transcription reagents. Quantitative PCR was performed by using the TaqMan probes and primers for D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; assay ID: Hs99999905_m1), collagen type I α 1 (Hs00164004_m1), MMP-1 (Hs00233958_m1), MMP-2 (Hs00234422_m1), MMP-9 (Hs00234579_m1), TIMP-1 (Hs00171558_m1), and TGF- β (Hs00171257_m1) on the Applied Biosystemic 7500 Real Time PCR System under the following conditions: 2 min at 50°C; 10 min at 90°C; 40 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C. The GAPDH transcript was used as an endogenous reference to calculate the relative expression levels of target genes according to the manufacturer's instructions. Samples were assayed in triplicate, and the relative expression was normalized to the amount of GAPDH in the same cDNA by using the standard curve method described by the manufacturer.

Statistical analysis

Data for the concentration and expression in each experiment were expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was carried out by using Statview software (version 4.0; Abacus Concepts, Berkeley, Calif., USA). Group data were analyzed by variance testing to determine the overall impact of sample treatments within the experiment. Additional *post hoc* testing by using the Fisher Protected Least Significant Difference (PLSD) test was carried out to determine the statistical significance of individual sample treatments on the parameters in question. The result of the analysis of variance was considered

significant only if both the analysis of variance and the Fisher PLSD test yielded a probability (P) value of 0.05 or less.

Results

Cell spreading and CyA on collagen-coated coverslips and in collagen matrix

Experiments were carried out to determine whether force generation could be demonstrated during cell spreading on collagen-coated coverslips (two dimensions) and in a collagen matrix (three dimensions) following CyA treatment in the presence or absence of 10 ng/ml IL-6. Figure 1a-f shows fibroblasts spreading on collagen-coated coverslips with actin staining for prominent stress fibers, regardless of the presence or absence of 10 ng/ml IL-6. In two-dimensional experiments on collagen-coated coverslips, no significant difference was seen in morphologies, even when the culture medium contained 100 and 0.1 ng/ml CyA or 10 ng/ml IL-6. In contrast, CyA altered fibroblast morphology in the collagen matrix. Figure 1g-l reveals the morphologies of fibroblasts with extended projections in various directions (without CyA) and with bipolarity (with CyA at 100 ng/ml). Figure 2 shows the quantitative analysis of the major axis of fibroblasts in the presence or absence of 100 and 0.1 ng/ml CyA or 10 ng/ml IL-6. In the absence of IL-6, the major axis of fibroblasts stimulated with 0.1 ng/ml of CyA was the same as for controls (without CyA); however, in the presence of 10 ng/ml IL-6, the major axis of fibroblasts stimulated with 0.1 ng/ml CyA was longer than that of controls (without CyA). This result implied that CyA directly affected the morphology of fibroblasts in three-dimensional environments, and that the effects of CyA were influenced by 10 ng/ml IL-6.

Effect of CyA on fibroblast proliferation

Experiments were carried out to confirm the effect of CyA on fibroblast proliferation by the MTS method. Fibroblast proliferation was constantly suppressed by CyA at 100 and 10 ng/ml, respectively. Figure 3a shows a representative result after a 24-h incubation. Using the trypan blue staining, we also confirmed that the cells retained their viability, even when the culture medium contained various concentrations of CyA (Fig. 3b).

Effect of CyA on type I collagen production and mRNA expression

In the absence of 10 ng/ml IL-6, the production of type I collagen was suppressed only with CyA at 1000 ng/ml. However, in the presence of 10 ng/ml IL-6, the suppressed production was restored with CyA at 1000 to 10 ng/ml after a