

図10 ドレッシング材からのbFGF放出挙動

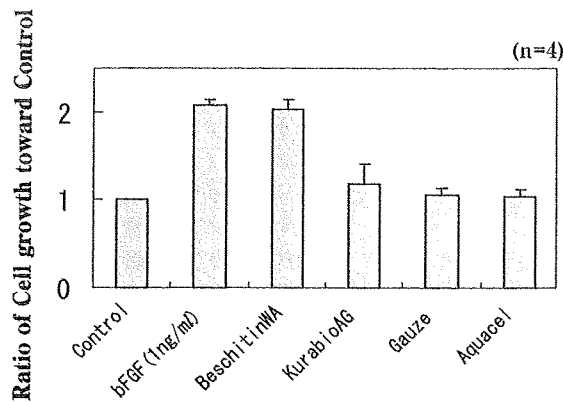


図11 ドレッシング材から放出されたbFGFの細胞増殖率

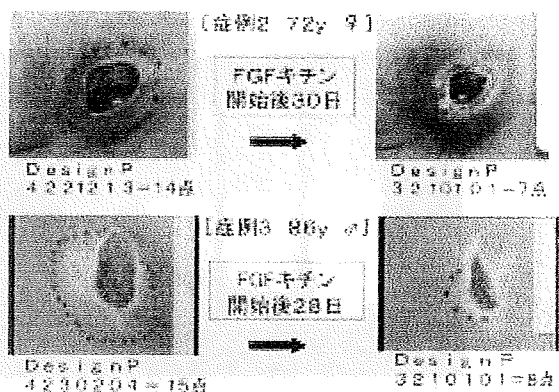


図12 ポケット形成した褥瘡に対するbFGFとベスキチン®WAの併用例

の特性に着目し、有効成分をポケット内へ挿入する方法を考案した。ベスキチン®WAは図10のように噴霧された有効成分bFGFを吸着することなく、創面に再放出して効果を発揮させる。再放出された有効成分bFGFは図11に示すように原液と同等の効果を有する。しかし、ほかの創傷被覆材やガーゼでは吸着し、再放出がみられない。図12はフィブラスト®スプレーとベスキチン®WAを併用し、改善した症例である。方法は創を洗浄後、創内の水分を拭き取り、ポケットの最奥部に入る大きさにカットしたベスキチン®WAにフィブラスト®スプレーを噴霧し、最奥部へ入れる。その際、詰めすぎないように注意する。Top Dressingにはフィルム材を使用する。残存した壊死組織や感染がないことがポイントとなる。

【ポケット内へのユーバスタ®注入<sup>8)</sup>】

ポケット内は滲出液や分泌物などが溜まりやすく、汚染されやすいなど改善されにくい状況が存在する。残存した壊死組織や不良肉芽は治癒の妨げになることはいうまでもないが、滲出液が多いために浮腫があり、炎症が持続するような場合は肉芽の増生が進展しない

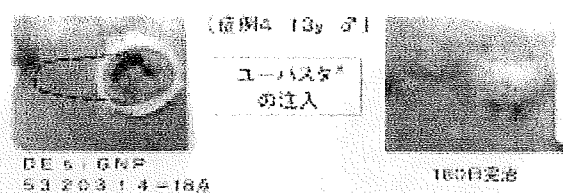


図13 ポケット形成した褥瘡に対するユーバスタ®の注入

ことがある。ポケット形成した褥瘡では内部を確認できるかどうか壊死組織や不良組織が存在しない場合はポケット奥部の滲出液を吸収し、浮腫を改善することにより肉芽増生へ移行させ、ポケットを改善できる。ユーバスタ®をポケット内へ注入することでポケットの内圧が高まるとの懸念もあるが、注入と同時に最奥部のユーバスタ®が溶け出すためにポケット内へ過剰に注入することはない。注意する点は、滲出液の減少に注意しながら、創口部の創面水分量が低下して巻き込みを起こさないように必要に応じて、湿潤保持のためにフィルム材を使用するなどの配慮をする(図13)。

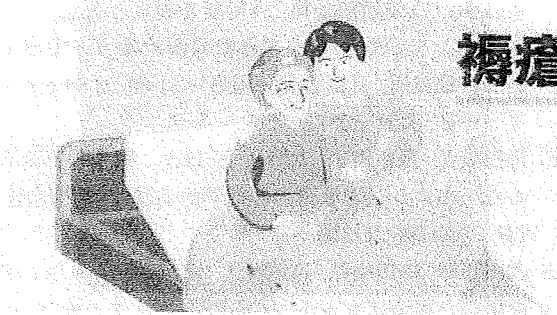
おわりに

外用薬を用いた局所外用療法は、病態に合った外用薬を選択し、見合った使い方を実践することにより期待した効果がほぼ得られるという印象をもつ。それには褥瘡の形状をはじめ、病態の把握、外用薬の特徴を理解することが重要となる。特に軟膏剤では薬効成分と基剤の両面から選択するが、それが両立しない場合には基剤の特性を変えることがより有効となる。その場合、薬効よりも基剤の効果を優先することが必要ことがある。薬効成分と基剤の関係については、今後分かりやすく整理する必要性を感じる。深さや重症度に関係なく、最も身近な局所治療であることからおさらその必要性が求められる。それとは別に外用薬を用いた局所治療は創の病態を正しく把握することによ

り、難治化要因の追求もより重要となる。今後はその点を含めて基剤に関する検討を進める必要がある。

#### 文 献

- 1) 日本褥瘡学会編：科学的根拠に基づく褥瘡局所治療ガイドライン，照林社，東京，2005.
- 2) 日本褥瘡学会編：褥瘡予防・管理ガイドライン，照林社，東京，2009.
- 3) 古田勝経：褥瘡外用療法の本ミツ－事例で学ぶ極意，薬局別冊，Vol.57，南山堂，東京，2006.
- 4) 倉本 秋：創傷治癒に関与する局所環境因子，ドレッシング－新しい創傷管理（穴澤貞夫 監修，倉本 秋ほか 編集），41-52，へるす出版，東京，1995.
- 5) 古田勝経：外用薬にはどんなものがあるか～基剤，褥瘡における薬効別分類，外用薬の利点と欠点～，ガイドラインを読むシリーズ褥瘡局所治療ガイドライン編（宮地良樹，真田弘美 編集），51-80，メディカルレビュー社，大阪，2007.
- 6) 野田康弘，野原葉子，水野正子，ほか：褥瘡保存的治療のためのブレンド軟膏の製剤学的妥当性，褥瘡会誌，6（4）：593-598，2004.
- 7) 古田勝経，野田康弘，遠藤英俊，ほか：ドレッシング材を用いた褥瘡ポケットへのbFGF投与法の検討，褥瘡会誌，8（2）：177-182，2006.
- 8) 古田勝経：難治性褥瘡への挑戦，治りにくい褥瘡へのアプローチ（褥瘡なおそう会 編著），110-144，照林社，東京，2001.



# 褥瘡の薬物療法の知識と技術

国立長寿医療センター 薬剤部 副薬剤部長 <sup>ふくだ かつり</sup>古田 勝経  
(日本褥瘡学会認定師)

褥瘡は床ずれとも呼ばれ、「病気」として認識しづらい表現となっています。そのため  
に病気と認識されず、「褥瘡は看護の恥」として扱われ、医療の狭間にひっそりと存在して  
いました。しかし、高齢化とともに褥瘡患者の増加や難治化など社会問題となる可能性  
が高くなります。10年前にはドイツや北欧などでは社会問題化していますが、急速な高齢  
化が進む日本ではさらに深刻化することが予想されます。褥瘡は個別性の高い病気のため  
に科学的研究が遅れ、病気としての学問体系が未完成ですが、確立するまで褥瘡の発生は  
待ってもらえませんが、そのような状況の中で現在可能な最善の方策を駆使し、予防や治療  
にあたるのが重要です。在宅へのシフトが進む医療環境で薬剤師も在宅チームへ参画す  
ることが求められており、薬物療法の専門家として専門性を活かした薬剤師職能を発揮で  
きる新たな分野として注目すべきです。

## 1. 褥瘡という病気

褥瘡は古代エジプトのミイラに存在したこ  
とが確認されていますが、先進医療の現在で  
もなお適切な対応がとられていないために古  
くて新しい病気と言われています。褥瘡の発  
生原因は、複合的な因子が関わっているため  
に治療が困難とされてきた経緯があります。  
そのことが、この分野の研究が遅れた理由と  
なっています。主たる発生原因は持続性の圧  
迫やずれによるもので、血行障害を起こして  
組織が壊死に陥ります。その発生原因の周辺

にはADLの低下、低栄養、骨折による安静  
など高齢者特有の問題や服用薬剤の影響など  
が発生を促す要因となっています。同一体位  
や姿勢保持によって一定の部位に持続した圧  
迫が加わることにより発生することが多いわ  
けですが、頭側挙上（ギヤジアップ）など  
によるずれの影響から血行障害を引き起こす場  
合もあります。

発生部位は、体重分布の大きい仙骨部や大  
転子部、腸骨部などに多く発生しますが、ず  
れによるものは尾骨部によくみられます。ま  
た、踵部も好発部位となります。長時間の車  
椅子乗車のために坐骨部にも発生し、難治化  
しやすいのが特徴です。

予防は常に重要ですが、完全看護しても褥  
瘡の発生は防止できないということが証明さ  
れています。発生後は早期治療が必要ですが、  
治療面だけでなく薬物療法を円滑に進めるた  
めの予防策にも介入する必要があります。予  
防には全身的な管理が必要とされ、基礎疾患  
や栄養状態の悪化は褥瘡の発生を助長するた  
めこの点にも注目します。また、褥瘡が発生  
してからの栄養改善は容易ではありません。  
予防する目的での栄養改善が求められます。  
このように医師、看護師、薬剤師、管理栄養  
士など多職種が参加する必要があり、チーム  
医療の先駆的分野と認識されています。

## 2. 褥瘡ケアになぜ薬剤師が必要なのか

褥瘡の難治化要因は、①発生原因が正し  
く把握されていない、②病態の変化に対応し

た外用薬が選択されていない、③低栄養状態のため改善できないとされている、④治療薬・材料を正しく理解している医師や看護師が少なく、試行錯誤で行われている、というような状況が存在しています。日本褥瘡学会員医師が16診療科の医師351名に実施したアンケート調査結果<sup>2)</sup>では、外用薬の使い分けができると答えた医師は全体のわずか17%でした。このような現状をどのように捉えますか。

薬剤師が褥瘡分野に介入する意義は、①すべての診療科医師が褥瘡の医学教育を受けてはいない、②看護師は看護における予防が主な役割であり、ドレッシング材の選択や使用はできるが、薬剤の知識は乏しい、③薬剤師は外用薬・材料の特性を理解し、医師や看護師にそれらの選択・使い方を提言・指導できる、④外用薬を主体とした治療は、治療期間の短縮や医療費の抑制、QOLの向上に貢献できる、⑤使用されるすべての薬剤に対して薬効を評価し、悪影響を監視することなど、医薬品の適正使用や薬害を防止する役割を担うことです。それ以外の薬剤の管理も同時に行うなど重要な役割を果たすことができます。治らない褥瘡が治れば、医療における薬剤師の評価も上がり、必要性が認識されます。薬物療法に参画することは医療の中で顔の見える薬剤師となる第一歩と考えます。患者のために薬剤師としてどのような貢献ができるかが決め手になります。

### 3. 高齢者褥瘡の特徴とDDS (Drug Delivery System)

脊髄損傷など麻痺をともなう若年者の褥瘡と高齢者のそれとは、相違点があります。発生原因は同じですが、皮膚の状態は高齢者の場合、水分量や皮表脂質量、コラーゲンの減少などからシワやタルミがあり、皮膚自体が薄く、ルーズな状態になっています。そのために摩擦やズレなど、いわゆる外力の影響を



図1-1 関節部位や骨突出部位は創およびその周囲の皮膚が動きやすく、薬剤が創内に留まりにくい。創内に薬剤が効果的に作用する環境づくりとしてDDSを目的とした皮膚の固定による創内の薬剤滞留を図る。

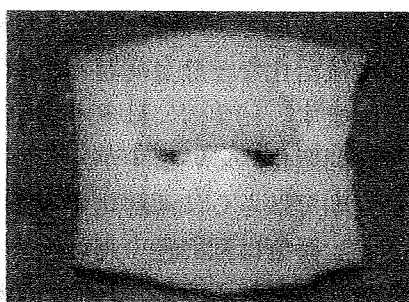


図1-2 レストンスポンジを用いた創の保護と周囲皮膚の固定

受けやすく、真皮層を超えた長襲の褥瘡では創が移動しやすく、変形しやすいために治りにくいという状況が生まれます。それは創内の外用薬が外力によって移動したり、はみ出したりすることで滞留できなくなり、薬剤の効果が得られにくい創環境を作るためです。それを防ぐために皮膚や創の固定 (fixation) を行います。創の治療環境を物理的に整えることも必要となり、それにはレストンスポンジや布製弾性テープを用います (図1-1, 1-2)。それにより円滑な治療が可能となりますが、薬剤の効果を高めるための究極のDDSと言えます。このように高齢者の褥瘡に特有の問題へも配慮した薬物療法を行うことが大切です。これも医薬品の適正使用や薬害防止に通じる部分です。

#### 4. 外用薬の特性

褥瘡治療に用いる外用薬には軟膏剤、噴霧剤、粉末剤、顆粒剤などがあり、病態や創の形状に応じた選択が必要です。特に、軟膏剤では用いられる軟膏基剤（以下、基剤という。）の特性は薬理作用に大きく影響するためにそれらを理解することが治療効果の良否に深く関係します。表1に基剤の分類を示しますが、油脂性基剤は創面保護だけでなく保湿効果を、水溶性基剤は吸湿性というより滲出液の吸水性の効果を、乳剤性基剤にはW/O型とO/W型があり、水分含有量が異なります。そのためにW/O型は油脂性基剤と同じような効果を、O/W型は創に水分を供給する保水性を特徴とし、薬効成分だけで選択した場合には効果が期待できないどころか悪化することさえあります。つまり、病態に則した薬剤選択は薬効成分と基剤の両面から考慮すべきなのです。この基剤の考え方は薬剤師の提案により日本褥瘡学会が策定した「科学的根拠に基づく褥瘡局所治療ガイドライ

ン」に採用されています。薬学では基剤は単に添加剤とされていますが、内服薬の場合、薬効成分が同一であっても効果に違いがみられることもあり、賦形剤の特性が影響することは容易に想像できます。それと同様、基剤の特性による効果の違いにも着目する必要があります。同じ薬効成分の軟膏であっても吸水性が異なることが明らかになっています。

#### 5. 創傷治癒に関与する局所環境因子

創傷が治癒するために必要な局所環境があり、局所環境因子に配慮しなければなりません。以下に局所環境因子を示します。

- ①湿潤：細胞の生存、増殖には湿潤環境が必須。肉芽形成過程で特に重要となります。
- ②壊死組織：壊死組織は細菌の温床。細胞増殖を阻害するため早期に除去します。
- ③感染：感染した組織は正常な細胞増殖は起こらず、感染制御は最も重要となります。
- ④細胞増殖因子：生体内に存在する細胞増殖因子を活性化させ、肉芽形成や上皮化を促します。

表1 外用薬の軟膏基剤による分類

分類		基剤の種類		外用薬（代表的な製品）	水分含有率	水分吸収率
疎水性基剤	油脂性基剤	鉱物性	白色ワセリン、プラスチックベース単軟膏、亜鉛華軟膏	亜鉛華軟膏	—	—
		動植物性		アズノール軟膏	—	—
親水性基剤	乳剤性基剤	水中油型 (O/W)	親水軟膏、バニシングクリーム	オルセノン軟膏	73%	—
		油中水型 (W/O)		ゲーベンクリーム	67%	—
	水溶性基剤	マクロゴール軟膏	リフラップ軟膏	21%	—	
			ソルコセリル軟膏	25%	—	
			アクトシン軟膏	—	—	
			アラントロックス軟膏	—	—	
	プロメライン軟膏	—	—			
	テラジアバスタ	—	—			
	ユーバスタ	—	76%			
	カデックス軟膏	—	370%			
デブリサン（ペースト）	—	300%				
懸濁性基剤	ハイドロゲル基剤	ソフレットゲル	60%	—		
	FAPG基剤	—	—	—		

- ⑤ pH：創傷部位のpHはアルカリ性に傾くが、治療には弱酸性にする必要があります。
- ⑥ 温度：創面温度が下がるとその細胞増殖能が低下するため保温が必要となります。
- ⑦ 酸素濃度：深い褥瘡では酸素濃度を低く、浅い褥瘡は高くてもよいとされています。

以上7項目ありますが、①～④は特に重要性が高く、治療に大きく影響します。前述の基剤の重要性はその特性から湿潤環境に強く関与するためです。

### 6. 褥瘡の重症度分類

褥瘡の重症度を表す指標としては、深さを目安にした分類が多く、我が国では日本褥瘡学会が提唱するDESIGN分類があり、重症度分類用と経過評価用の2種類に分かれています。2002年に提唱されたDESIGN（2002年版）（表2-1、表2-2）及び2009年に提唱された経過評価用DESIGN-R（2009年版）（以下、DESIGN-Rという。）（表3）があります。2つのDESIGNともに評価項目の変更はありませんが、2002年版経過評価用は各

項目の点数には統計的な重み付けがないために信頼性と妥当性はあるものの予測妥当性はありません。そのために個々の褥瘡がよくなったか悪くなったかの評価はできません。DESIGN-Rは重み付けすることによりその比較を可能にしたものです。もう一つの違いは2002年版ではすべての項目の合計点を表記（例示：D5E4S3I3G4N3-P2=24点）しますが、DESIGN-Rでは基本的に深さ「D」と「ESIGNP」の間に「-（ハイフン）」を入れることで表記（例示：D3-E6S1I5I9G6N6P0=33点）の区別を図っています。これは深さの重症度が重み付けの値に影響しないことから判断されたものです。DESIGN-Rには重症度分類用がないためDESIGN（2002年版）を継続して使用することになります。重症度用は治療方針を決定することを目的とし、経過評価用は改善の程度を評価する目的で使用します。これはチーム医療や多職種連携が必要な褥瘡における共通言語として活用します。

D(Depth) 深さ、E(Exudate) 滲出液、S

表2-1

DESIGN 褥瘡重症度分類用				日時 / / / / / / /								
カルテ番号 ( )												
患者氏名 ( )												
Depth 深さ (創内の一番深いところで評価する)												
d	真皮までの損傷	D	皮下組織から深部									
Exudate 滲出液 (ドレッシング交換の回数)												
e	1日1回以下	E	1日2回以上									
Size 大きさ [長径(cm)×短径(cm)]												
s	100未満	S	100以上									
Inflammation/Infection 炎症/感染												
i	局所の感染徴候なし	I	局所の感染徴候あり									
Granulation 肉芽組織 (良性肉芽の割合)												
g	50%以上 (真皮までの損傷時も含む)	G	50%未満									
Necrotic tissue 壊死組織 (壊死組織の有無)												
n	なし	N	あり									
Pocket ポケット (ポケットの有無)												
		-P	あり									

部位 1 仙骨部、坐骨部、大転子部、踵骨部、その他 ( )

©日本褥瘡学会/2002

表2-2

2002年版 DESIGN 褥瘡経過評価用

カルテ番号: ( ) 患者氏名: ( )

Depth 深さ		範囲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		日時												
d	0	皮膚損傷・発赤なし	D	3	皮下組織までの損傷											
	1	持続する発赤		4	皮下組織を越える損傷											
	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 滲出液																
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	中等量: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: [長径(cm)×長径と直交する最大径(cm)]																
s	0	皮膚損傷なし	S	5	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(発熱、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)		3	全身的影響あり(発熱など)											
Granulation 肉芽組織																
g	0	治癒あるいは創底が浅いため肉芽形成の評価ができない	G	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 存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											
				2	硬く厚い密着した壊死組織あり											
Pocket ポケット 毎回同じ体位で、ポケット全周(潰瘍面も含め)長径(cm)×短径(cm)から潰瘍の大きさを差し引いたもの																
p	0	記録せず	P	1	4未満											
				2	4以上 16未満											
				3	16以上 36未満											
				4	36以上											
部位 (仙骨部、坐骨部、大転子部、踵骨部、その他 ( ))											合計					

©日本褥瘡学会/2002

表3

DESIGN-R 褥瘡経過評価用

カルテ番号: ( ) 患者氏名: ( )

Depth 深さ		範囲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		日時												
d	0	皮膚損傷・発赤なし	D	3	皮下組織までの損傷											
	1	持続する発赤		4	皮下組織を越える損傷											
	2	真皮までの損傷		5	関節腔、体腔に至る損傷											
Exudate 滲出液																
e	0	なし	E	6	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														
	3	中等量: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: [長径(cm)×長径と直交する最大径(cm)]																
s	0	皮膚損傷なし	S	16	100以上											
	3	4未満														
	6	4以上 16未満														
	8	16以上 36未満														
	9	36以上 64未満														
	12	64以上 100未満														
Inflammation/Infection 炎症/感染																
i	0	局所の炎症徴候なし	I	3	局所の明らかな感染徴候あり(発熱、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)		9	全身的影響あり(発熱など)											
Granulation 肉芽組織																
g	0	治癒あるいは創底が浅いため肉芽形成の評価ができない	G	4	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		6	良性肉芽が、創面の10%未満を占める											
	3	良性肉芽が、創面の50%以上90%未満を占める		6	良性肉芽が全く形成されていない											
Necrotic tissue 壊死組織 存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	3	柔らかい壊死組織あり											
				6	硬く厚い密着した壊死組織あり											
Pocket ポケット 毎回同じ体位で、ポケット全周(潰瘍面も含め)長径(cm)×短径(cm)から潰瘍の大きさを差し引いたもの																
p	0	記録せず	P	6	4未満											
				9	4以上 16未満											
				12	16以上 36未満											
				24	36以上											
部位 (仙骨部、坐骨部、大転子部、踵骨部、その他 ( ))											合計					

©日本褥瘡学会/2008



(Size) 大きさ, I(Inflammation/Infection) 炎症/感染, G(Granulation tissue) 肉芽形成, N(Necrotic tissue) 壊死組織, P(Pocket) ポケット形成が指標とされている項目です。表2は大文字が重症, 小文字が軽症とされ, 大文字の項目を小文字にするように治療方針を定めるために用いられます。

つまり, D→d, E→e, S→s, I→i, G→g, N→nなどのように大文字の項目を小文字にするよう治療方針を立てるわけです。

深さの分類では浅い褥瘡と深い褥瘡の区別が治り方の違いを示す分類です。浅い褥瘡は真皮層までの侵襲をいい, 元の表皮が再生して治癒しますが, 真皮層を超える侵襲では再生されず, 癒痕形成で治癒するという違いがあります。

治療経過を示す指標には色調分類もあります。黒色期→黄色期→赤色期→白色期と移行して経過を評価するもので, 入門編として用いたり, わかりやすいという理由で使用している医療従事者もいます(表4)。

## 7. DESIGNからみた外用薬の分類

急性期と慢性期とでは対応が異なるために褥瘡の症状が落ち着くまでの発症から2~3週間くらいまでは急性期の褥瘡として対応します。この時期は炎症があり, 発赤が強いため適切な処置が困難とされるからです。慢性期へ移行すれば, その病態に応じた処置を行うことが可能になります。以下にDESIGNからみた外用薬の分類と留意点を示します(表5)。

## 8. 外用療法における外用薬の選び方と使い方

前項で述べた外用薬の選択指標に基づいて実際の選択と使用方法を解説します。まず, 創を観察するとともに, できれば写真撮影しておくといいでしょう。後で創を比較することができます。褥瘡の病態を把握することが前提となりますが, 軟膏剤を選択する際に着目する点は創を湿らせすぎず, 乾かしすぎずという基本線を維持することです(図2)。

表4 色調分類による薬剤選択の例示

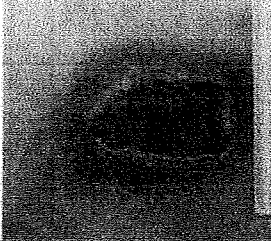

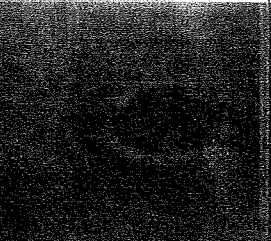
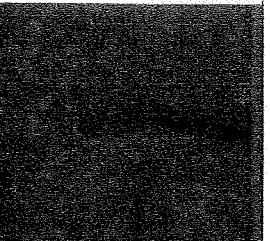
	黒色期	黄色期	赤色期	白色期
色調分類				
ポイント	①壊死組織の除去 ②感染対策 ③滲出液の吸収 ④水分の供給	①壊死組織の除去 ②感染対策 ③滲出液の吸収 ④水分の供給	①肉芽形成促進 ②湿潤保持 ③感染対策 ④壊死の防止	①上皮形成促進 ②湿潤の低下 ③壊死の防止
薬剤	壊死組織除去剤		肉芽形成促進剤	上皮形成促進剤
湿潤過多	カデックス軟膏	→	ユーバスタ	ユーバスタ
↑ ↓	デブリサン(ペースト)	→	オルセノン軟膏+ デブリサン	テラジアバスタ
	ユーバスタ	→	リフラップ軟膏	アクトシン軟膏
	プロメライン軟膏	→	フィブラストスプレー	リフラップ軟膏
	ダーベンクリーム	→	プロスタンディン軟膏	ソルコセリル軟膏



表5 外用剤と留意点

浅い褥瘡の場合

	対 応	外 用 薬
発赤	創面保護の目的のためフィルムドレッシング材による被覆、あるいは油脂性基剤の白色ワセリンやプラスチックベースを用いた軟膏を塗布することで創面保護や保湿を行う。	油脂性基剤 白色ワセリン（アズノール軟膏・ハスレン軟膏：アズレン、亜鉛華軟膏・亜鉛華単軟膏・ウイルソン軟膏・サトウザルベ・酸化亜鉛：酸化亜鉛） プラスチックベース（プロスタニン軟膏：プロスタグランジンE1）
水疱	水疱は破らずにそのまま保護する。	保護は油脂性基剤を選択する。水疱が破れた場合は、びらん・浅い潰瘍に準ずる。
びらん・浅い潰瘍	創面の湿潤状態を考慮して観察可能なドレッシング材、あるいは軟膏を塗布する。軟膏は創面保護や保湿作用をもつ油脂性基剤や乳剤性基剤、または少量の滲出液を吸収する水溶性基剤	油脂性基剤 白色ワセリン（アズノール軟膏・ハスレン軟膏：アズレン、亜鉛華軟膏・亜鉛華単軟膏・ウイルソン軟膏・サトウザルベ・酸化亜鉛：酸化亜鉛） プラスチックベース（プロスタニン軟膏：プロスタグランジンE1） 乳剤性基剤（水分量の少ない） （リフラップ軟膏・リフラップシート：塩化リゾチーム、ソルコセリル軟膏：幼牛血液抽出物） 水溶性基剤 マクロゴール軟膏（アクトシン軟膏：ブクラデシン）

深い褥瘡の場合  
DESIGNに基づいた使用目的

N→n				
	一般名	商品名	基剤または剤形	特徴および使用上の注意
N→n	フィブリノリジン・デオキシリボヌクレアーゼ配合剤	エレース (経過措置：2010.3まで)	粉末製剤	溶液、ゼリー剤にて使用 壊死組織除去作用 出血を伴うことがある 滲出液少量の時はフィルムドレッシングを併用 接触性皮膚炎を起こすことがあるので注意
N→n	スルファジアジン銀	ゲーベンクリーム	乳剤性基剤（O/W型）水分含有量60%	水分量の多い基剤特性から壊死組織への浸透性があり、軟化して清浄化 ヨウ素との併用により効果が減弱 滲出液の多い時は浮腫を起こす可能性がある
N→n	プロメライン	プロメライン軟膏	水溶性基剤	壊死組織除去作用 基剤の影響で滲出液が少ない時は十分な効果が得られにくい 壊死組織が減少し、肉芽増生しはじめたら中止 皮膚炎を起こすことがあるためワセリンで創周囲を保護
N→n	カデキソマー・ヨウ素	カデックス軟膏	吸水性ポリマービーズ	殺菌消毒作用をもち、感染創に使用可 創面清浄化作用（膿、滲出液、細菌等を吸着） 自重の7倍の吸水能力（軟膏は約1/2の吸水能力） 滲出液減少時にはビーズが創面に固着するので注意 乾いた創には不適
N→n	デキストラノマー	デプリサン【医療材料】 デプリサンペースト	吸水性ポリマービーズ	創面清浄化作用（膿、滲出液、細菌等を吸着） 自重の4倍の吸水能力 滲出液減少時にはビーズが創面に固着するので注意 乾いた創には不適 マクロゴール400やグリセリンと混ぜペースト状に
N→n	硫酸フラジオマイシン・トリプシン	フランセチン・T・パウダー	粉末製剤	血液凝固物や膿苔、線維素、壊死組織などを融解除去 滲出液の少ない創では十分な効果が得られない場合がある ヨウ素、スルファジアジン銀との併用により効果が減弱する

G→g				
	一般名	商品名	基剤または剤型	特徴および使用上の注意
G→g	塩化リゾチーム	リフラップ軟膏 リフラップシート	乳剤性基剤（W/O型） 水分含有量23% シートは不織布に塗布	肉芽形成、表皮形成作用 湿潤保持により基剤の壊死組織軟化 卵白由来の蛋白質で、卵白アレルギーに注意 滲出液が多量の場合は不適 ポピドンヨードの存在下で肉芽形成促進との報告
G→g	トコレチナート	オルセノン軟膏	乳剤性基剤（O/W型） 水分含有量70%	肉芽形成作用 (肉芽過形成等に注意) 出血を伴うことがある 感染に注意 創面から吸収されないので希釈可 滲出液が多い場合は不適
G→g	アルミニウムクロロヒドロキシアラントイネート	イサロバン ソフレットゲル アラントロックス軟膏 アルキサ軟膏	水性ゲル (水酸化アルミニウム)	表皮形成作用（湿潤の少ない創面は不適） 血流改善作用 基剤による壊死組織軟化 感染に注意

G→g	ブクラデシン	アクトシン軟膏	マクロゴール基剤	基剤による滲出液の吸収 肉芽形成作用（滲出液が少ない場合は十分な効果が得られにくい） 表皮形成作用（湿潤の低下した創面は十分な効果が得られにくい） 接触性皮膚炎を起こすことがあるので注意
G→g	アルプロスタジル アルファデクス (プロスタグランジンE1)	プロスタンディン軟膏	油脂性基剤	局所循環改善作用、血管新生作用による肉芽形成作用 出血を伴うことがある 表皮形成作用 湿潤の多い創面は不適。（吸水性を有するドレッシングと併用すれば可）
G→g	幼牛血液抽出物	ソルコセリル軟膏	親水性軟膏（W/O型） 水分含有量25%	肉芽形成作用 血流改善作用 リフラップ軟膏との併用で作用増強
G→g	トラフェルミン	フィブラストスプレー	噴霧剤 添付の生食液に溶解	血管新生作用 肉芽増殖促進作用 湿潤保持が必要な場合がある 乾燥した創や滲出液の多い創には不適 感染に注意 ポケット部ではキチンドレッシング材と併用

S→s

	一般名	商品名	基剤または剤型	特徴および使用上の注意
S→s	塩化リゾチーム	リフラップ軟膏 リフラップシート	乳剤性基剤（W/O型） 水分含有量21% シートは不織布に塗布	肉芽形成、表皮形成作用 湿潤保持により基剤の壊死組織軟化 卵白由来の蛋白質で、卵白アレルギーに注意 滲出液が多量の場合は不適
S→s	アズレン	アズノール軟膏 ハスレン軟膏	油脂性基剤	抗炎症作用 びらん、潰瘍面の保護
S→s	酸化亜鉛	亜鉛華軟膏 亜鉛華単軟膏 サトウザルベ	油脂性基剤	抗炎症作用 基剤特性によるびらん、潰瘍、湿潤した創の保護 酸化亜鉛の効果は期待しにくい 多量の滲出液がある場合は不適
S→s	アルミニウムクロロヒドロキシアラントイネート	イサロバン ソフレットゲル アラントロックス軟膏 アルキサ軟膏	水性ゲル (水酸化アルミニウム)	表皮形成作用（湿潤の少ない創面は不適） 血流改善作用 基剤による壊死組織軟化 感染に注意
S→s	ブクラデシン	アクトシン軟膏	マクロゴール基剤	基剤による滲出液の吸収 肉芽形成作用（滲出液が少ない場合は十分な効果が得られにくい） 表皮形成作用（湿潤の低下した創面は十分な効果が得られにくい） 接触性皮膚炎を起こすことがあるので注意
S→s	アルプロスタジル アルファデクス (プロスタグランジンE1)	プロスタンディン軟膏	油脂性基剤	局所循環改善作用、血管新生作用による肉芽形成作用 出血を伴うことがある 表皮形成作用 湿潤の多い創面は不適。（吸水性を有するドレッシングと併用すれば可）
S→s	幼牛血液抽出物	ソルコセリル軟膏	親水性軟膏（W/O型） 水分含有量25%	肉芽形成作用 血流改善作用 リフラップ軟膏との併用で作用増強
S→s	トラフェルミン	フィブラストスプレー	噴霧剤 添付の生食液に溶解	血管新生作用 肉芽増殖促進作用（強い） 乾いた創には湿潤保持が必要な場合がある 滲出液の多い創には不適 感染に注意 ポケット部ではキチンドレッシング材と併用

I→i

	一般名	商品名	基剤または剤型	特徴および使用上の注意
I→i	精製白糖・ポビドンヨード	スーパーバスターワ・軟膏 ソアナスバスター・軟膏 ドルミジンバスター インジンシュガーバスター スクロードバスター ネグミンシュガー軟膏 ポビドンバスター ポビドンヨードシュガー	マクロゴール基剤	殺菌消毒作用をもち、感染創に使用可 滲出液の吸収作用 浮腫の軽減 肉芽形成作用 創の収縮作用 壊死組織のないポケット形成した創への充填（滲出液少量の場合はフィルム材で被覆） 乾いた創には不適 ヨードアレルギーに注意 多量投与および長期連用時は甲状腺機能異常に注意

I→i	スルファジアジン銀	デーペンクリーム	乳剤性基剤 (O/W型) 水分含有量67%	水分量の多い基剤特性から壊死組織への浸透性があり、軟化して清浄化 ヨウ素との併用により効果が減弱 滲出液の多い時は浮腫を起す可能性がある
I→i	ポビドンヨード	イシジングル ヨードコート軟膏 (可塑剤を配合)	マクロゴール基剤	感染した創に適する 多量でない滲出液の創に適する 可塑剤により滲出液を吸収しながら創面の湿潤を保持するが滲出液が多量の場合では不適
I→i	硫酸フラジオマイシン・トリプシン	フランセチン・T・パウダー	粉末製剤	血液凝固物や膿苔、線維素、壊死組織などを融解除去 滲出液の少ない創では十分な効果が得られにくい ヨウ素、スルファジアジン銀との併用により効果が減弱する
I→i	カデキソマー・ヨウ素	カデックス軟膏	吸水性ポリマーベース	殺菌消毒作用をもち、感染創に使用可 創面清浄化作用 (膿、滲出液、細菌等を吸着) 自重の7倍の吸水能力 (軟膏は約1/2の吸水能力) 滲出液減少時には創面に固着するので注意 乾いた創には不適
I→i	ヨードホルム	ヨードホルムガーゼ	殺菌消毒剤含浸ガーゼ	潰瘍部の殺菌消毒に用いる 創の大きさにカットしたものを1~2枚程度用い、多量及び長期投与は避ける 血液や分泌物等に溶解することにより消毒効果が発揮される 乾いた創には不適

E→e

一般名	商品名	基剤または剤型	特徴および使用上の注意
E→e	精製白糖・ポビドンヨード	マクロゴール基剤	殺菌消毒作用をもち、感染創に使用可 滲出液の吸収作用 浮腫の軽減 肉芽形成作用 創の収縮作用 肉芽が水分を多く含み過形成となり、上皮化しない場合は、肉芽の浮腫を抑えることにより上皮形成へ移行することがある 乾燥面には不適 ヨードアレルギーに注意 多量投与および長期連用時は甲状腺機能異常に注意
E→e	カデキソマー・ヨウ素	カデックス軟膏	吸水性ポリマーベース 殺菌消毒作用をもち、感染創に使用可 創面清浄化作用 (膿、滲出液、細菌等を吸着) 自重の7倍の吸水能力 (軟膏は約1/2の吸水能力) 滲出液減少時には創面に固着するので注意 乾燥面には不適
E→e	デキストラノマー	デブリサン デブリサンペースト 【医療用具】	吸水性ポリマーベース (ペースト：マクロゴール600を加えたタイプ) 創面清浄化作用 (膿、滲出液、細菌等を吸着) 自重の4倍の吸水能力 滲出液減少時には創面に固着するので注意 乾燥面には不適 マクロゴール400やグリセリンと混ぜペースト状に

P→(-)

一般名	商品名	基剤または剤型	特徴および使用上の注意
P→(-)	トコロチナート	乳剤性基剤 (O/W型) 水分含有量73%	肉芽形成作用 (肉芽過形成等に注意) 出血を伴うことがある 感染に注意 創面から吸収されないので希釈可 滲出液が多い場合は不適
P→(-)	トラフェルミン	噴霧剤 添付の生食液に溶解	血管新生作用 肉芽増殖促進作用 (強い) 湿潤保持が必要な場合がある 乾燥した創や滲出液の多い創には不適 感染に注意 ポケット部ではキチンドレッシング材と併用
P→(-)	精製白糖・ポビドンヨード	マクロゴール基剤	殺菌消毒作用をもち、感染創に使用可 滲出液の吸収作用 浮腫の軽減 肉芽形成作用 創の収縮作用 肉芽が水分を多く含み過形成となり、上皮化しない場合は、肉芽の浮腫を抑えることにより上皮化へ移行することがある 乾いた創には不適 ヨードアレルギーに注意 多量投与および長期連用時は甲状腺機能異常に注意

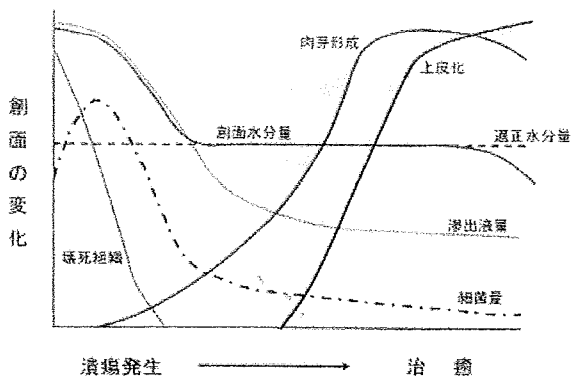


図2 深い褥瘡における水分コントロール/バランス

ただし、目安がないとわかりにくいと思いますので提案しますが、水分量測定器（モイスターチェッカー）で創面の水分量を測定し、その水分量が約60～70%であれば、おおむね湿潤環境としては良好となります。高齢者は約60%を目安とし（図3）、滲出液や水分を吸収するのか、保水するのか、基剤の特性から軟膏剤の選択や使い方に利用します。市販の軟膏剤では水分含有率の高いものや滲出液などの水分吸収率の高いものに偏っています。軟膏剤の開発過程では、主薬となる薬効成分の物理的性質から製剤の安定性や保存性、主薬の放出性をもっとも優れるかによって基剤を選定しますが、褥瘡の病態を考慮してはいません。そのためにその軟膏剤をどう効果的に使用するかは使用する側が考えなければなりません。基剤の重要性は前述しましたが、それが認識され始めたのはつい最近であり、薬剤師の考えであることを強調しておきます。皮膚面と異なり創面上の軟膏は滲出液などの分泌物の影響をうけ、基剤と混ざり合い、その混ざり合った混合物の湿潤状態が湿潤環境となって創面と接することになります（図4）。滲出液が少ない褥瘡に水分吸収性の高い基剤が接すれば、乾きすぎの状態になることが予想されます。またその逆も考えられます。そのことが湿潤環境を崩し、治癒環境にほど遠い状況を生んでしまいます。こ

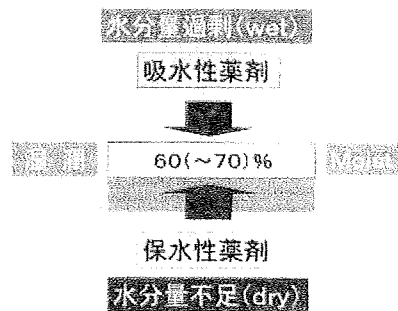


図3

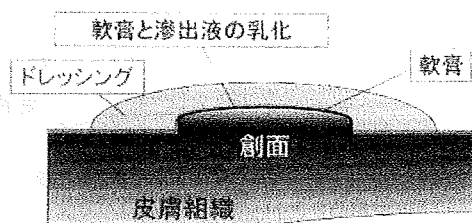


図4 創面上の薬剤

のような経過を辿らないように配慮する必要があります。そのためにも創を観察し、外用薬が適切かを評価することが必要です。市販される軟膏剤のような極端な保水性と吸水性だけでは適度な湿潤環境を保持することは困難な場合があり、その際には基剤の特性を変えることが必要になります。それにより低い保水性・吸水性を実現でき、効果的に作用する状況を作り上げます。このように軟膏剤の基剤を調製したものをブレンド軟膏と呼んでいます（表6）。このブレンド軟膏とは単に混合したものではなく、基剤の分離や色調変化、薬効成分の変化などを安定性試験や定量試験によって確認された特定の比率に配合した軟膏をいいます。

## 9. 日本褥瘡学会認定師制度

2009年日本褥瘡学会では褥瘡認定師および在宅褥瘡・予防管理師の認定資格の一般公募を開始します。褥瘡医療の向上に貢献するために医師、看護師、薬剤師、管理栄養士、理学療法士、作業療法士（介護福祉士は在宅褥

表6 ブレンド軟膏

湿潤環境	軟膏の組み合わせ例	水分含有率	
Dry	エレース末+生理食塩液	100%	
	オルセノン軟膏	70%	
	オルセノン軟膏+ゲーベッククリーム (1:1)	65%	
	ゲーベッククリーム	60%	
	オルセノン軟膏+リフラップ軟膏 (2:1)	55%	
	オルセノン軟膏+リフラップ軟膏 (1:1)	45%	
	オルセノン軟膏+ユーバスタ (1:1)	40%	
	ソルコセリル軟膏	25%	
	リフラップ軟膏	23%	
	オルセノン軟膏+テラジアバスタ (3:7)	21%	
	テラジアバスタ+リフラップ軟膏 (7:3)	6.9%	
	アクトシン軟膏	—	
		軟膏の組み合わせ例	水分吸収率
	Wet	プロメライン軟膏	—
オルセノン軟膏+デブリサン (4:1)		24%	
ユーバスタ		76%	
ユーバスタ+10~30%デブリサン		105~171%	
デブリサン+マクロゴール軟膏 (1:1)		200%	
	カデックス軟膏	370%	

瘡子防管理師のみ)を対象職種としています。多職種が参加する学会への参加はこれからの医療において大変重要となります。薬剤師免許取得4年以上、褥瘡学会正会員として4年以上の在籍期間が必要となり、褥瘡認定師は10例、在宅褥瘡予防・管理師は5例の症例記録が必要となります。詳細は日本褥瘡学会ホームページに記載されています。

## 10. おわりに

保険薬局は医療提供施設として位置づけられ、調剤と服薬指導という従来の業務にとどまらず、薬物療法の専門家としての役割が求

められます。改正薬事法も始まり、顔の見える薬剤師として医師や看護師等の多職種連携によるチーム医療への参画はより重要性を増すことになるでしょう。医療の担い手として真に必要とされる薬剤師をめざしましょう。

## 参考文献

- 古田勝経：褥瘡外用療法の本質、薬局別冊、vol.57, No.8, 南山堂, 2006
- 古田勝経：外用薬の特性に基づいた選択と使い方、調剤と情報、vol.13, No.8, 16-22, じほう, 2007
- 古田勝経：外用薬にはどんなものがあるか：褥瘡局所治療ガイドライン編, 59-80, メディカルレビュー社, 2007

原 著

# ヒト培養組織における加圧が 細胞外マトリックスに及ぼす影響 —褥瘡発生時の体圧との関連

Effect of Compressive Stress on the Extracellular Matrix in Human Fibroblasts and  
Endothelial Cells  
—Relation to Body Pressure When Pressure Ulcers Develop

松本尚子<sup>1)</sup>, 大島弓子<sup>2)</sup>, 米田雅彦<sup>3)</sup>

Hisako Matsumoto, Yumiko Oshima, Masahiko Yoneda

キーワード：細胞外マトリックス, 圧力, 褥瘡

Key words : ECM, compressive stress induced, pressure ulcer

## Abstract

The aim of this study was to elucidate the effect of physical body pressure on the destruction of the extracellular matrix (ECM) leading to pressure ulcers. Materials used were human normal skin fibroblast and umbilical endothelial cells. Following cultivation of both fibroblasts and endothelial cells in the presence or absence of physical pressure (50 mmHg), the change in cell morphology and ECM, levels of the degradation enzyme of ECM, such as MMPs, and alteration of gene expression were examined. In fibroblasts, in addition to the morphological change, down-regulation of fibronectin, up-regulation of versican, collagen, MMP 3, and ADAMTS 4 were observed, however, no prominent alteration was detected in endothelial cell morphology under the experimental conditions used. Therefore, it is suggested that physical body pressure of around 50 mmHg could be critical for dispersion of body pressure. However, physical pressure might also affect over all tissue, resulting in alteration of the ECM structure. It was suggested that nursing intervention based on not only the physical pressure but also the total over all tissue structure should be investigated.

## 要 旨

本研究の目的は、褥瘡の発生につながる細胞外マトリックス(以下 ECM とする)の破壊に対する体圧の影響を明らかにすることである。

材料は、ヒト線維芽細胞、血管内皮細胞である。培養した細胞に加圧(50 mmHg)を行った後、細胞形態と ECM の変化、MMP のような ECM の分解酵素と合成成分の発現を分析した。50 mmHg の加圧で線維芽細胞の形態は変化を起し、フィブロネクチンの発現の減少、パーシカン、コラーゲンと

受付日：2007年9月3日 受理日：2009年6月22日

1) 中部大学生命健康科学部保健看護学科 Department of Nursing, College of Life and Health Sciences, Chubu University 2) 神奈川県立保健福祉大学 Kanagawa University of Human Services 3) 愛知県立大学看護学部看護学科 Department of Nursing & Health, School of Nursing & Health, Aichi Prefectural University

MMP3, ADAMTS 4 の発現の増加を確認し, 血管内皮細胞の形態は変化を認めなかった。結果から, 約 50 mmHg 値を体圧分散の目安としていることは有効ではないかと考える。しかし, 圧力が組織全体へ影響を与え, 組織を支持している ECM 構築に変化を引き起こしている可能性もある。よって, 体圧のみではなく組織全体への影響も考えた看護介入を検討する必要性があることが示唆された。

## I. はじめに

褥瘡は, 圧力などの外的要因が関与して発生することは広く知られており, 過度・長時間の圧力により血管閉塞を起こし皮膚の統合をうまく調節できずに障害を引き起こすことは, 動物を対象とした実験により明らかにされている(入来ら, 1977; 武田ら, 2000)。また, 圧迫を回避するための看護介入に体圧分散があり, 体位による体圧値の変化(塚田ら, 2002)や, 体圧分散効果のある寝具の検討(横山ら, 2001)などの研究が数多くされている。

一方, 皮膚は表皮・真皮結合組織・皮下組織の3層から成り立っている。結合組織の中には細胞外マトリックス(extra cellular matrix, 以下 ECM とする)が細胞周囲に存在し, 細胞を支持することで組織の構築を保持しており, 創傷治癒過程で重要な役割を果たしている。ECM の代表的なものに, フィブロネクチン(fibronectin, 以下 FN とする), コラーゲン(collagen, 以下 COL とする), ヒアルロン酸(hyaluronan, 以下 HA とする), ヒアルロン酸結合型プロテオグリカンのパーシカン(versican, 以下 VN とする)がある。FN は ECM と細胞との結合, すなわち細胞接着や細胞移動の制御に関係している。COL はさまざまな種類があり, 主に結合組織の中に存在する線維性のタンパク質である。張力に対する抵抗が強く, 皮膚の強度を保つ役割があり, その代表的なものとして COL type I がある。また, HA は保水性が非常に高く, VN は HA と結合して巨大な複合体となることによってより多くの水分を保持し, 皮膚の弾性を保持している。

皮膚に圧力が加わり血管閉塞が引き起こされ褥瘡が発生するとされているが, 血管は結合組織に存在しており, その周囲には ECM が豊富に存在し血管を保持する役割を担っている。したがって, ECM も圧力による影響を受け, 褥瘡発生に関与していることは十分に考えられる。しかし, 結合組織を支えている ECM が圧力により影響を受けていることを示した報告は少なく(Tschumperlin et al., 2004; Ressler et al.,

2000), ECM が圧力を受けるとどのような影響を受けるのか明確にした研究はない。よって, 圧力による ECM の構成成分の質的変化の分析を行うこととした。

## II. 研究の目的

過度・長時間の圧力が細胞にどのような影響を与え, ECM にどのような変化を引き起こしているのか明らかにする。

## III. 研究方法

### 1. 材料

今回の研究では, 正常ヒト皮膚線維芽細胞(以下 NHDF とする, クラボウ社), 正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(以下 HUVEC とする, クラボウ社)を使用した。

### 2. 実験方法

#### 1) 細胞培養と加圧方法

NHDF には正常ヒト皮膚線維芽細胞増殖用低血清液培地(Medium 106S, Cascade Biologics社), HUVEC には正常血管内皮細胞増殖用培地(Humedia-EG 2, クラボウ社)を使用した。培養の条件としてインキュベーター(恒温器)内の環境を 37°C, 5% CO<sub>2</sub> とした。

加圧時にはリン酸系の培地液である Leibovitz's L-15 Medium(Gibco 社)に培地液を変え, 培地の pH が CO<sub>2</sub>濃度の影響を受けないように配慮した。加圧しない細胞(以下対照群とする), 加圧する細胞(以下実験群とする)に分け, 装置内へ置き加圧を行った。今回使用した加圧装置は新たに構築した装置であり, 加圧装置内の仕組みについては図 1 に示す。加圧装置は, 加圧以外の影響を受けないように厚手の壁になっており, 扉についているガラス窓から細胞の状態, 装置内の様子(圧力メーターの表示, 培地の色等)が観察できる。また, 装置のインキュベーター内温度は 37°C に保持し, 空気流入器と空気排出器で空気の量を調節し,



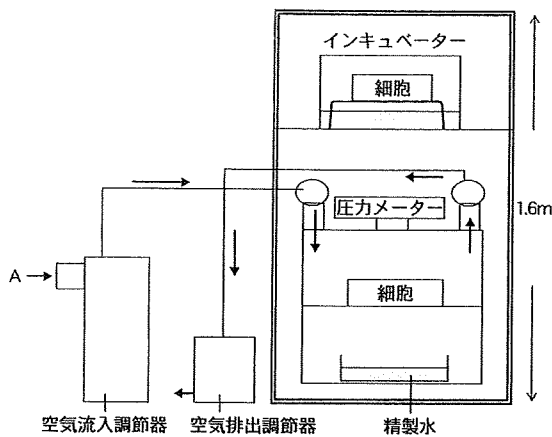


図1 加圧装置の構造

インキュベーター内の上層には対象群となる細胞を置き、下層の加圧装置内には実験群となる細胞を置いた。空気流入調節器と空気排出調節器で空気量を調節し加圧装置内に加圧を行った。メーターには圧力値(kPa)が表示される。空気(A)の流れを矢印(→)で示した。

加圧装置内にある加圧値メーターで値を確認し、一定の加圧を行った。空気の流れは矢印で示す。加圧値の設定については、仙骨部の褥瘡発生の体圧の境界域が40~50 mmHgであること(須釜ら, 2000), および毛細血管圧値が平均45 mmHg(Guyton, 1963), 40~50 mmHg(Landis, 1930)であることから平均6.88~7.00 kPa(約50 mmHg)とした。加圧時間は24時間とした。また、50 mmHgより低い加圧値で変化が起こるか確認する目的で、加圧30 mmHgとし同様の方法で分析を行った。

## 2) 生細胞染色

生細胞に特殊な色素を用いて染色し、顕微鏡での観察をより容易にすることができる。今回は、加圧による細胞形態の変化とECMの容量の変化を観察する目的で、染色を行った。

60 mm dishにカバーグラスを置き、NHDFおよびHUVECを $3 \times 10^5$  cells/mlでまき、培養を開始した。NHDFは培養7日目に、HUVECは培養5日目に細胞がカバーグラスの90%を覆う状態まで培養し加圧を行った。加圧は50 mmHgとした。加圧後、対照群、実験群の細胞を取り出し培地液を捨て、生細胞染色蛍光色素1 mg/ml Calcein AM (Cellstain社)と、蛍光色素25 mg/ml FITC-Dextran (Molecular Probes社)を添加し、Calcein AMは30分間染色、FITC-Dextranは5分間染色した。その後、カバー

グラスをスライドグラスに被せ封入し、蛍光顕微鏡にて観察し撮影を行った(Tschumperlin et al., 2004)。Calcein AM染色は生細胞内を蛍光染色し、FITC-Dextran染色はECMの存在領域を蛍光染色する。

## 3) 免疫組織化学

抗体を用いて組織標本中の抗原を検出する組織学的手法のことであり、抗原抗体反応を行った後、抗体を発色させることによって目的とする物質(抗原)の存在部分を示す(染色)することができる。組織に含まれる抗原の量が多い場合、発色反応が強く少ない場合は発色反応が弱まる。今回、加圧によるECM成分の変化を確認する目的で、それぞれのECMに対する抗体を用いて細胞の染色を行った。

方法は、実験1)と同様の方法でNHDFを培養し50 mmHgの加圧を行った。加圧後、細胞を3%ホルマリン液で固定をし、ABC法(Paiva et al., 2005)に従って染色を行った。細胞は、1%リン酸緩衝塩溶液(140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 以下PBSとする)で数回洗浄後、以下に述べる抗体(直接検出したいECMと結合する抗体)と反応させ、再度1%PBSで洗浄後、ヒストファインSAB-PO(R)キット(ニチレイ社)を用いて結合した抗体を褐色に発色させた。

使用した抗体は、anti-human FN(コスモバイオ社)、anti-human collagen type I (Abcam社)、anti-human versican(6084) (Hasegawa et al., 2007)とanti-human tubulin(Sigma社)とし、抗体はすべて500倍に希釈して使用した。また、光学顕微鏡で撮影を行った。

結果から、細胞形態および染色での変化を認めため、メッセンジャーRNA(messenger ribonucleic acid, 以下mRNAとする)の発現レベルに変化があるのかを確認する目的で以下の分析を行った。

## 4) RT-PCR(逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応法)

RT-PCRとは逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応法(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)のことである。逆転写酵素によるmRNAからの相補的デオキシリボ核酸(complementary deoxyribonucleic acid, 以下cDNAとする)を作製し、それを鋳型にして目的の遺伝子の特異的プライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応法で遺伝子を増幅し、その遺伝子の発現を確認する方法である。プライマーとはDNA

表1 プライマーの塩基配列とPCR条件

遺伝子	プライマー(5'-3')	サイズ(bp)	変性	アニーリング	反応	サイクル数
<i>G3PDH</i>	ACCACAGTCATGCCATCAC TCCAGCACCTGTTGCTGTA'	457	98°C	55°C	74°C	25
<i>MMP3</i>	CCTGCTTTGTCTTTGATGC TGAGTCAACCCTGGAAAGTC	432	95°C	60°C	72°C	35
<i>MMP10</i>	CTGCCATTGAGAAAGCTCTGA CCTGCTTGTACCTCATTTCCCTC	718	95°C	60°C	72°C	35
<i>MMP7</i>	TTTGATGGGCCAGGAAACAC GGGGATCTCCATTTCCATAG	220	95°C	57°C	72°C	35
<i>ADAMTS1</i>	GGACAGGTGCAAGCTCATCTG TCTACAACCTTGGGCTGCAAA	72	95°C	59°C	72°C	40
<i>ADAMTS4</i>	CAAGGTCCCATTGTGCAACGT CATCTGCCACCACCAGTGTCT	115	95°C	59°C	72°C	40
<i>FN</i>	GATAATCAACAGTGGGAGC CCCAGATCATGGAGTCTTTA	184	95°C	60°C	72°C	35
<i>HYAL-1</i>	CTGGGTGAGCTGGGAAAATA GCAGGGTTAAGGAGGAGGAG	195	95°C	65°C	72°C	35
<i>HYAL-2</i>	TTGTGAGCTTCCGTGTTCAG GTCTCCGTGCTTGTGGTGTGA	217	95°C	63°C	72°C	35
<i>hV0</i>	TCAACATCTCATGTTCCCTCCC TTCTTCACTGTGGGTATAGGTCTA	405	95°C	61°C	72°C	35
<i>hV1</i>	GGCTTTGACCAGTGCATTAC TTCTTCACTGTGGGTATAGGTCTA	336	95°C	61°C	72°C	35
<i>hV2</i>	TCAACATCTCATGTTCCCTCCC CCAGCCATAGTCACATGTCTC	498	95°C	61°C	72°C	35
<i>hV3</i>	GGCTTTGACCAGTGCATTAC CCAGCCATAGTCACATGTCTC	429	95°C	61°C	72°C	35

ポリメラーゼによるDNA合成(複製)に必要な鋳型に対して相補的な20~30個程度の人工合成DNAのことである。

NHDFを $8.95 \times 10^5$  cells/mlで75 cm<sup>2</sup>フラスコにまき、実験1)と同様の方法で培養し、50 mmHgの加圧を行った。

#### (1) RNA抽出とcDNA作製

RNA抽出は、トリゾール試液(TRIZOL Regent, Gibco社)を用い、その他、クロロホルム液、イソプロパノール液を使用しRNAを分離し抽出した。cDNA作成は文献の方法に従った(Li et al., 2003)。試薬は、Super script<sup>TM</sup> First-strand synthesis system for RT-PCR(Invitrogen社)を使用した。

#### (2) polymerase chain reaction(PCR:ポリメラーゼ連鎖反応)

分析した遺伝子の発現は、解糖系のグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 以下G3PDHとする)、ECMの分解酵素マトリックス金属プロテアーゼ(matrix metalloproteinase, 以下MMPとする)に

含まれるMMP3, 7, 10, MMPs類縁酵素のADAMTS(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin domains, 以下ADAMTSとする)に含まれるADAMTS 1, 4である。また、MMPsとADAMTSの基質としてのECMの分子(FN, COL type I, VN(V0, V1, V2, V3))についても分析を行った。G3PDHはほとんどの組織や細胞で常に一定量発現している遺伝子であり、使用する目的は実験の内部コントロール(実験操作に問題がないか確かめるための対照実験)として遺伝子を増幅することである。使用したThermal cycler PERSONALは、TP 240型(Takara社)である。

プライマーの塩基配列、PCRの設定条件は表1に示した(Li et al., 2003; Paiva et al., 2005; Cattaruzza et al., 2002; Jones et al., 2004; Porter et al., 2004; Khan et al., 2004; Sandy et al., 2001)。なお、遺伝子についてはイタリックで表記する。PCRで得られた産物を2%のアガロースゲルで電気泳動した。その後、エチジウムブロマイドで染色し生成物の確認を行った。

加圧 50 mmHg の mRNA の中で *MMP3* の変化が顕著にみられたため、タンパク質の段階で *MMP3* の変化があるのか確認を行った。

#### 5) 2次元電気泳動法によるタンパク質の分離

2次元電気泳動は、等電点による分離(1次元目)と分子量による分離(2次元目)の組み合わせにより、さまざまな生物学的試料に含まれるタンパク質を個々の定量可能なスポットとして確認することができる。今回は、タンパク質レベルでも加圧 50 mmHg による変化があるのか確認する目的で分析を行った。

方法 1) で得られた対照群と実験群の細胞に Cel-Lytic™-M Mammalian cell lysis/extraction reagent (Sigma 社) を加え懸濁した。細胞を振とう機で 15 分間インキュベートし 12,000 rpm 15 分間遠心後、1次元用サンプルバッファー〈尿素 1.14 g, 10% (w/v) Triton X-100 (非イオン性界面活性剤) 保存溶液 400  $\mu$ l, 2-メルカプトエタノール 100  $\mu$ l, バイオライト 5/7 (40%) 80  $\mu$ l, バイオライト 3/10 (40%) 20  $\mu$ l〉を加え溶解した。37°C, 30 分インキュベートした後、電圧 500 V で 10 分間, 750 V で 4 時間, 等電点電気泳動を行った。泳動後, 2次元電気泳動用ゲル 5~15% にのせ, 電圧 75 V で 15 分間, 175 V で 60 分間泳動した。*MMP3* タンパクの分子の大きさや位置を確認するために精製された *MMP3* タンパク質 (Human *MMP-3* purified protein, Chemicon 社) の泳動も同様の方法で行った。使用した試薬, ゲルともに Bio-Rad 社製を使用した。電気泳動終了後, 分離されたタンパク質はトランスバッファー (25 mM トリス, 192 mM グリシン, 15% メタノール) 中においてニトロセルロース膜 (Hybaod-C Extra, GE Healthcare 社) に転写した。転写条件は 4°C, 電圧 8 V で約 16 時間とした。

#### 6) イムノブロッティングによるタンパク質抗体反応

転写後のニトロセルロース膜を 10% スキムミルク溶液を用いて 42°C で 1 時間ブロッキングした後, ウサギ抗ヒト *MMP3* 抗体 (Biogenesis 社) を 500 倍に希釈したものに浸し, 室温で 1 時間振とうした。PBS-0.1%, Tween-20 (非イオン性界面活性剤, 以下 PBS-Tween とする) で 1 時間洗浄後, 二次抗体 (HRP 結合 anti rabbit IgG, sheep Ig フラクシオン, Dako 社) を 5,000 倍に希釈したものに浸し, 室温で 1 時間遮光して振とうした。PBS-Tween で 1 時間

洗浄後, 視覚化するために化学発光試薬 (Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus, PerkinElmer Life Sciences 社) と X 線フィルム (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences 社) で検出した。免疫組織化学と同様に抗原抗体反応を行った後, 抗原と結合した抗体が存在する部分を発色させることによって, 目的とする物質 (抗原) の存在部分を染色することができる。抗原の量が多いほど発色反応が強くなる。

## IV. 倫理上の手続き

研究の対象となる細胞は業者より購入し, 細胞の処理は医療廃棄物として適切に処理をすることを明確にし, 愛知県立看護大学研究倫理審査委員会の承認を得た。

## V. 結果

### 1. 加圧による細胞形態の変化

Calcein AM 染色は生細胞内, FITC-Dextran 染色は細胞外, すなわち ECM の存在領域を緑色蛍光染色する (図 2-a, b の写真では灰色部分として示される)。図 2-a より, NHDF の対照群は個々の細胞が独立し細胞の形態を維持しているのに対し, 実験群は細くなり方向性を持ち形態が変化をしていた。FITC-Dextran 染色では, 実験群は対照群と比べ染色されている部分が多く黒く染まっていない部分が少なかった。図 2-b より, HUVEC の Calcein AM 染色は, 対照群と実験群ともに菱形様の細胞形態を保ち, 両者に大きな差は認められなかった。また, FITC-Dextran 染色も同様に, 対照群と実験群ともに染色の間隔や広さに大きな差は認められなかった。つまり NHDF は加圧すると細胞の形態が変わり細胞の周りの空間が広がるのに対し, HUVEC は加圧しても細胞の形態や細胞間隔に大きな変化は認められないことが確認できた。

### 2. 加圧による ECM の変化

図 2-c より FN は, 対照群は均一に染色されているのに対し, 実験群は粗野になって不均一であった。VN は対照群に比べ実験群は密になり, 凝縮されたような状態であった。COL type I は, 対照群はほとんど染色されていないのに対し, 実験群は染色されてい

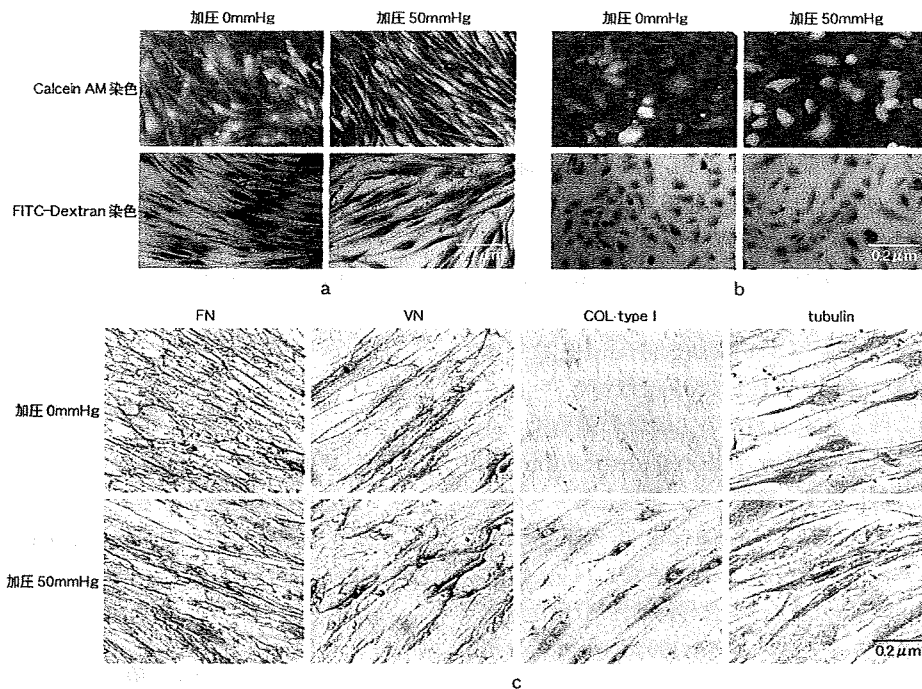


図2 線維芽細胞、血管内皮細胞の生細胞染色と線維芽細胞の免疫組織化学による結果

線維芽細胞および血管内皮細胞を50 mmHgで24時間加圧して培養した。Calcein AM染色は生細胞内を、FITC-Dextran染色はECMの存在領域を緑色蛍光染色する(a, bでは灰色に示されている)。a: 線維芽細胞の生細胞染色 b: 血管内皮細胞の生細胞染色 c: 線維芽細胞の免疫組織化学

た。tubulinは対照群に比べ実験群のほうが強く染色されており、形態の変化を示していた。

### 3. 加圧による遺伝子発現の変化

図3-aに示すように、加圧50 mmHgではG3PDHは対照群と実験群の両者において発現が確認され、発現量に差は認められなかった。MMP3は対照群と実験群ともに発現が認められ、実験群は発現量が増加していた。MMP7は対照群に反応の弱い発現が認められ、実験群に発現は認めなかった。MMP10は両者ともに発現を認めなかった。ADAMTS1は両者ともに発現を認めなかった。ADAMTS4は対照群に発現がなく、実験群に弱い発現が認められた。ヒアルロニダーゼのHYAL1, HYAL2は両者において発現が確認され発現量に差は認められなかった。合成成分であるFNは、対照群と実験群ともに発現が認められ、対照群より実験群は発現量が減少していた。VNスプライシングフォーム(V0, V1, V2, V3)のうちV0は実験群に発現量の増加が認められた。COL type Iは両者に発現が認められたが差はなかった。

また、図3-bに示すように加圧30 mmHgでは、

MMP3, MMP7, *all*FN, ADAMTS1, ADAMTS4, HYAL1,2, VNスプライシングフォーム(V0, V1, V2, V3)には対照群、実験群に大きな差は認められなかった。MMP10は対照群に発現がなく、実験群に弱い発現が認められた。HYAL1, HYAL2は両者に発現が認められたが発現量に差はなかった。COL type Iは両者に発現が認められたが差はなかった。

### 4. 加圧によるMMP 3タンパク質の変化

精製されたMMP 3タンパク質の分子量は57, 59 kDaであるが、図4に示すように、対照群と実験群ともに57, 59 kDaの位置に発現が認められ、MMP 3タンパク質が発現していた。MMP 3タンパク質の発現量は対照群と比べ、実験群のほうが増加していた。37 kDaに認められる反応は、二次抗体による非特異的結合と考えられ、両群でその強さに差はほとんど認められなかった。

なお、加圧30 mmHgを行った生細胞染色、免疫組織化学の分析結果については両者に差はなかった。今回の実験は5回行っており、データのばらつきは認

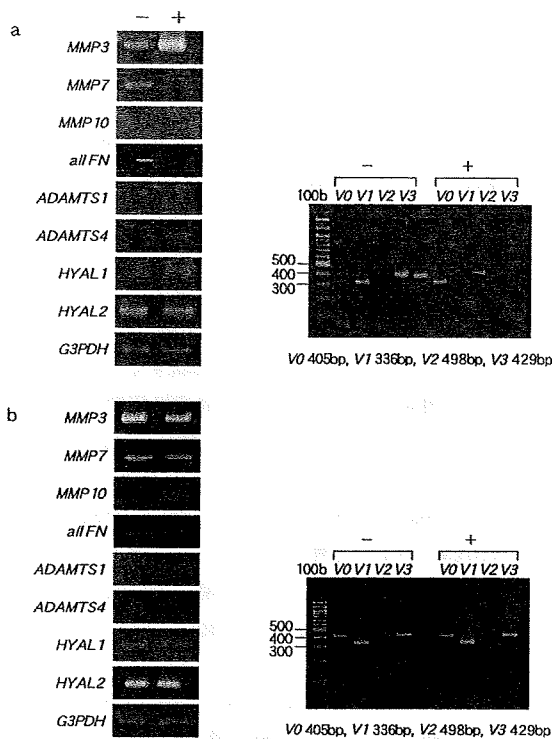


図3 加圧によるRT-PCRの結果

a: 線維芽細胞を50 mmHgで24時間加圧後、対照群、実験群より抽出したRNAを各遺伝子特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。使用したプライマーは、マトリックス金属プロテアーゼ(MMPs)であるMMP3, 7, 10, MMPの類縁酵素のADAMTS 1, 4, ヒアルロン酸分解酵素(HYAL)のHYAL 1, 2, フィブロネクチンのall FN, パンシカンのV0, V1, V2, V3である。

b: 線維芽細胞を30 mmHgで24時間加圧後、対照群、実験群より抽出したRNAを各遺伝子特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。使用したプライマーは、加圧50 mmHg時に使用したプライマーと同様である。

増幅されたDNA断片は、電気泳動を行い確認した。V0, V1, V2, V3に関しては分子サイズを明記した。(-)は対照群、(+)は実験群を示す。

められなかった。

## Ⅶ. 考 察

本研究では、結合組織の中に存在するECMに着目し、加圧によるECMへの影響を培養細胞を用いて検討した。細胞は正常ヒト線維芽細胞NHDFおよび正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞HUVECを使用した。加圧を50 mmHgで24時間行った後、生細胞染色、免疫組織化学、RT-PCR、2次元電気泳動で分析を行った結果、細胞形態や細胞内のECMに関連する遺伝子やタンパクの発現に変化がみられ、加圧がECM

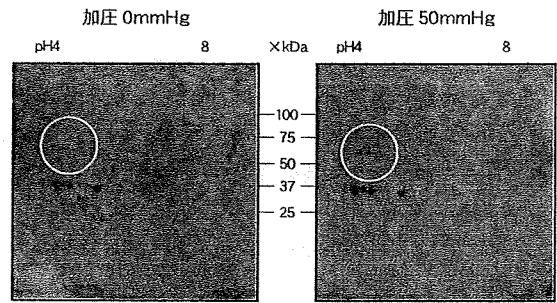


図4 2次元電気泳動によるMMP3の抗体反応

線維芽細胞を50 mmHgで24時間加圧後、対照群、実験群の細胞からタンパク質を抽出し、2次元電気泳動後イムノプロットを行った。MMP3の場所は白色の○で示した。

に影響を及ぼしていることが明らかとなった。また、RT-PCRの分析では加圧30 mmHgによってMMP10の発現の上昇を認めたことから、50 mmHgより低い圧によってもECMに影響を及ぼしている可能性があることが明らかになった。

### 1. 加圧による細胞形態の変化について

NHDFのCalcein AM染色とFITC-Dextran染色の結果から、NHDFは加圧すると細胞と細胞の間隔が広がることで細胞周囲に存在していたECMを伸展させたり、物理的な切断で細胞とECMの接着が弱まり、ECMの構築の変化と密接に関係していると考えられる。また、細胞機能は細胞形態に依存することも多く、細胞の形態が変化することは細胞内の物質代謝に影響を与えていることが考えられる。HUVECでは、Calcein AM染色、FITC-Dextran染色において対照群と実験群ともに細胞の形態や細胞と細胞の間隔に大きな差は認められなかった。このことより、HUVECは圧力による影響を受けにくいのではないかと考えられる。つまり、結合組織中に存在するNHDFは加圧による影響を受けるが、血管を形成しているHUVECは加圧の影響を受けにくいことがいえる。圧力により血管閉塞が引き起こされ酸素や栄養が運ばれなくなり、細胞の代謝へ影響する報告がある(武田, 2002)。しかし、圧力が直接的に線維芽細胞の形態に変化をもたらす、ECM分子の合成に影響が加わり、結合組織の構築が変化することで組織の障害を引き起こしていることも考えられる。

### 2. 加圧によるECMの変化について

免疫組織化学ではFN, VN, COL type I につい