

I→i	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こす可能性がある
I→i	ポビドンヨード	イシジゲル 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・トリブシン	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	ユーバスタコーワ・軟膏 ソアナスバスタ・軟膏 ドルミジンバスタ イソジンシュガーバスタ スクロードバスタ ネグミンシュガー軟膏 ポビドリンバスタ 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 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

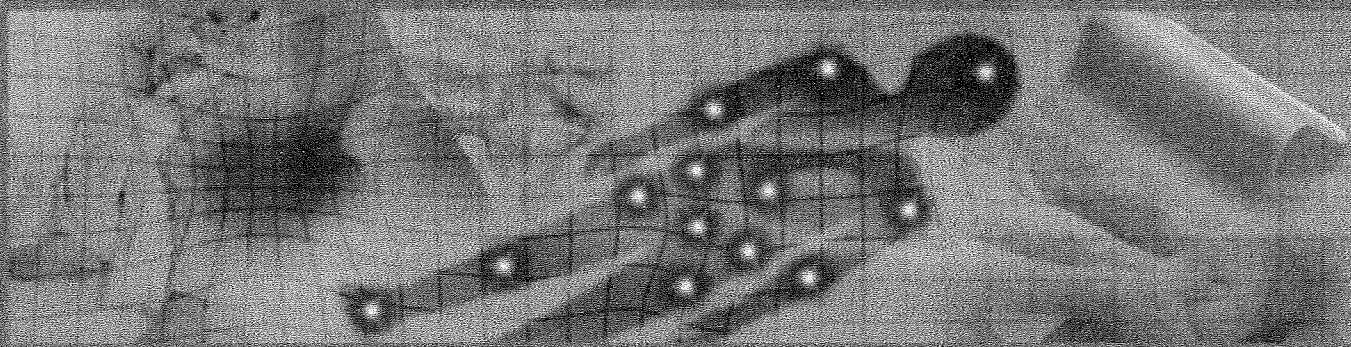
P→(-)

	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	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) 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	ユーバスタコーワ・軟膏 ソアナスバスタ・軟膏 ドルミジンバスタ イソジンシュガーバスタ スクロードバスタ ネグミンシュガー軟膏 ポビドリンバスタ 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 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

看護のすべてがわかる!

エキスパート
Expert
ナース
Nurse 
ガイド
Guides

褥瘡治療・ケア トータルガイド



編集

宮地良樹 京都大学大学院医学研究科皮膚科学教授

溝上祐子 日本看護協会看護研修学校副校長
皮膚・排泄ケア学科主任教員

最新
シリーズ

エビデンス **決定版**
に基づく
新ガイドライン **準拠!**

Expert Nurse  Guides

照林社 定価3,990円 本体3,800円

褥瘡局所治療における 薬剤選択の考え方

Points

- 外用薬の選択は薬効成分と基剤特性の両面で選択する。
- 局所の湿潤環境は滲出液の量のほか、外用薬に含まれる水分量などの影響を受ける。
- 外用薬の剤形は褥瘡の形状に影響する。

褥瘡局所治療に用いる外用薬

- 褥瘡治療における外用薬の考え方については、薬剤の特性に基づいた選択や使用方法が適切に行われていない状況が見られる。
- 適切ではない使い方により外用薬本来の効果が十分に発揮されず、その結果、褥瘡局所治療における外用薬の役割も軽視されがちである。
- 外用薬はそれらの特性を理解しなければ、効果のある使用はできない。現在、褥瘡局所治療に用いられる外用薬は18成分42品目あるが、それらの特性は品目ごとに異なる。
- 日本褥瘡学会編集『褥瘡予防・管理ガイドライン』（以下、ガイドラインという）には、それらの外用薬がDESIGNツールに即して分類されている。
- ガイドラインに記載されている外用薬の特性と留意点について、浅い褥瘡の場合を表1に、深い褥瘡の場合を巻末資料（p.307～312参照）に示す。
- 病院や診療所など施設ごとに外用薬の採用に対する考え方や品目数の取り扱いなどに差があり、一律に薬効成分のみで薬剤を選択した場合には期待した効果が得られない場合もある。つまり、病態と外用薬の特性が合致しなければ、期待はずれとなる。旧来の薬剤選択の指標だけではかえって悪化することもある。
- このような病態に対してどのような対策が必要なのか、薬剤の選択には適正な使用を前提とした考え方が必要である。適切な選択や適正な使用のためには医師や薬剤師との多職種協働が不可欠となる。

COMMENTS

外用薬の18成分

- カテキソマー・ヨウ素
- スルファジアジン銀
- デキストラノマー（高度管理医療機器）
- フィブリノリジン・テオキシリボヌクレアーゼ配合剤
- プロメライン
- ポビドンヨード・シュガー
- フラジオマイシン硫酸塩・結晶トリブシン
- アルミニウムクロロヒドロキシアラントイネート
- 塩化リゾチーム
- トラフェルミン
- トレチノイントコフェリル
- ブクラデシンナトリウム
- プロスタグランジンE₁
- 幼牛血液抽出物
- ジメチルイソプロピルアスレン
- 酸化亜鉛
- ポビドンヨード
- ヨードホルム

表1 外用薬の特性と留意点：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温を行う。	【油脂性基剤】 ・白色ワセリン：ジメチルイソプロピルアズレン（アズノール [®] 軟膏、ハスレン [®] 軟膏）、酸化亜鉛（亜鉛華軟膏、亜鉛華単軟膏、ウイルゾン軟膏、サトウザルベ軟膏、酸化亜鉛） ・プラスチックベース：プロスタグランジンE ₁ （プロスタンディン [®] 軟膏）
水泡	水泡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。 ・水泡が破れた場合は、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を用いる。	【油脂性基剤】 ・白色ワセリン：ジメチルイソプロピルアズレン（アズノール [®] 軟膏、ハスレン [®] 軟膏）、酸化亜鉛（亜鉛華軟膏、亜鉛華単軟膏、ウイルゾン軟膏、サトウザルベ軟膏、酸化亜鉛） ・プラスチックベース：プロスタグランジンE ₁ （プロスタンディン [®] 軟膏） 【乳剤性基剤】（水分量が少ない） ・塩化リゾチーム（リフラップ [®] 軟膏、リフラップ [®] シート）、幼牛血液抽出液（ソルコセルル [®] 軟膏） 【水溶性基剤】 ・マクロゴール基剤：ブクラデシンナトリウム（アクトシン [®] 軟膏）

どのような外用薬があるか

- 外用薬にはさまざまな剤形が存在する。最も種類の多い軟膏剤をはじめ、貼付剤、スプレー剤、粉末剤、顆粒剤、包帯材料、ビーズにいたるまで形態が異なる
- 外用薬は薬効成分を効果的に作用させるために適した剤形とされている。しかし、剤形は主に薬効成分の安定性や放出性、用途から選択され、必ずしも使用する病態に適したものとなっていない場合があり、結果的に病態と合致しない状況もある。そのために病態に合った剤形を選択するとともにその使用方法についても配慮しなければならない。
- 特に軟膏剤では、製剤に使用されている軟膏基剤の特性が効果に大きく影響するため、十分な注意が必要となる。

軟膏基剤¹⁾（以下、基剤という）とは

- 軟膏は主薬としての薬効成分だけで作られているわけではない。薬効成分は約1%前後の含有率しかない。
- 軟膏を成形しているのは基剤といわれる添加剤であり、それが構成成分の大部分を占めている。薬剤として認可されている理由は、そのわずかな薬効成分に薬理作用が認められ、治療効果があるからである。よって薬事法で医薬品としての製造承認が与えられている。

COMMENTS

軟膏基剤

- 創の状態を把握したうえで、どのような基剤が適当かを判断して軟膏剤を選択する。
- 油脂性基剤、乳剤性基剤（W/O）：創を保護、保湿する目的で使用する。
- 水溶性基剤：創の滲出液を吸収させたい場合に使用する。
- ゲル基剤：水分を供給させたり、吸収したりする場合に使用する。

- それらの軟膏の大部分を占める基剤は油脂性、乳剤性、水溶性に分けられる(表2)。代表的な基剤に、油脂性としては白色ワセリン、乳剤性としては親水軟膏や吸水軟膏、水溶性としてはマクロゴール軟膏がある。吸水軟膏は名称と異なり吸水性はほとんどなく、マクロゴール軟膏は吸水性がある。
- 各基剤はそれぞれ特性があり、油脂性は創面保護や保湿、乳剤性は創面保護や保湿のほか保水性、水溶性は吸湿性を有する。
- 基剤の重要性については前述したガイドラインにも記載されている。軟膏剤の選択は薬効成分だけではなく、基剤の特性にも考慮しなければならない、車の両輪といえる。
- 軟膏剤の外用では、軟膏が創面に接触していなければ薬効成分が薬理作用を発揮できないだけでなく、適切な湿潤環境を保持することも難しい。

COMMENTS

- 乳剤性基剤(O/W):水分を多く含むために創の保水に用いる。
- 湿潤状態によって基剤の適・不適が決まる。

基剤と湿潤環境

- 先述した基剤の特性は、治癒環境として重要な役割を担う湿潤環境に影響する。
- 基本は、滲出液が多い創には水溶性基剤、保湿したい創には油脂性または油分の多い乳剤性、乾いた創には水分の多い乳剤性基剤を選択することである。
- 滲出液が過剰な場合は余分な水分を吸収し、湿潤が不足する場合には水分を補う必要があるが、いずれも過度な状態を回避し、適正な湿潤環境を保持することが重要な点である。適正水分量は創

COMMENTS

- 湿潤環境は細胞の増殖に適した状態と考えられる。
- 湿潤の度合いは多すぎても少なすぎても適切ではない。
- 肉芽形成過程ではそれに適した湿潤の程度が必要であり、上皮化では湿潤の保持は肉芽形成と異なる。
- 創面水分量は、モイスチャー・チェッカーにより測定することができる。

表2 外用薬の軟膏基剤による分類

滲出液	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		
↑ 多	親水性基剤	水溶性基剤	マクロゴール軟膏 (+ビーズ)	カデックス®軟膏	—	370%	
			マクロゴール400 (+ビーズ)	デブリザン® (ペースト)	—	300%	
			マクロゴール軟膏 (+白糖)	ユーバスター®軟膏	—	76%	
			マクロゴール軟膏	アクトシン®軟膏	—	—	
				アラントロックス®軟膏	—	—	
	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	亜鉛華軟膏	—	—
			動植物性	単軟膏、亜鉛華軟膏	アズノール®軟膏	—	—
			油中水型 (W/O)	吸水軟膏、コールドクリーム	リフラップ®軟膏	21%	—
				親水ワセリン、ラノリン	ソルコセリル®軟膏	25%	—
				水中油型 (O/W)	親水軟膏、パニシングクリーム	オルセノン®軟膏	73%
親水性基剤	乳剤性基剤	親水軟膏、パニシングクリーム	ゲーベン®クリーム	67%	—		
		—	—	—	—		
↓ 少							

面水分量として約60~70%を目安とする。(図1)

- ちなみに、湿潤環境は創傷治療に関係する局所環境因子³⁾の一つで、これ以外に壊死組織や感染、細胞増殖因子、pH、温度、酸素濃度が存在し、薬効成分や基剤との関連性が強い。

滲出液量と基剤の薬理作用との関係

- 褥瘡の病態における大まかな指標として、大きさ、深さ、滲出液、感染/炎症、肉芽組織、壊死組織、ポケット形成があるが、基剤は滲出液に影響される
- 基剤は滲出液量の影響を受けて薬効成分の薬理作用が発揮されるかどうかを左右する
- 例を挙げると、滲出液量が多い場合の肉芽形成促進では、オルセノン[®]軟膏は浮腫や感染等を起こす可能性があり、好ましくない。滲出液が少なく、乾き気味の創では適応となる。上皮化を進めたい場合、肉芽の水分量が多いときはアクトシン[®]軟膏が適するが、乾いているときは上皮化が停止してしまう可能性がある。外用薬を使用するにあたっては滲出液量や創の湿潤環境レベルがどの程度かを把握したうえで使用薬剤を選択することが必要である。
- 薬効成分の効果と基剤の特性が合致しない場合には、選択した軟膏の基剤特性と異なる基剤をブレンドして調製する必要がある。
- 基剤の調製により湿潤状態をコントロールするが、薬効成分や基剤の安定性に影響することがあるため、やみくもに混合してはならない。
- 混合することにより薬効成分が分解したり、安定性が破壊され、

COMMENTS

- 局所環境因子の各項目のうち、湿潤、壊死組織、感染、細胞増殖因子が薬剤の効果に影響する。

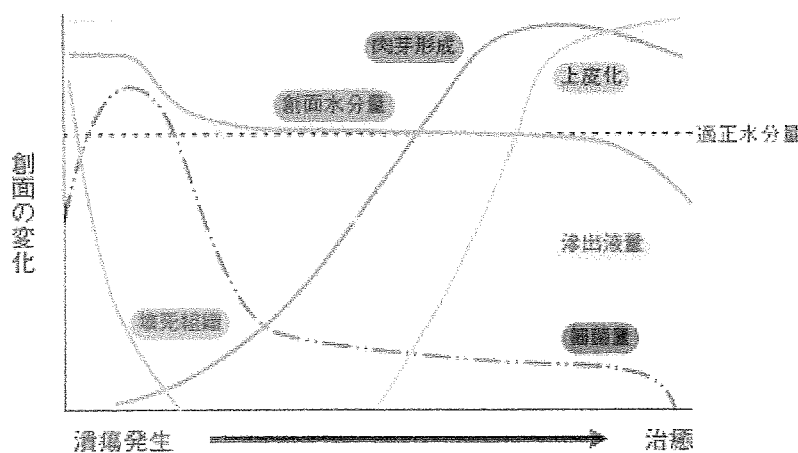
COMMENTS

- 基剤の特性は滲出液量に関係する。
- 乾いた創面では、薬効成分は効果を発揮できない。
- 単なる軟膏の混合は成分の分解や化学変化を起こす。
- ブレンド軟膏は配合比が一定の割合に定められている。

5

褥瘡の局所治療

図1 水分コントロールによる湿潤環境



治療開始当初、滲出液が多い場合を想定した図であり、滲出液の減少に伴い、創面の水分量も減少するが、肉芽形成に必要な湿潤環境を保持するためにある一定の創面水分量を維持することが必要である。十分な肉芽形成ののちに上皮化へ移行するが、それに伴い創面の水分量は減少する。これが創面の水分コントロールに注目した治療過程である。

古田勝程：外用薬の特性に基づいた選択と使い方。調剤と情報 2007；13：928-934より引用

期待した効果が得られないこともある。そのため薬剤師の関与が必須である。効率的な外用療法をすすめるうえで多職種協働が必要な理由の一つとして挙げられる。

- 表3¹⁾は配合変化のないことを安定性試験等で確認されたブレンド軟膏の一例である。

剤形と創の形状

- シンプルな剤形に散剤がある。例えば、フランセチン・T・パウダーは酵素と抗生物質が配合された製剤である。
- 散剤は創部に散布して用いる。その際、創部が湿っている必要がある。なぜなら、酵素は水分の存在がなければ効果を発揮せず、粉末は湿った創面でなければ付着しないからである。また、粉末を散布するには創面が平らな状態が適しているが、複雑に入りくんだ形状の創には散布しづらいこともある。このことは顆粒剤にも共通している。
- スプレー剤も同様のことがいえる。ファイブラスト[®]スプレーを使用する際、ポケット形成や痙攣状の創形状は薬剤が最奥部へ到達しにくく、効果が得られないことがある。この場合には、創傷被覆材ベスキチン[®]W-Aと併用し、ファイブラスト[®]スプレーの薬効成分をポケットの最奥部へ送り込むことでポケットの修復を可能にする²⁾。
- 貼付剤のリフラップ[®]シートは、リフラップ[®]軟膏が平面上の支持体に塗布されている。シート状のため、創が浅く、平面な創に適している。
- ヨードホルムガーゼは、消毒剤のヨードホルムが含浸されたガーゼである。ガーゼの形態から使用する形状を選ばず、深い創も浅い創も支障はない。一度に大量を使用する必要はなく、最小限に留める。

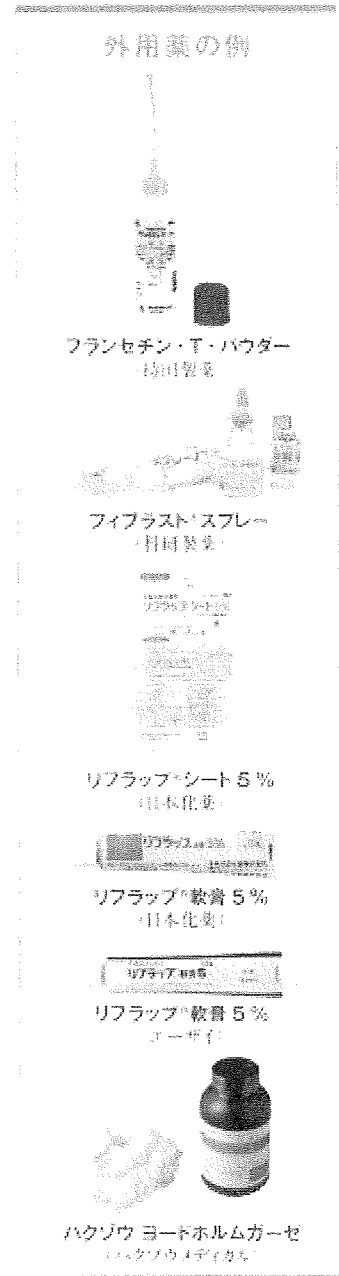


表3 ブレンド軟膏

外用薬	保水率	吸水率
リフラップ [®] 軟膏+オルセノン [®] 軟膏 (1:1)	45%	0%
デブリサン [®] +オルセノン [®] 軟膏 (1:1)	0%	24%
ユーバスター [®] 軟膏+オルセノン [®] 軟膏 (3:1)	40%	0%
テラジア [®] バスタ+リフラップ [®] 軟膏 (7:3)	7%	0%
テラジア [®] バスタ+オルセノン [®] 軟膏 (8:2)	0%	21%

野田南弘, 野原兼子, 水野正子, 古田勝経: 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 2004; 6: 595.より引用

- このように創形は創の形状を選ぶことがある。外用薬の効果を引き出すうえで創形も影響する場合があることに注意する必要がある

外用薬の効果を維持するための創環境

- 高齢者の皮膚の特徴は、老化による影響から水分量や皮表脂質量の低下、コラーゲンの低下などからしわやたるみが多く見られることである。これは皮膚自体がルーズになり、動きやすい状況を作り上げている。言い換えれば、褥瘡の創が動きやすいことを示している。
- 高齢者の場合、皮膚は任意の位置から5 cm程度動くことはよくみられる。そこに創が存在すれば、当然創も移動するが、創の存在によりその部分における皮膚の連続性が途絶えるために単なる移動ではなく、変形をとまなう。
- 外用薬を創内へ外用した際、外力によって移動や変形することにより投入された軟膏が創内に滞留しにくい状況が生まれ、効果が持続しにくくなる。その結果、十分な効果が得られないことがある。
- そのような状況を回避し、安定した効果を得るためにドラッグ・デリバリー・システム（DDS：drug delivery system）という考え方を利用し、効果的に薬剤を使用することが重要である。DDSは外力による摩擦やずれを抑制し、治療を促すのに有効である。薬剤の効果を十分発揮させるための創環境づくりの原点である。

*

- 以上のように、外用薬を適切に選択・適正に使用することが褥瘡における薬物療法を円滑、かつ効果的にすすめる重要なポイントであり、治療期間の短縮にもつながる。
- その上には看護の予防対策が不可欠である。そのうえで薬剤の効果が発揮される。

（古田勝経）

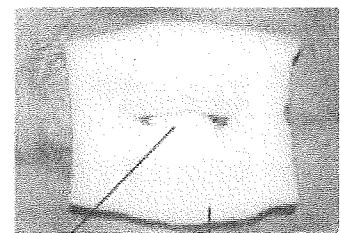
引用文献

1. 古田勝経：褥瘡 外用療法の本質。薬局 2006；57（8月臨時増刊号）：25-33.
2. 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 2007；13：928-934.
3. 穴沢貞夫監修：改訂ドレッシング・新しい創傷管理。へるす出版、東京、2005：41-52.
4. 野田康弘、野原葉子、水野正子、古田勝経：褥瘡保存的治療のためのフレンド軟膏の製剤学的妥当性。褥瘡会誌 2004；6：593-598.
5. 古田勝経、野田康弘、遠藤英俊：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 2006；8：177-182.

COMMENTS

DDSを利用した創の固定

- 創直下、創口、創周囲に骨突出など外力により移動や変形を起こしやすい場合は創内の外用薬、特に軟膏剤の漏出等を防止する。
- 安定したDDSを確保するために、レストンTMやテーピングなどを利用して創の固定や保護することで薬剤を創内に滞留させることが重要である。



外用薬

レストンTM

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¹⁾, 大島弓子²⁾, 米田雅彦³⁾

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 ADAMTS4 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、フィブロンectin の発現の減少、バーシカン、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

MMP 3, 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 の構成成分の質的变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% CO₂ 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 CO₂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,

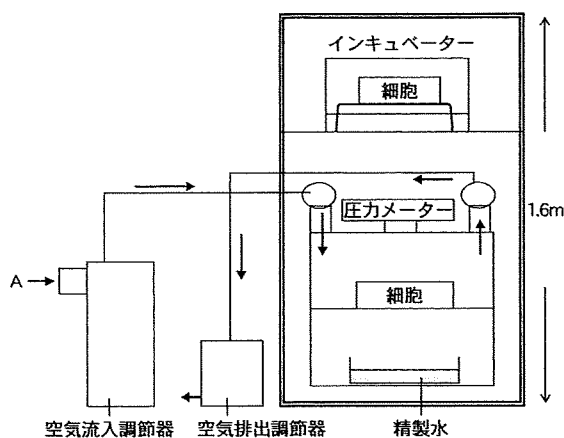


図1 加圧装置の構造

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にカバーガラスを置き、NHDFおよびHUVECを 3×10^5 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ガラスの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

ガラスをスライドガラスに被せ封入し、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 Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_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 TCCACCACCTGTTGCTGTA'	457	98°C	55°C	74°C	25
<i>MMP3</i>	CCTGCTTTGTCCTTTGATGC TGAGTCAACCCTGGAAAGTC	432	95°C	60°C	72°C	35
<i>MMP10</i>	CTGCCATTGAGAAAGCTCTGA CCTGCTTGTACCTCATTTCCTC	718	95°C	60°C	72°C	35
<i>MMP7</i>	TTTGATGGGGCCAGGAAACAC GGGGATCTCCATTTCATAG	220	95°C	57°C	72°C	35
<i>ADAMTS1</i>	GGACAGGTGCAAGCTCATCTG TCTACAACCTTGGGCTGCAAA	72	95°C	59°C	72°C	40
<i>ADAMTS4</i>	CAAGGTCCCATGTGCAACGT 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>	TTGTGAGCTTCCGTGTTCCAG GTCTCCGTGCTTGTGGTGA	217	95°C	63°C	72°C	35
<i>hV0</i>	TGAACATCTCATGTTCCCTCCC TTCTTCACTGTGGGTATAGGTCTA	405	95°C	61°C	72°C	35
<i>hV1</i>	GGCTTTGACCAAGTGGGATTAC TTCTTCACTGTGGGTATAGGTCTA	336	95°C	61°C	72°C	35
<i>hV2</i>	TGAACATCTCATGTTCCCTCCC CCAGCCATAGTCACATGTCTC	498	95°C	61°C	72°C	35
<i>hV3</i>	GGCTTTGACCAAGTGGGATTAC 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 8.95×10^5 cells/mlで75 cm²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™ 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) TritonX-100 (非イオン性界面活性剤) 保存溶液 400 μ l, 2-メルカプトエタノール 100 μ l, バイオライト 5/7 (40%) 80 μ l, バイオライト 3/10 (40%) 20 μ 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と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) イムノプロット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

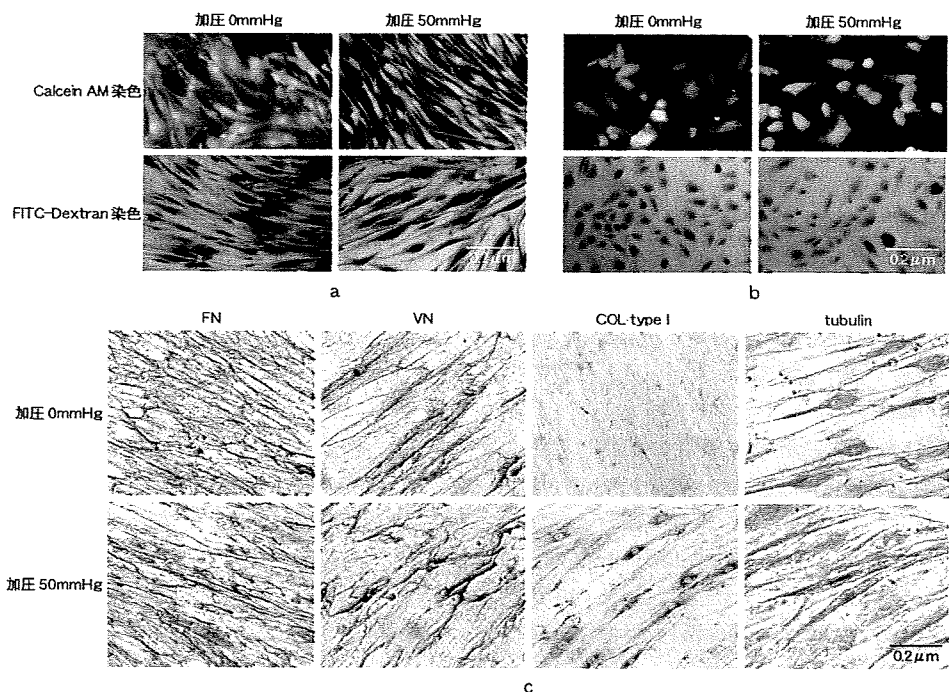


図2 線維芽細胞, 血管内皮細胞の生細胞染色と線維芽細胞の免疫組織化学による結果

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, *allFN*, 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MMP3タンパク質の変化

精製されたMMP3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, MMP3タンパク質が発現していた。MMP3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

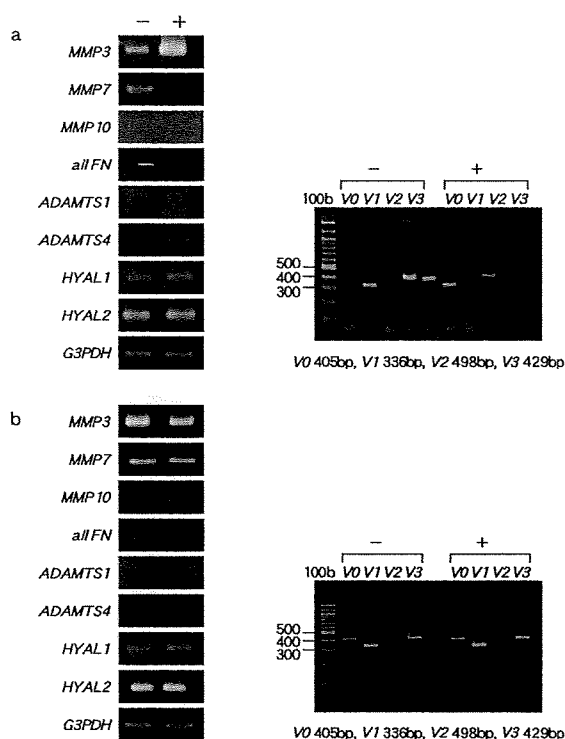


図3 加圧によるRT-PCRの結果

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ADAMTS1, 4, ヒアルロン酸分解酵素(HYAL)のHYAL1, 2, フィブロネクチンのall FN, パーシカンの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。

VI. 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

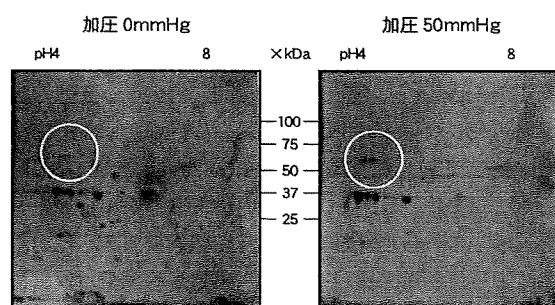


図4 2次元電気泳動によるMMP3の抗体反応

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

ては、実験群は加圧によって変化を起こしている。このことは圧力によってECMの構築変化を起こしていることを示している。今回使用したVNの抗体はN末端近傍に特異的に反応する抗体であり、N末端近傍にはヒアルロン酸結合ドメインが存在する(Wight et al., 2004)ことから、ヒアルロン酸の局在にも影響を及ぼしている可能性がある。細胞形態はECMの構造によって制御を受けている。細胞骨格タンパク質の1つであるtubulinの局在が、加圧により変化を示していることからECMの構造変化を引き起こしていることが推測される。

3. 加圧によるmRNAとタンパク質の変化について

MMPsは創傷治癒過程において発現し、ECMを分解し細胞間の接着を破壊することで線維芽細胞の移動が容易になる状態をつくり、再生を伴う再構築が行われるため、重要な因子であることは報告されている(Yatabe et al., 2004)。

MMP 3, 7, 10は基質にFNがあり、治癒過程ではMMP 3がFNのタンパク質構造を切断することでFNが再生され細胞移動の促進に関与する(Fray et al., 2003)。また、ヒトのVNの遺伝子は15のエキソンから構成され、選択的スプライシングの結果、VNはグリコサミノグリカン付加ドメインの長さの異なるV0, V1, V2およびグリコサミノグリカン付加ドメインをもたないV3の4つの異なる分子型をとり、組織により発現しているタイプは異なっていることは明らかにされている(Zako et al., 1995)。

今回、RT-PCRと2次元電気泳動法の結果より、加圧によってMMP 3はmRNAからタンパク質合成にいたるまでの過程で増加していることが明らかになった。また、FNが実験群において発現が減少しており、MMP 3は遺伝子、タンパク質ともに発現が認められることから、FNによるECM構築に何らかの影響を及ぼしていることは十分に考えられる。MMP 10は加圧30 mmHgの実験群で発現があり、50 mmHgでは発現していないことから、30 mmHgにおいてMMP 10の基質となり得るFNに影響を及ぼしている可能性があると考えられる。MMP 7は加圧することで発現が減少することは確認できたが、このこともFNの分布に影響を及ぼしている可能性は十分に考えられる。

ADAMTSはMMPsと類似のmetalloproteinase領域をもち、阻害タンパク質によって同様に阻害され

る。ADAMTS 1, 4はその基質の一つにVNがあり、ADAMTS 4はVNであるV1-V3のアイソフォームのG1ドメインに関与している報告がある(Porter et al., 2005)。ADAMTS 4とV0の関係性を示した報告はないが、実験群においてADAMTS 4とV0の発現が増加していたことは、V0フォームはグリコサミノグリカン糖鎖本数が多くなることから、タンパク質分解酵素に対して抵抗性を示すことが考えられる。また、増加するADAMTS 4が他のV1-V3のアイソフォームのG1ドメインを切断すると考えるなら、VNが関係しているECMの構造に影響を与える可能性も考えられる。また、ADAMTS 4はFNに影響を及ぼしているという報告もあることから(Hashimoto et al., 2004)、FNは加圧によってMMP 3以外にADAMTS 4の分解を受けていることも考えられる。ADAMTS 1は両者ともに発現していなかったことから、NHDFではほとんど発現していないと考えられる。

ヒアルロニダーゼの基質にHAがあり、HYAL 1は分泌型でHYAL 2は細胞膜上に存在する(井上ら, 2005)。加圧によって両者ともに発現はあったが、対照群、実験群ともに差を認めなかったことから、加圧によって影響を受けないと考えられる。つまり、加圧によってHAが分解されHA量が減少することはないと考えられる。しかし、VNのV0-V3のN末端領域にはHAが結合しており、V0において変化があるということは、HAに結合しているVNのグリコサミノグリカン鎖の数が増えていることであり、これは、ECMの容積に影響を与えると考えられる。また、MMP 3がHA合成に影響を及ぼしている報告もあることから(Ohno et al., 2005)、HYAL 1, 2に変化がなくても他の要因によってHAの構築が影響を受けることが考えられる。

以上から、50 mmHgの圧力が加わることによってECMの構築の破壊をきたし、細胞の形態に影響を与え皮膚の統合障害を引き起こすことが考えられる。また、30 mmHgでもMMP 10の発現の上昇を起こしていることから、30 mmHg前後の圧力や時間的な経過の変化などについても検討を行うことが必要である。

褥瘡は、圧力が2時間以上持続すると発生する可能性が高いこと(Kosiak, 1959)、約50 mmHgの圧力が加わると組織変化が起こると報告されており(七川ら, 2002)、褥瘡の予防および発生後の圧力解除に対する看護介入が重要とされている。また、体圧値測定用具

の開発がされ、体圧値は褥瘡発生部位で発生頻度が高い仙骨部に加わる圧力 40~50 mmHg が境界域であると報告がされている(須釜ら, 2000)。この測定用具を用いて境界域を超えていない値を確認し、体圧分散がなされているかどうか一つの指標としている。

本研究の結果から 50 mmHg で細胞形態の変化が認められ、ECM に影響を及ぼしていることから、50 mmHg 以上の圧力が加わることは組織全体を支持する機能へ影響を及ぼし皮膚の統合が維持できなくなる可能性が考えられる。よって、45~50 mmHg 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、先行研究の多くは血管閉塞を回避することを目的とした体圧分散方法であり、結合組織の中に存在する ECM への影響を考慮した検討がされていないことから、今後、結合組織を支える ECM を視野に入れ検討していく必要があることが示唆された。

本研究の限界として、ADAMTS 4 に関してはタンパク質レベルでの確認を行っていないため、mRNA からタンパク質合成の過程に変化があるのか確認する必要がある。加えて、加圧することで FN, VN, ECM 分解酵素の MMP 3, ADAMTS 4 がどのような影響を受け変化をしているのか、また、両者の相関関係について明らかにすることができなかった。さらに、MMPs の生理的な制御因子として TIMP (tissue inhibitor of MMP) が知られているが(Baker et al., 2002)、これについても、圧力による影響を受けていれば MMPs に影響を及ぼしている可能性も考えられることから、今後確認する必要がある。

Ⅶ. 結 論

加圧 50 mmHg により ECM の形態が変化をし、さらには、ECM 分解酵素の MMP 3, ADAMTS 4, 合成分の FN, VN が変化することが明らかになった。よって、50 mmHg 以上の圧力が加わることは、組織全体を支持する ECM へ影響を及ぼし、皮膚の統合が維持できなくなる可能性があることが明らかになった。また、加圧 30 mmHg で MMP10 の発現を認めたことから、今後は 30 mmHg 前後の加圧値についても検討し、圧力による ECM の変化についても視野に入れ、皮膚の統合に与える影響について検討していく必要があることが示唆された。

謝辞：研究においてご指導いただきました国立長寿医療セ

ンター先端医療部先端薬物療法科医長 磯貝善蔵先生に感謝します。なお、本研究の一部は平成 19 年~20 年度厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業, 研究主任 磯貝善蔵, 研究分担者 米田雅彦他)の助成を受けて実施したものであり、本研究は愛知県立看護大学大学院看護学研究科に提出した修士論文の一部に加筆, 修正を行ったものである。また、本研究の一部は第 26 回日本看護科学学会学術集会で発表を行っている。

文 献

- Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G. (2002) : Metalloproteinase inhibitors : Biological actions and therapeutic opportunities, *J. Cell Sci.*, 115(19), 3719-3727.
- Cattaruzza S., Schiappacassi M., Ljungberg-R.A., et al. (2002) : Distribution of PG-M/versican variants in human tissues and de novo expression of isoform V 3 upon endothelial cell activation, migration, and neoangiogenesis in vitro, *J. Biol. Chem.*, 277(49), 47626-47635.
- Fray M.J., Dickinson P. R., Huggins P.J., et al. (2003) : A potent, selective inhibitor of matrix metalloproteinase-3 for the topical treatment of chronic dermal ulcers, *J. Med. Chem.*, 46(16), 3514-3525.
- Guyton A.C. (1963) : A concept of negative interstitial pressure based on pressures in implanted perforated capsules, *Circ. Res.*, 12, 399-414.
- Hashimoto G., Shimoda M., Okada Y. (2004) : ADAMTS 4(Aggreganase-1) interaction with the C-terminal domain of fibronectin inhibits proteolysis of aggrecan, *J. Biol. Chem.*, 279(31), 32483-32491.
- 井上紳太郎, 佐用哲也(2005) : ヒアルロン酸のターンオーバーと疾患, *生化学*, 77(9), 1152-1164.
- Hasegawa K., Yoneda M., Kuwabara H., et al. (2007) : Versican, a major hyaluronan-binding component in the dermis, loses its hyaluronan-binding ability in solar elastosis. *J. Invest. Dermatol.*, 127, 1657-1663.
- Jones E.L., Humphreys J.M., Campbell F., et al. (2004) : Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer : increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival, *Clin. Cancer Res.*, 10, 2832-2845.
- Khan A.Z., Cukiernik M., Gonder J.R., et al. (2004) : Oncofetal fibronectin in diabetic retinopathy, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 45(1), 287-295.
- Kosiak M. (1959) : Etiology and pathology of ischemic ulcers, *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 40, 62-69.
- Landis M. E. (1930) : Micro-injection studies of capillary blood pressure in human skin, *Heart*, 15, 209-228.
- Li D.Q., Shang T.Y., Kim H.S., et al. (2003) : Regulated expression of collagenases MMP-1, -8, and -13 and stromelysins MMP-3, -10, and -11 by human corneal epithelial cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44(7),

- 2928-2936.
- 七川正一, 森將晏, 掛橋千賀子(2002): マウスを用いた褥瘡初期病変の組織学的検討—圧力の差による傷害の深さと質的变化について—, 日本看護研究学会雑誌, 25(5), 27-34.
- 入来正躬, 島田馨, 嶋田裕之, 他2名(1977): 褥瘡の実験動物モデル—脊椎家兎でのバルーン加圧方式による褥瘡—, 日本老年医学会雑誌, 14(6), 501-508.
- Ohno S., Ohno-Nakahara M., Knudson C. B. (2005): Induction of MMP-3 by hyaluronan oligosaccharides in temporomandibular joint chondrocytes, *J. Dent. Res.*, 84(11), 1005-1009.
- Paiva P., Van D. M. P., Tellbach M., et al. (2005): Expression patterns of hyaluronan, hyaluronan synthases and hyaluronidases indicate a role for hyaluronan in the progression of endometrial cancer, *Gynecol. Oncol.*, 98, 193-202.
- Porter S., Scott D.S., Sassoon M.E., et al. (2004): Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma, *Clin. Cancer Res.*, 10, 2429-2440.
- Porter S., Crark L.M., Kevorkian L., et al. (2005): The ADAMTS metalloproteinases, *Biochem. J.*, 386, 15-27.
- Ressler B., Lee T.R., Randell H.S., et al. (2000): Molecular responses of rat tracheal epithelial cells to transmembrane pressure, *Am. J. Physiol. Lung Cellular Mol. Physiol.*, 278, L1264-L1272.
- Sandy D.J., Westling J., Kenagy D.R., et al. (2001): Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu 441-Ala 442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4, *J. Biol. Chem.*, 276(16), 13372-13378.
- 須釜淳子, 真田弘美, 中野直美, 他4名(2000): 褥瘡看護ケアにおけるマルチパッド型簡易体圧測定器の信頼性と妥当性の検討, 日本褥瘡学会誌, 2(3), 310-315.
- 武田利明, 石田陽子(2000): 栄養不足ウサギを用いた褥瘡の実験的研究—圧迫による皮膚虚血状態と褥瘡発生について—, 日本褥瘡学会誌, 2(1), 51-56.
- 武田利明(2002): 褥瘡発生と加圧部皮膚温変化に関するウサギを用いた実験的研究, 日本看護技術学会誌, 1(1), 45-50.
- 塚田貴子, 吉田彩子, 徳永恵子, 他3名(2002): 仰臥位と30度側臥位における体接触圧の検討, 宮城大学看護学部紀要, 5(1), 102-107.
- Tschumperlin J.D., Dai G., Maly V.L., et al. (2004): Mechanotransduction through growth-factor shedding into the extracellular space. *Nature*, 429(6), 83-86.
- Wight N.T., Merrilees J.M. (2004): Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis key roles for versican, *Circ. Res.*, 94, 1158-1167.
- Yatabe T., Okada Y. (2004): MMP and ADAM in rheumatoid arthritis, *Connective Tissue*, 1(36), 223-231.
- 横山朱美, 伊藤亜紀, 木村愛子, 他3名(2001): 体型別における体圧分散寝具の圧分散効果の比較検討, 第32回日本看護学会論文集(成人看護II), 121-123.
- Zako M., Shinomura T., Ujita M., et al. (1995): Expression of PG-M(V3), an alternatively spliced form of PG-M without a chondroitin sulfate attachment region in mouse and human tissues, *J. Biol. Chem.*, 270(8), 3914-3918.

原 著

褥瘡創面における 細胞外マトリックス分解産物の解析

Analysis of Specific Distribution of ECM Degraded-Product in Wound Surface of Pressure Ulcer

松本尚子¹⁾, 大島弓子²⁾, 米田雅彦³⁾

Hisako Matsumoto, Yumiko Oshima, Masahiko Yoneda

キーワード：細胞外マトリックス, 褥瘡, MMP 3

Key words : ECM, pressure ulcer, MMP 3

Abstract

The aim of this study was to investigate the relationship between the molecular structure of the extracellular matrix (ECM) and the wound surface of pressure ulcers. Protein samples of excreted tissue fluid attached to the gauze surface of gauze from eight patients were extracted and subjected to examine for the presence of ECM-related molecules by utilizing specific antibody and ELISA to measure the enzymatic level of MMP 3. It was revealed that i) western blot profiles differed from one another depending on the surface condition of the pressure ulcer ; ii) a distinct immuno-staining profile was observed even in samples isolated from the same pressure ulcer ; and iii) the MMP 3 expression level also differed among protein samples. These results suggest that the molecular construction of the ECM around the wound surface of a pressure ulcer might differ from patient to patient. Therefore, it is important that nurses consider the nursing intervention based on the surface condition of pressure ulcers. In addition, MMP 3-involvement in pressure ulcers is also suggested this enzyme has been detected in protein samples from the wound surface of pressure ulcers.

要 旨

本研究の目的は、褥瘡創面の細胞外マトリックス(以下 ECM とする)分子の構築状態と、褥瘡創面の関連性を明らかにすることである。褥瘡と診断された8名に使用していたガーゼに付着した滲出液から抽出したタンパク質を対象とし、抗体を用いて ECM 構築分子の存在について検索し、酵素交代測定法(ELISA)により MMP 3 の発現量を測定した。その結果、i)褥瘡創面の状態によって抗体反応のパターンが異なること、ii)一つの褥瘡創面でも部位により抗体反応が異なる、iii)MMP 3 の発現量が対象によって異なることが明らかになった。このことから、対象によって褥瘡創面の ECM 分子の構築状態が異なることが考えられ、褥瘡創面の状態に応じた看護介入を考慮することが重要である。また、褥瘡創面から MMP 3 が検出されたことから、MMP 3 が褥瘡に何らかの関連性があることが示唆された。

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

I. はじめに

創傷治癒過程は血小板凝集を基盤とした止血機序から始まり、好中球、マクロファージなどの炎症細胞による炎症反応が起こる。次に、細胞が増殖・移動しやすいように細胞外マトリックス(extra cellular matrix, 以下 ECM とする)が産生亢進、蓄積され再構築が始まる。新しい ECM の重合と架橋とともに損傷線維の分解処理も行われ、組織の構造上の整備とともに修復に向かう。この一連の過程の中で ECM は重要な役割をしている(Martin, 1997; 田澤, 2003)。

ECM は、基底膜をはじめ皮膚組織の中の結合組織や骨に存在し、細胞の周囲に形成される生体高分子の複雑な集合体であり、線維性タンパク質、糖タンパク質、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどからなる。代表的なものとして、フィブロネクチン (fibronectin, 以下 FN とする)、コラーゲン、ヒアルロン酸結合型プロテオグリカンのパーシカン、ヒアルロン酸結合タンパク質の inter- α -trypsin inhibitor (以下 ITI とする)がある。FN には血漿中に含まれる血漿性 FN があり、血清成分である ITI の長鎖はヒアルロン酸(以下 HA とする)と共有結合し、SHAP-HA (serum derived hyaluronan associated protein-hyaluronan)複合体を形成する(Yoneda et al., 2000)。パーシカンは比較的広範な組織分布を示す大型のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンで、コアタンパク質の N 末端領域で HA 結合能をもつ。HA を筆頭にして、これらの分子は細胞の形態維持に重要な役割をもち、損傷した場合には細胞同士と ECM の相互作用(レセプターを介しての細胞接着など)、細胞外液の水分調節、組織の形態形成や修復の段階での細胞移動の促進に関与している。また、ECM の損傷線維の分解処理を担う酵素としてマトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloprotease, 以下 MMP とする)が知られている。現在までに数多くの酵素遺伝子が確認されているが、これら複数の MMP 酵素が協同して ECM の分解を行い組織の新生が行われると考えられている(Martin, 1997)。

褥瘡の場合、基本的な創傷治癒過程の段階を経ずに治癒が遅延し慢性化していることがあり、治癒過程がどの段階で遅延しているのか明確にすることは難しい状況である。先行研究では、動物に潰瘍を形成し損傷を受けた皮膚組織と創傷治癒過程の関係について検討しているもの(Tominaga et al., 2001)や皮膚疾患患

者の皮膚組織を用いて FN が創傷治癒に関係していることについて検討されている(Panfilis et al., 2000)。これらの潰瘍は急性潰瘍であり、慢性潰瘍の一つである褥瘡の創傷治癒過程に視点を置き ECM の構築状況を明らかにしたものは少ない。さらに、慢性皮膚潰瘍においては ECM の分解酵素である MMP が治癒遅延を引き起こしている可能性の言及や(Laudyig et al., 2002)、MMPs の一つである MMP 3 が過度に発現していると治癒過程に影響を及ぼす(Fray et al., 2003)と報告されている。これらの報告から MMP 3 は、褥瘡の創傷治癒過程において必要であるが、MMP 3 が過度に分泌されると治癒過程に支障をきたし、その結果として褥瘡創面の状態に影響を及ぼしていることが考えられる。しかし、褥瘡創面に MMP 3 が分泌していることを明らかに示したものは見当たらなかった。褥瘡創面の ECM 構成成分と MMP 3 の発現が、創傷治癒過程の状態や褥瘡創面の状態に関係していることが明らかになれば、看護師が褥瘡創面をアセスメントする際、褥瘡創面から MMP 3 が過剰な状態か、褥瘡の治癒過程に支障をきたすような状態になるかを推測することができるのではないかと考えた。

そこで今回、褥瘡創面の滲出液中に含まれる ECM 構成成分について質的に分析を行い、加えて、MMP 3 濃度を測定し褥瘡との関連性を明らかにすることとした。

II. 研究の目的

褥瘡創面の滲出液に含まれる ECM 構成成分である糖タンパク質やプロテオグリカンの分解を含めた変化を分析することにより、褥瘡と ECM が関連しているか明らかにする。また、ECM 分解酵素である MMP 3 が褥瘡創面に分泌されることで ECM の構成成分に影響を与え、それが褥瘡創面の状態に関連しているかについて検討する。

III. 研究方法

1. 材料

本研究の目的を伝え、選択の自由意思、決定を保証し、同意の得られた褥瘡と診断された 8 名に使用されていたガーゼに付着した滲出液である。ガーゼは褥瘡の創面の処置を行った後、外用剤を塗布しガーゼで覆い約 24 時間貼付されたものを回収した。使用された