

外用剤はゲーベックリーム(一般名:スルファジアジン銀, 田辺三菱製薬社), ユーバスタコワ軟膏(一般名:精製白糖, ポビドンヨード, 興和社)であり, タンパク分解酵素剤は含まれていなかった。褥瘡創面の状態を表すツールとして信頼性が検証されている日本褥瘡学会が策定した DESIGN を用いた(松井ら, 2005; 真田ら, 2002; 日本褥瘡学会, 2005)。DESIGN は, deeps(深さ), exudate(滲出液), size(大きさ), inflammation / infection(炎症/感染), granulation tissue(肉芽組織), necrotic tissue(壊死組織)の各項目の頭文字を組み合わせたものである。褥瘡にポケット(pocket)が存在する場合はPと記入する。褥瘡が軽度の場合はアルファベットの小文字を重度の場合は大文字で表し, 創面の評価は各6項目を細分化し点数化することができる。点数の内容は, 重症なものほど点数が高く, 最高得点は28点であり, 治癒の状態で0点となる。また, 褥瘡の創縁部と創表面の状態について皮膚科専門医の助言を受け, 評価を行った。対象者8名は1~8のコード番号とした。

2. 実験方法

1) ガーゼからのタンパク質の抽出①

ガーゼからの抽出液の上清を試料として用いる方法について確立されておらず, 試料として使用可能であるか確認する必要があったため, 調査開始時期に回収を行った対象者1, 2, 3, 4のガーゼの分析を行うこととした。方法は, 褥瘡創面の滲出液が付着したガーゼ中央部分を1cm四方にカットし, 滅菌したスピッツに入れ, リン酸緩衝塩溶液(140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 以下PBSとする)を5ml注ぎ, タンパク質の分解を防ぐためにプロテアーゼインヒビターカクテル(Sigma社)を加え混ぜ合わせ4°Cで一晩放置した(約17時間~18時間)。PBS中のガーゼを取り出し, タンパク質が抽出された溶液を12,000 rpm, 4°C, 20分間遠心機にかけ上清と沈殿物に分離し上清を回収した。

2) タンパク質の定量

回収された上清にタンパク質が抽出されているか確認するためにタンパク質の定量を行った。方法は, micro BCA™ protein assay reagent kit(Pierce社)を用いて行い, 分光光度計(型番S1000, Spectrawave WAP社)を用いて波長562 nmにおける吸光度から, タンパク量を算出した。

3) ウェスタンブロット法を用いたタンパク質の分析

ウェスタンブロットとは, SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ポリアクリルアミドゲル電気泳動)とイムノブロットの分析方法を用いてタンパク質を検出する方法である。SDS-PAGEとは, アクリルアミドの重合体であるポリアクリルアミドのゲルを使用した電気泳動により, タンパク質を分子量の大きさによって分離することができる。イムノブロットは, SDS-PAGE後のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し, 目的としているタンパク質の抗体を用いてニトロセルロース膜上で免疫学的に検出することができる。これらの方法を用いることで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視覚化し確認することができる。

ガーゼから回収された上清に含まれるタンパク質を還元剤(DTT)でタンパク質S-S結合(ジスルフィド結合)を切断する処理をし, 7.5%のアクリルアミドゲル(レディースゲルJ: Bio-Rad社)を用いてSDS-PAGEを行いタンパク質を分離した。また, SHAP-HAを検出する目的で, ストレプトマイセス・ヒアルロニダーゼ(以下HAaseとする)処理を行った。上清に緩衝液(0.1 M acetate buffer, PH 5.0)とHAase 0.2 TRU(生化学工業株式会社)を加え60°C, 90分インキュベートした。HAは分子量100万~200万の巨大分子のため, ポリアクリルアミドゲル中を移動することができない。HAaseでHAを分解することで初めてHAに共有結合していたSHAP(ITIの長鎖)またはその分解物がゲル中を移動することができる。

泳動条件はゲル1枚に対し電流20 mA, 約60分とした。電気泳動終了後, ゲル中に分離されたタンパク質を転写するために, 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)に電圧8 V, 4°Cで約16時間転写した。その後, イムノブロットを行った。転写後のニトロセルロース膜は, 抗体の非特異的吸着を防ぐため転写されていない部分をブロックすることが必要であるため, 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, 目的とするタンパク質に対する一次抗体を希釈した溶液にニトロセルロース膜を浸し, 室温で1時間振とうした。余分な抗体を除去するためPBS-0.1%, Tween-20(界面活性剤)(以下PBS-

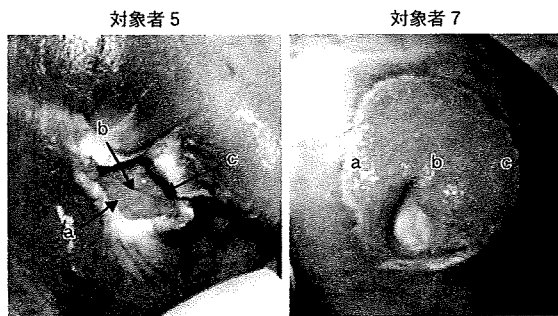


図1 褥瘡創面と創面部位の一例

対象者5, 7の褥瘡創面の画像と画像内に示すa, b, cは9分割したガーゼを選択した場所を表わしている。

Tween とする)で1時間洗浄後、希釈した二次抗体に浸し、遮光して1時間振とうした。結合しなかった抗体を除去するためPBS-Tweenで1時間洗浄後、化学発光試薬(Western Lightnin™ Chemiluminescence Reagent Plus: PerkinElmer社)とX線フィルム(Hyperfilm ECL: Amersham Biosciences社)で抗体の結合したタンパク質を検出した。ガーゼから回収した試料にどのようなECMに関係する分子が存在しているのかを明らかにするため、血清成分、リンパ球表面抗原、細胞、結合組織、基底膜のそれぞれに存在する分子に対する抗体を用いて調べた(表2)。

4) ガーゼからのタンパク質の抽出②

対象者1, 2, 3, 4のウェスタンブロット法の結果より対象者によって検出されたECMの量や構成が異なること、対象者の創部の部位によっても違いがあるかもしれないこと、上清だけでは検出できないタンパク質が存在するかもしれないことが考えられた。そこで、一つの創部の部位の違いをみる目的で採取したガーゼを分割し分析することとした。褥瘡創部とガーゼの状態から、ガーゼを1cm四方の大きさにカットし分析するために、対象者5, 7を9分割、6を4分割、8を2分割した。また、対象者5, 7の9分割したガーゼの中から3カ所(a, b, c)を選択した。(a)は褥瘡の左創縁部、(b)は中央部、(c)は右創縁部である(図1)。対象者6の4分割したガーゼは(a)右創縁部、(b)右側中央部、(c)左側中央部、(d)左創縁部である。8の2分割したガーゼは(a)右創縁部、(b)左創縁部である。対象者5, 7の(a), (c)を選択した理由は次のことによる。治癒過程では創縁部から肉芽形成が始まり創縁部の状態(細胞が増殖しやすい状態)が整備されていないと創部の修復に時間を要する可能性が

考えられる。よって、一つの褥瘡創面において創縁部の部位による肉芽形成の状態に違いがあり、それがECMの分解程度や状態の違いとして表れていると考慮して選択した。

ガーゼをPBSに浸しタンパク質の分解を防ぐためにプロテアーゼインヒビターカクテル(Sigma社)を加え混ぜ合わせた後4°Cで一晩放置した(約17時間~18時間)。取り出したガーゼをフィルター付カラム(Ultrafree-CL Filters: Millipore社)に入れ、軽く遠心した後、下層に溜まった液を回収した。回収した液を12,000 rpm, 4°C, 20分間遠心し上清と沈殿物に分離し、沈殿物は10 mM DTTで溶解した。その後、III. 2. 3)で示した方法と同様に分析を行った。

予備実験の段階で表2に示した抗体で分析した結果、上清からFN, ITIが検出され、沈殿物からはパーシカン(6084)が検出された。よって、対象者5, 7はFN, ITI, パーシカン(6084)の3種類の分子に絞りこみ、FN, ITIの検出時には上清を用い、パーシカン(6084)の検出時には沈殿物を使用し、それぞれの特異抗体で確認した。抗体の希釈倍率は、1/2,000 anti-FN, 1/2,000 anti-ITI, 1/1,000 anti-パーシカンとした。また、対象者6, 8は回収された試料が少なかつたためFNに対する抗体のみの確認とし、抗体の希釈倍率は1/2,000とした。

なお、結果の見方は、目的とするECMの分子量と実際に抗体で検出されたタンパク質の分子量を比較し、両者が一致している場合には目的とするECMであると判断できる。また、分子量が小さくなり低分子化している場合は分解を起している可能性があるかと予測することができる。転写されたタンパク質の分子量の大きさを確認するためには、タンパク質分子量マーカー(マーカー)を用いる。kDaは分子量を示す単位である。今回検出したFN, ITI, パーシカンの分子量はそれぞれ約220 kDa, 約230 kDa, 約500 kDaである。分子量50~25 kDaに抗体反応を示しているのは分解産物となって検出されたものである。

褥瘡の状態とウェスタンブロット法の結果については、皮膚科専門医の助言を受けた。

5) 酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)

微量しか存在しないタンパク質やペプチドを検索する目的で物質を定量する方法として酵素免疫測定法がある。この方法を用いて、回収された上清のタンパク

表1 対象者の属性

対象者	年齢(歳)	性別	部位	DESIGN							合計点
				D	E	S	I	G	N	P	
1	80代	女	踵骨部	□4	e2	s2	l2	G4	N1	—	15
2	60代	男	下腿部	□3	e1	s2	l1	g1	n0	—	8
3	70代	男	下腿部	□3	e2	s2	l2	g1	n0	—	10
4	70代	男	下腿部	d2	e1	s1	l0	g0	n0	—	4
5	80代	女	仙骨部	□3	e2	s3	l1	G3	n0	1	13
6	80代	女	背部	□3	e2	s3	l0	G3	n0	—	11
7	80代	女	大転子部	□4	e2	s5	l1	g2	n0	—	14
8	80代	男	踵骨部	□3	e1	s2	l1	G3	N2	—	12

質中に含まれる MMP3 を定量した。MMP3 を選択した理由として、一つ目は、線維芽細胞を培養し加圧を行った実験(Matsumoto et al., 2006)で MMP3 の上昇が確認されたこと、二つ目は、慢性潰瘍の治癒過程の遅延に MMP3 が関与していると報告されているため(Saarialho-Kere et al., 1998 ; Fray et al., 2003)、三つ目は、FN と MMP3 は皮膚潰瘍の治癒過程において重要な働きをしているとの報告があり(Okada et al., 1986)、ウェスタンブロット法の結果から FN のタンパク質の反応パターンに違いがあるため、MMP3 との関連性があるのかどうか明らかにしたいことが挙げられる。

使用試薬キットは Human MMP-3(total) Quantikine (R&Dsystems 社)を用い、方法はキットのプロトコルに従った。マイクロプレートリーダー(モデル 680 装置: Bio-Rad 社)にプレートをセットし 450 nm における吸光度から MMP3 量を求めた。さらに、タンパク定量法から得られたタンパク質量(PBS 1 ml 中に含まれるタンパク質量)で MMP3 量を割り、総タンパク質における MMP3 の割り合いを求めた。使用した試料は、対象者 1, 2, 3, 4, 5, 7 は創部の中央部分、6, 8 は創部の中央部分を含むガーゼの箇所を選択し使用した。

IV. 倫理上の手続き

倫理的な配慮として、対象者に対し研究の目的と方法について説明を行い、ガーゼ、創部の画像においてはコード化した情報ももらい、一切検体と対象者と連結しないことを明確にし同意を得た。また、愛知県立看護大学研究倫理審査委員会および協力の得られた医療機関の倫理審査委員会からの承認を得た。

V. 結 果

1. 対象者の属性と褥瘡創面の状態

分析の対象者は褥瘡と診断された 8 名(男性 4 名、女性 4 名)であった。対象者の基本的な背景と DESIGN については表 1 に示すとおりであった。褥瘡創面の状態は、対象者 1 は創縁部周囲が白～赤色様であり創表面全体に黄色で膜状のものが認められた。対象者 2 は創縁部が発赤しており、創表面の一部に黄色で膜状のものが認められた。対象者 3 は創縁部が発赤しており、創表面の一部に黄色で膜状のものが認められた。対象者 4 は炎症所見はなく、肉芽組織は上皮化が認められた。対象者 5 は創縁部周囲が浸軟しており漏出した状態であった。創表面の一部に黄白色で膜状のものが認められ、創表面は凸凹しており、創縁部と創面は深さが異なっていた。対象者 6 は炎症所見はなく、創縁部周囲は浸軟していた。対象者 7 は創表面の一部に黄白色で膜状のものが認められ、創縁部と創面は深さに差異はなかった。対象者 8 は創面の乾燥が認められ、創縁部周囲は浸軟しており漏出した状態であった。

2. ウェスタンブロット法によるタンパク質の分析

今回使用した抗体が認識する抗原の分解前の分子量は、FN が約 220 kDa、ITI が約 230 kDa、パーシカンは約 500 kDa である。分子量 50～25 kDa に抗体反応を示しているのは分解産物となって検出されたものである。抗体が反応している箇所は矢印で示した。また、ITI の反応については、SHAP-HA 複合体由来のバンドは矢印で示し、ITI の由来の分解物のバンドは矢印で示した。矢印以外のバンドは二次抗体による非特異的結合反応であった。

対象者 1～4 に使用されていたガーゼから抽出され

表2 使用した抗体名

局在	抗体名	抗原名	免疫動物	会社名
poly	血清	815051 Fibronectin	rabbit	LSL
poly	血清	031229C Fiburinogen	rabbit	HYPHEN Biomed
poly	血清	O 85 ITI (Inter- α -Trypsin Inhibitor)	rabbit	DAKO
poly	血清	HUTI (ビクニン)	rabbit	Zhuo et al., 2001
poly	血清	230708-1 Peroxodise	goat	EY
poly	血清	24021953 Vitronectin	rabbit	Biogenesis
mono	リンパ	sc-17892 CD 68	mouse	SANTA CRUZ
poly	細胞	25031701 Fractin	rabbit	CHEMICON
mono	細胞	CPP 32 Caspase-3	mouse	BD
poly	結合	6084 Versican N-terminal domain	rabbit	Hasegawa et al., 2007
poly	結合	7390 Versican C-terminal domain	rabbit	Ohno et al., 2008
poly	結合	5670 LTBP-1	rabbit	自家製
poly	結合	7670 fibrillin	rabbit	自家製
mono	結合	2-B-1 Versican	mouse	生化学工業
mono	結合	388 LTBP-1	mouse	R&D
mono	結合	BA-4 Erastin	mouse	SIGMA
mono	結合	26 fibrillin-1	mouse	Lynn Sakai
poly	結合	ab 292 Collagen Type I	rabbit	abCam
mono	基底	6-B-6 Decorin	rabbit	生化学工業
mono	基底	ab 17848 Perlecan	rat	abCam
mono	基底	LAM-89 Laminin	mouse	SIGMA
poly	基底	ab 6586 Collagen Type IV	rabbit	abCam

ガーゼに付着した滲出液からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE の分析にかけた後イムノブロットを行い、抽出されたタンパク質にどのような ECM 関連分子が含まれているか、また、その存在有無の確認を行うために使用した抗体名を示す。局在は検出されるタンパクの存在部位である。mono: monoclonal antibody, poly: polyclonal antibody

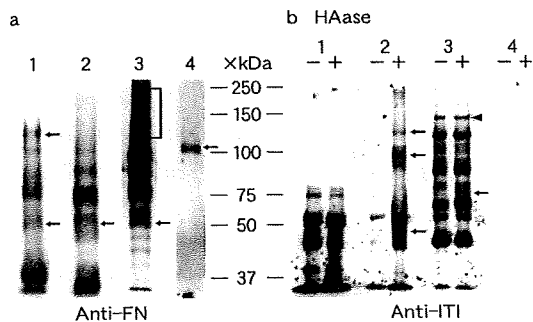


図2 褥瘡創面の抗体反応結果

抗 ITI (インター- α -トリプシンインヒビター) 抗体は、HAase 処理をしないもの(-)と HAase 処理したもの(+)を使用し比較を行った。抗体反応の箇所には矢印(←)で示した。なお、b の SHAP-HA 複合体由来のバンドは矢印(←)、ITI 由来の分解物バンドは矢頭(▶)で示した。

たタンパク質を表2に示した抗体で染色した結果、それぞれの褥瘡に応じて検出された ECM のパターンが異なることが確認できた。

FN は1, 2, 3, 4ともにそれぞれ検出された ECM のパターンが異なることが明らかになった(図2-a)。

なかでも、3は75~250 kDaにかけて強く検出され、4は100 kDaに検出された。ITIは図2-bのレーン2, 3の HAase 処理したものにそれぞれ95と50 kDa, 75 kDaの新たなバンドが検出されたが、これらは SHAP およびその分解物であった。2の HAase 処理したレーンの130 kDaのバンドについては、2本の SHAP またはその分解物が未消化 HA でつながったものと考えられるが定かではない。また、3の HAase 処理したレーンの150 kDaのバンドは ITI 由来の分解物であった。パーシカンにおいては検出されなかった。

次に、褥瘡創面の部位別で分析した結果について述べる。FN は、6の(a), (b), (c), (d)は150~200, 50 kDaに検出され、8の(a), (b)は150~250, 50~約25 kDaに検出された(図3-A)。5の(a), (b), (c)はともに150~250 kDaに検出されたが、(a), (c)に比べて(b)は強く検出され、7の(a), (b), (c)はともに50, 25 kDaに強く検出された(図3-B)。パーシカンは、5の(a), (c)で約70 kDaに検出され、

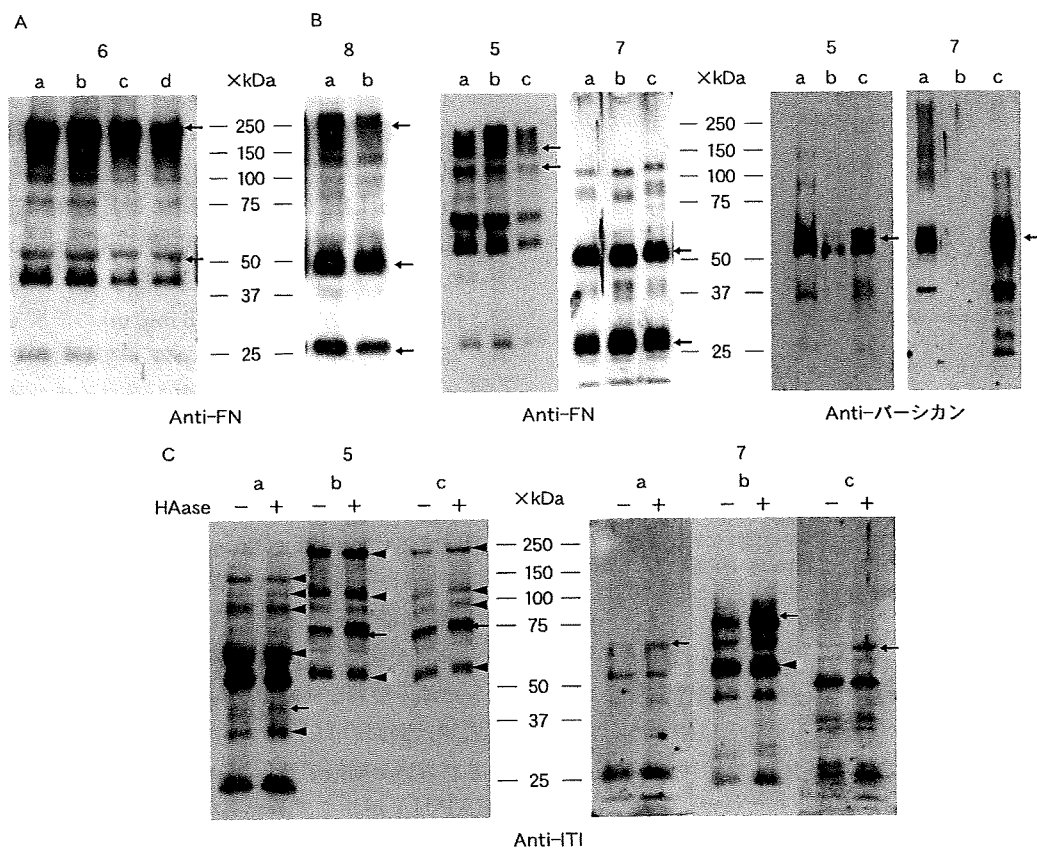


図3 褥瘡創面の各部位の抗体反応結果

対象者5, 7のガーゼを9分割, 6のガーゼを4分割, 8を2分割し図2で説明した同様の方法で試料を回収し SDS-PAGE を行った。a, b, c は9分割したガーゼの3カ所を選択した場所を表わし図1で示している。a: 右創縁部, b: 創部中央部, c: 左創縁部にあたる。

A: 対象者6, 8は上清を使用し SDS-PAGE を行った。

B: 対象者5, 7では, 抗 FN 抗体には上清を, 抗パーシカン抗体には沈殿物を使用し SDS-PAGE を行った。

C: 対象者5, 7は上清を使用し SDS-PAGE を行った。抗 ITI (インター- α -トリプシンインヒビター) 抗体は, HAase 処理をしないもの (-) と HAase 処理したもの (+) を使用し比較を行った。SHAP-HA 複合体由来のバンドは矢印(+)、ITI 由来の分解物バンドは矢頭(\blacktriangle)で示した。それ以外のバンドは, 二次抗体による非特異反応であった。

(b)には検出されなかった。7は(a), (c)に75 kDa に検出され, (b)には検出されなかった。つまり, パーシカンは, 褥瘡創面の中央部には検出されず, 創縁部において検出された(図3-B)。抗 ITI 抗体を用いた結果では, 5(a)の HAase 処理したレーンに約40 kDa の SHAP の分解物が検出され, (b), (c)の HAase 処理したレーンでは約75 kDa の矢印で示している箇所が HAase 処理しないものと比べると濃く発色されていることから, SHAP 由来のバンドが新たに出てくること確認できた。5(b), (c)の250 kDa のバンドは ITI であり, その他, 矢頭で示している箇所は ITI 由来の分解物であった。7(a), (c)の約70 kDa のバンドは HAase 処理で検出されたことから SHAP の分解物であることが確認できた。7(b)

では, HAase 処理により75 kDa の上に新たなバンドが重複することで濃く発色していることから, HA から遊離された SHAP の存在が明らかとなった。7(b)HAase 処理したレーンの約50 kDa は ITI 由来の分解物であった(図3-C)。つまり, 5は創面の各部位から, 7は創部縁部に SHAP の存在が認められた。

以上のことから, 1つの褥瘡創面でも部位によって, すなわち創部の中央部と創縁部で滲出液中の ECM の量や組成には違いがあることが明らかになった。

3. ELISA によるタンパク質中の MMP 3 濃度の分析

8名の分析を行ったが, うち1名は量的に少なく検出できなかったため, 7名分の結果を示すこととした。

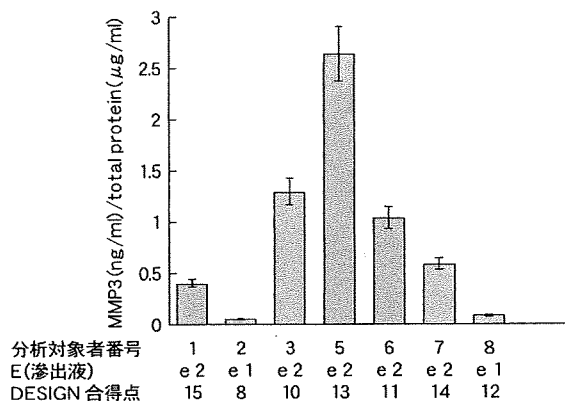


図4 酵素免疫測定法(ELISA)によるMMP3濃度の結果

ガーゼから得られたタンパク質を Human MMP-3(total) Quantikine [R&Dsystems] を使用し免疫反応を行った。その後、マイクロプレートリーダーモデル 680 装置[Bio-Rad] 450 nm で吸光度を測定した。測定後、総タンパク質量中に存在する MMP3 濃度を縦軸にしてグラフに示した。横軸は分析対象となったコード番号、DESIGN の E(滲出液量)の点数、DESIGN の合計点を示す。

MMP3 量は図4に示すとおりであった。共通性として、2, 8のように滲出液が少ないものは MMP3 の量が少なく、1, 3, 5, 6, 7 の DESIGN で示す e レベルが2点以上に MMP3 が多く含まれていた。

VI. 考 察

本研究では、褥瘡創面に使用されたガーゼに付着した滲出液を分析することにより、褥瘡創面から遊離した ECM の種類やその分解の状態(パターン)を視覚的に確認することができた。また、ECM の分解酵素である MMP3 は DESIGN で示す e レベルが2点以上で含有量が多い傾向にあった。さらに、褥瘡創面の ECM の構築状況が対象によって違うこと、1つの褥瘡創面においても部位によって ECM の構築状態に違いがあることが推察された。

1. 褥瘡創面における ECM について

対象者1~4に使用されていたガーゼのウェスタンプロット法の分析結果では、FNのパターンが異なることが認められた。1, 2はFNの分解が進んでおり、3は分解がそれほど進行しておらず、4はFNの断片が100 kDaのバンドのみと分解が抑制され、さらに滲出液中に約220 kDaの分解前のFNが検出されていない。DESIGNのGスコアの点数は1はG4点、2, 3はg1点で深さが皮下組織および皮下組織

を越えるものであったが、4はg0点で深さが真皮の層で滲出液は少量のみであり、上皮化しつつある状態であった。創傷治癒過程の上皮化時期においてFNが組織に蓄積して、線維を構築するという報告(Herrick et al., 1992, 1996)がある。4は創部の状況から合成された220 kDaのFNは組織にとどまり線維化の中で部分的に分解されたものが滲出液中に出てきたことから、治癒過程の時期であったと考えられる。ITIは、血清成分であり、0.4~0.5 mg/mlの濃度で含まれ、75~95 kDaの2本のポリペプチド(長鎖)と、30 kDaのコアタンパク質をもつコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(ピクニン)からなる分子量約230 kDaの分子である。HAと血清中に存在する因子により2本の長鎖がHAと共有結合して、SHAP-HA複合体を形成する(Yoneda et al., 2000; Yoneda, 2001)。炎症時には、組織でのHAの合成と血清からITIおよび因子が供給されSHAP-HA複合体が形成される。SHAP-HA複合体は、HAを線維性の形態へと促しリンパ球の接着を助ける(Motte et al., 2003)。さらに、白血球は表面のHAレセプターCD44を介して活性化され炎症を増幅する(Zhuo et al., 2006)。また、SHAP-HAがリウマチ患者の関節液中などに存在しているとの報告がある(Zhuo et al., 2004)。つまり、SHAP-HAの存在から炎症反応が起こっていると推測することができる。

2, 3の褥瘡にはHAase処理したレーンに抗ITI抗体反応で新たに検出されたバンドがあることから、高分子HAの分解で遊離されたITIの長鎖、すなわちSHAP-HA複合体のSHAPおよびその分解物が存在していることとなる。Eスコアの点数は、2はe1点、3はe2点と異なるが、両者ともに創縁部周囲には発赤があり、創部表面の一部に黄色で膜状のものがバイオフィーム(Clark et al., 2007)であるとするならば、2, 3の褥瘡は一部に炎症をもっている。パーシカンは、1~4にはっきりとした検出が認められなかった。これは、パーシカンが結合組織に存在したままで組織から遊離していなかったか、方法であるガーゼからのタンパク質の抽出①の抽出条件では、パーシカンはガーゼに付着したままで検出できなかったと考えられる。

5~8に使用されていたガーゼの分析結果からは、同じ褥瘡創面でも創部の部位によってECMの分解パターンが量的な違いも含めて違うことが明らかとなった。5, 6はFNの分解はそれほど進んでいないこと

が考えられるが、7, 8は25 kDaにも反応を示していることからFNに対する分解活性は強いと予測されるが、8には約220 kDaの未分解のFNがみられることから、7とは異なった状況にあると考えられる。肉芽組織の状態を示すGスコアの点数は、5はG3点、7はg2点、6はG3点、8はG3点であったが、これらの褥瘡創面の状態について経過観察を行っていないためGスコアと肉芽組織の状態から創傷治癒過程の時期について判断することは困難である。しかし、創部の特徴として5, 6, 8は創縁部周囲に漏出が認められたことから、毛細血管の血流循環が停滞し血漿成分を細胞外に滲出しやすい状態にあった。8については創表面が乾燥していたことからFNの分解に何らかの影響がある可能性が考えられる。パーシカンについては対象者5, 7の(a), (c)には検出され(b)には検出されなかったことから、創縁部においてパーシカンが分解・遊離されていることが考えられる。また、5はHAase処理したレーンの(a), (b), (c)にSHAPが検出され、(a)ではSHAPの分解が認められるが創面全体にSHAP-HA複合体が存在していることが考えられる。7は(a), (c)の創縁部に検出できたことから、創縁部においてSHAP-HA複合体が存在し炎症に関与していると思われる。つまり、5の創部では各部位に炎症反応があるなかで、中央部分はECMの構築が行われている。7の創部の中央部は、FNの分解から見てECMが構築されていない状態で創縁部に炎症反応があることが推察される。5の褥瘡創面の状態はeスコアが2点、一部に黄白色で膜上のものが認められ、創縁部周囲は浸軟しており、創面は凸凹し不均一であったことから、炎症を引き起こしやすい創面環境にあったのではないかと考えられる。7の褥瘡創面の状態はeスコアが2点、一部に黄白色で膜上のものが認められたことから炎症に関係していることは予測された。治癒過程では創縁部から肉芽形成が始まるが、分析結果より創縁部に炎症があることが推測され、治癒過程におけるECMの構築を遅延させている可能性も考えられる。

ガーゼは毛細管現象が生じるため、分割したガーゼは隣接するガーゼの影響を受けていることが考えられる。しかし、一つの創面においても場所によっては滲出液中のECMの量や組成に差があることから、創面全体が同じ状態ではないことはいえる。以上のことから、褥瘡創面によってECMの構築状況が違うこと、同一の褥瘡創面においても創の部位によってECMの

状況が違うことが考えられる。

2. 褥瘡とMMP3の関連性について

MMP3は慢性潰瘍において検出されていることは明らかにされているが(Saarialho et al., 1998; Fray et al., 2003), 褥瘡創面の滲出液からもMMP3が検出された。MMP3の基質にFNがあり、治癒過程ではMMP3がFNのタンパク質構造を切断することからFNの組織への構築に影響を及ぼしていることが考えられる。つまり、MMP3の部分的な分解を受けることで組織に定着できないといったECMの構築状態が考えられる。対象者2, 8のようにeスコアが1点で滲出液が少ないものはMMP3含有量が少なく、対象者1, 3, 5, 6, 7のようにeスコアが2点で滲出液が中等量ではMMP3含有量が高かった。慢性潰瘍においてMMPの産生が肉芽形成期や再構築期に過剰産生されると治癒遅延を引き起こす原因になることから、対象者3はgスコアが1点で良性肉芽が創面の90%以上であり、この時期が肉芽形成期ならばMMP3の含有量が高いため、治癒過程に何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。また、抗FN抗体反応の結果と照合すると、対象者5はG3点、6はG3点で良性肉芽は50%未満であり創縁部周囲に漏出が認められ、MMP3含有量が多いがFNの分解はそれほど進んでいない。これは、漏出により血漿成分に含まれるFNが創面に分泌されたからだと考えられる。7はg2点で創部が平坦であり漏出が認められず、MMP3含有量は5, 6と比べると少ないが、FNの分解は進んでいる。これは、血漿成分中のFN分泌量が少ないことによる影響ではないかと考える。8はG3点で良性肉芽は50%未満であり、MMP3含有量が少ないが、FNの分解が進んでいる。このことは、MMPsの一つであるMMP9が褥瘡の治癒過程の遅延に関係しているという報告もあり(Laudyig et al., 2002), 他のMMPsが関係していることが考えられる。その他MMP3の阻害分子の存在や、褥瘡発生部位による組織の違いなどが治癒過程に何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。

現在、さまざまな褥瘡スケールを用いて褥瘡の状態をアセスメントし必要な看護介入を導き出しているが、多様である褥瘡創面を正確にアセスメントするには課題が多いと思われる。褥瘡創面の傾向によってECMの構築状態に相違があること、一つの創面においても違いがあること、褥瘡と褥瘡創面の滲出液中に含まれ

る MMP3 の含有量の違いから治癒過程や創面の状態の関連が詳細に明らかになれば、褥瘡創面の状態を創傷治癒過程の段階と照合した推測を行うことができ、褥瘡のアセスメントに活用することが期待できると考える。

3. 本研究の限界と今後の課題

本研究は、対象者のガーゼの条件によってガーゼに付着したタンパク質成分が ECM に影響を与えていること、MMP3 濃度の結果は他の MMP や炎症によるサイトカインの影響を受けている可能性があることが限界として挙げられる。今後は、褥瘡を時間軸で観察し、創傷治癒過程の時期と褥瘡の潰瘍状態を類似するものに分類し、MMP3 濃度の変化と褥瘡創面の ECM の構築状況の解析を行う必要がある。さらに、今回の研究をもとに具体的な看護介入との関連性を実証していく必要がある。

Ⅶ. 結 論

材料となったガーゼに付着した滲出液から抽出したタンパク質を分析した結果、以下の結論を得た。

1. 褥瘡創面において、FN, パーシカン, ITI および SHAP-HA の発現、分解程度に違いがあり、褥瘡創面と ECM の構築状態に関連性があることが明らかになった。また、同じ創面でも創部の部位によってウェスタンブロット法の結果に相違があることが明らかとなった。

2. 褥瘡創面において MMP3 が関連しており、対象によって MMP3 含有量が異なった。中でも、DESIGN の eスコアが2点で滲出液が中等量のものには MMP3 含有量が高い傾向にあった。

謝辞：本研究を実施するにあたり、快くご協力してくださいました患者様と病院スタッフの皆様へ感謝いたします。また、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 磯貝善蔵先生に深謝し、お礼を申し上げます。

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、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。

文 献

- Clark R. A., Ghosh K., Tonnesen M. G. (2007) : Tissue engineering for cutaneous wounds, *J. Invest. Dermatol.*, 127(5), 1018-1029.
- Fray J. M., 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.
- 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.
- Herrick S. E., Ireland G. W., Simon D., et al. (1996) : Venous ulcer fibroblasts compared with normal fibroblasts show differences in collagen but not fibronectin production under both normal and hypoxic conditions, *J. Invest. Dermatol.*, 106(1), 187-193.
- Herrick S. E., Sloan P., McGurk M., et al. (1992) : Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers, *Am. J. Pathol.*, 141(5), 1085-1095.
- Laudyig P. G., Robson C. M., Liu R., et al. (2002) : Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers, *Wound Repair Regen.*, 10(1), 26-37.
- Martin P. (1997) : Wound healing-aiming for perfect skin regeneration, *Science*, 276, 75-81.
- 松井優子, 須釜淳子, 真田弘美, 他 4 名 (2005) : 褥瘡状態判定スケール (DESIGN) の予測妥当性の検証と重みづけの検討, *日本褥瘡学会誌*, 7(1), 67-75.
- Matsumoto H., Isogai Z., Yamanaka M., et al. (2006) : Compressive mechanical stress upregulates MMP-3, ADAMTS-4, fibronectin and versican/PG-M in human dermal fibroblasts, 38th Annual Meeting Japanese Society for Connective Tissue Research, 47(5), 312.
- Motte C. A., Hascall V. C., Drazba J., et al. (2003) : Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid : polycytidylic acid : inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function, *Am. J. Pathol.*, 163(1), 121-133.
- 日本看護褥瘡学会 編 (2005) : 科学的根拠に基づく褥瘡局所治療ガイドライン, 日本褥瘡学会出版, 東京.
- Ohno-Jinno A., Isogai Z., Yoneda M., et al. (2008) : Versican and fibrillin-1 form a major hyaluronan-binding complex in the ciliary body, *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, 49(7), 2870-2877.
- Okada Y., Nagase H., Harris E. D. (1986) : A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components, *J. Biol. Chem.*, 261(30), 14245-14255.
- Panfilis G., Ghidini A., Graifemberghi S., et al. (2000) :

- Dexamethasone-induced healing of chronic leg ulcers in a patient with defective organization of the extracellular matrix of fibronectin, *Br. J. Dermatol.*, **142**, 166-170.
- Saarialho-Kere U. K. (1998) : Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers, *Arch. Dermatol. Res.*, **290**, S 47-S 54.
- 真田弘美, 徳永恵子, 宮地良樹, 他 4 名 (2002) : 「DESIGN」-褥瘡アセスメントとしての信頼性の検証, *日本褥瘡学会誌*, **4**(1), 8-12.
- 田澤賢次編 (2003) : 創傷管理と治療システム, 金原出版, 東京.
- Tominaga K., Higuchi K., Watanabe T., et al. (2001) : Expression of gene for EIIIA and EIIIB fibronectin, fetal types of fibronectin, during gastric ulcer healing in rats, *Dig. Dis. Sci.*, **46**(2), 311-317.
- Yoneda M. (2001) : Key molecules to an understanding of intracellular hyaluronan function, *Connective Tissue*, **33**(3), 227-233.
- Yoneda M., Zhao M., Zhuo L., et al. (2000) : Roles of inter- α -trypsin inhibitor and hyaluronan-binding proteoglycans in hyaluronan-rich matrix formation, In G. Abatangelo and P.H. Weigel (eds.), *Redefining Hyaluronan*, 21-30, Elsevier Science.
- Zhuo L., Hascall V. C., Kimata K. (2004) : Inter- α -trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex, *J. Biol. Chem.*, **279**(37), 38079-38082.
- Zhuo L., Kanamori A., Kannagi R., et al. (2006) : SHAP potentiates the CD 44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum, *J. Biol. Chem.*, **281**(29), 20303-20314.
- Zhuo L., Yoneda M., Zhao M., et al. (2001) : Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility, *J. Biol. Chem.*, **276**(11), 7693-7696.

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違うこと、ii) 一つの褥瘡創面でも部位により抗体反応が違う、iii) MMP 3 の発現量が対象によって違いがあ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 分子の構築状態が違うことが考えられ、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 を筆頭にしておいて、これらの分子は細胞の形態維持に重要な役割をもっており、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い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

外用剤はゲーベックリーム(一般名:スルファジアジン銀, 田辺三菱製薬社), ユーパスタコーワ軟膏(一般名:精製白糖, ポビドンヨード, 興和社)であり, タンパク分解酵素剤は含まれていなかった。褥瘡創面の状態を表すツールとして信頼性が検証されている日本褥瘡学会が策定した DESIGN を用いた(松井ら, 2005; 真田ら, 2002; 日本褥瘡学会, 2005)。DESIGN は, deeps(深さ), exudate(滲出液), size(大きさ), inflammation / infection(炎症/感染), granulation tissue(肉芽組織), necrotic tissue(壊死組織)の各項目の頭文字を組み合わせたものである。褥瘡にポケット(pocket)が存在する場合はPと記入する。褥瘡が軽度の場合はアルファベットの小文字を重度の場合は大文字で表し, 創面の評価は各6項目を細分化し点数化することができる。点数の内容は, 重症なものほど点数が高く, 最高得点は28点であり, 治癒の状態で0点となる。また, 褥瘡の創縁部と創表面の状態について皮膚科専門医の助言を受け, 評価を行った。対象者8名は1~8のコード番号とした。

2. 実験方法

1) ガーゼからのタンパク質の抽出①

ガーゼからの抽出液の上清を試料として用いる方法について確立されておらず, 試料として使用可能であるか確認する必要があったため, 調査開始時期に回収を行った対象者1, 2, 3, 4のガーゼの分析を行うこととした。方法は, 褥瘡創面の滲出液が付着したガーゼ中央部分を1cm四方にカットし, 滅菌したスピッツに入れ, リン酸緩衝塩溶液(140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 以下PBSとする)を5 ml 注ぎ, タンパク質の分解を防ぐためにプロテアーゼインヒビターカクテル(Sigma社)を加え混ぜ合わせ4°Cで一晩放置した(約17時間~18時間)。PBS中のガーゼを取り出し, タンパク質が抽出された溶液を12,000 rpm, 4°C, 20分間遠心機にかけ上清と沈殿物に分離し上清を回収した。

2) タンパク質の定量

回収された上清にタンパク質が抽出されているか確認するためにタンパク質の定量を行った。方法は, micro BCA™ protein assay reagent kit(Pierce社)を用いて行い, 分光光度計(型番S1000, Spectrawave WAP社)を用いて波長562 nmにおける吸光度から, タンパク量を算出した。

3) ウェスタンブロット法を用いたタンパク質の分析

ウェスタンブロットとは, SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ポリアクリルアミドゲル電気泳動)とイムノブロットの分析方法を用いてタンパク質を検出する方法である。SDS-PAGEとは, アクリルアミドの重合体であるポリアクリルアミドのゲルを使用した電気泳動により, タンパク質を分子量の大きさによって分離することができる。イムノブロットは, SDS-PAGE後のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し, 目的としているタンパク質の抗体を用いてニトロセルロース膜上で免疫学的に検出することができる。これらの方法を用いることで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視覚化し確認することができる。

ガーゼから回収された上清に含まれるタンパク質を還元剤(DTT)でタンパク質S-S結合(ジスルフィド結合)を切断する処理をし, 7.5%のアクリルアミドゲル(レディースゲルJ: Bio-Rad社)を用いてSDS-PAGEを行いタンパク質を分離した。また, SHAP-HAを検出する目的で, ストレプトマイセス・ヒアルロニダーゼ(以下HAaseとする)処理を行った。上清に緩衝液(0.1 Macetate buffer, PH 5.0)とHAase 0.2 TRU(生化学工業株式会社)を加え60°C, 90分インキュベートした。HAは分子量100万~200万の巨大分子のため, ポリアクリルアミドゲル中を移動することができない。HAaseでHAを分解することで初めてHAに共有結合していたSHAP(ITIの長鎖)またはその分解物がゲル中を移動することができる。

泳動条件はゲル1枚に対し電流20 mA, 約60分とした。電気泳動終了後, ゲル中に分離されたタンパク質を転写するために, 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)に電圧8 V, 4°Cで約16時間転写した。その後, イムノブロットを行った。転写後のニトロセルロース膜は, 抗体の非特異的吸着を防ぐため転写されていない部分をブロックすることが必要であるため, 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, 目的とするタンパク質に対する一次抗体を希釈した溶液にニトロセルロース膜を浸し, 室温で1時間振とうした。余分な抗体を除去するためPBS-0.1%, Tween-20(界面活性剤)(以下PBS-

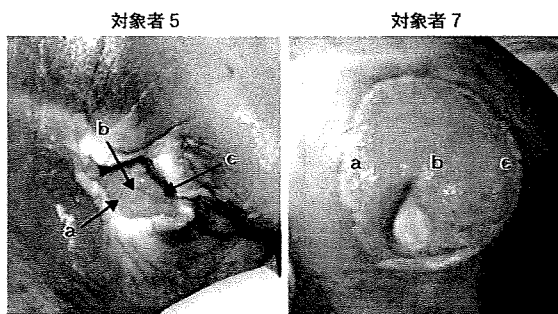


図1 褥瘡創面と創面部位の一例

対象者5, 7の褥瘡創面の画像と画像内に示すa, b, cは9分割したガーゼを選択した場所を表わしている。

Tween とする)で1時間洗浄後、希釈した二次抗体に浸し、遮光して1時間振とうした。結合しなかった抗体を除去するためPBS-Tweenで1時間洗浄後、化学発光試薬(Western Lightnin™ Chemiluminescence Reagent Plus: PerkinElmer社)とX線フィルム(Hyperfilm ECL: Amersham Biosciences社)で抗体の結合したタンパク質を検出した。ガーゼから回収した試料にどのようなECMに関係する分子が存在しているのかを明らかにするため、血清成分、リンパ球表面抗原、細胞、結合組織、基底膜のそれぞれに存在する分子に対する抗体を用いて調べた(表2)。

4) ガーゼからのタンパク質の抽出②

対象者1, 2, 3, 4のウェスタンブロット法の結果より対象者によって検出されたECMの量や構成が異なること、対象者の創部の部位によっても違いがあるかもしれないこと、上清だけでは検出できないタンパク質が存在するかもしれないことが考えられた。そこで、一つの創部の部位の違いをみる目的で採取したガーゼを分割し分析することとした。褥瘡創部とガーゼの状態から、ガーゼを1cm四方の大ききでカットし分析するために、対象者5, 7を9分割、6を4分割、8を2分割した。また、対象者5, 7の9分割したガーゼの中から3カ所(a, b, c)を選択した。(a)は褥瘡の左創縁部、(b)は中央部、(c)は右創縁部である(図1)。対象者6の4分割したガーゼは(a)右創縁部、(b)右側中央部、(c)左側中央部、(d)左創縁部である。8の2分割したガーゼは(a)右創縁部、(b)左創縁部である。対象者5, 7の(a), (c)を選択した理由は次のことによる。治癒過程では創縁部から肉芽形成が始まり創縁部の状態(細胞が増殖しやすい状態)が整備されていないと創部の修復に時間を要する可能性が

考えられる。よって、一つの褥瘡創面において創縁部の部位による肉芽形成の状態の違いがあり、それがECMの分解程度や状態の違いとして表れていると考えて選択した。

ガーゼをPBSに浸しタンパク質の分解を防ぐためにプロテアーゼインヒビターカクテル(Sigma社)を加え混ぜ合わせた後4°Cで一晩放置した(約17時間~18時間)。取り出したガーゼをフィルター付カラム(Ultrafree-CL Filters: Millipore社)に入れ、軽く遠心した後、下層に溜まった液を回収した。回収した液を12,000 rpm, 4°C, 20分間遠心し上清と沈殿物に分離し、沈殿物は10 mM DTTで溶解した。その後、III. 2. 3)で示した方法と同様に分析を行った。

予備実験の段階で表2に示した抗体で分析した結果、上清からFN, ITIが検出され、沈殿物からはパーシカン(6084)が検出された。よって、対象者5, 7はFN, ITI, パーシカン(6084)の3種類の分子に絞りこみ、FN, ITIの検出時には上清を用い、パーシカン(6084)の検出時には沈殿物を使用し、それぞれの特異抗体で確認した。抗体の希釈倍率は、1/2,000 anti-FN, 1/2,000 anti-ITI, 1/1,000 anti-パーシカンとした。また、対象者6, 8は回収された試料が少なかったためFNに対する抗体のみの確認とし、抗体の希釈倍率は1/2,000とした。

なお、結果の見方は、目的とするECMの分子量と実際に抗体で検出されたタンパク質の分子量を比較し、両者が一致している場合には目的とするECMであると判断できる。また、分子量が小さくなり低分子化している場合は分解を起している可能性があるとして予測することができる。転写されたタンパク質の分子量の大きさを確認するためには、タンパク質分子量マーカー(マーカー)を用いる。kDaは分子量を示す単位である。今回検出したFN, ITI, パーシカンの分子量はそれぞれ約220 kDa, 約230 kDa, 約500 kDaである。分子量50~25 kDaに抗体反応を示しているのは分解産物となって検出されたものである。

褥瘡の状態とウェスタンブロット法の結果については、皮膚科専門医の助言を受けた。

5) 酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)

微量しか存在しないタンパク質やペプチドを検索する目的で物質を定量する方法として酵素免疫測定法がある。この方法を用いて、回収された上清のタンパク

表1 対象者の属性

対象者	年齢(歳)	性別	部位	DESIGN							
				D	E	S	I	G	N	P	合計点
1	80代	女	踵骨部	D4	e2	s2	l2	G4	N1	—	15
2	60代	男	下腿部	D3	e1	s2	l1	g1	n0	—	8
3	70代	男	下腿部	D3	e2	s2	l2	g1	n0	—	10
4	70代	男	下腿部	d2	e1	s1	l0	g0	n0	—	4
5	80代	女	仙骨部	D3	e2	s3	l1	G3	n0	1	13
6	80代	女	背部	D3	e2	s3	l0	G3	n0	—	11
7	80代	女	大転子部	D4	e2	s5	l1	g2	n0	—	14
8	80代	男	踵骨部	D3	e1	s2	l1	G3	N2	—	12

質中に含まれる MMP3 を定量した。MMP3 を選択した理由として、一つ目は、線維芽細胞を培養し加圧を行った実験(Matsumoto et al., 2006)で MMP3 の上昇が確認されたこと、二つ目は、慢性潰瘍の治癒過程の遅延に MMP3 が関与していると報告されているため(Saarialho-Kere et al., 1998; Fray et al., 2003)、三つ目は、FN と MMP3 は皮膚潰瘍の治癒過程において重要な働きをしているとの報告があり(Okada et al., 1986)、ウェスタンブロット法の結果から FN のタンパク質の反応パターンに違いがあるため、MMP3 との関連性があるのかどうか明らかにしたいことが挙げられる。

使用試薬キットは Human MMP-3(total) Quantikine(R&Dsystems 社)を用い、方法はキットのプロトコールに従った。マイクロプレートリーダー(モデル 680 装置: Bio-Rad 社)にプレートをセットし 450 nm における吸光度から MMP3 量を求めた。さらに、タンパク定量法から得られたタンパク質量(PBS 1 ml 中に含まれるタンパク質量)で MMP3 量を割り、総タンパク質における MMP3 の割り合いを求めた。使用した試料は、対象者 1, 2, 3, 4, 5, 7 は創部の中央部分、6, 8 は創部の中央部分を含むガーゼの箇所を選択し使用した。

IV. 倫理上の手続き

倫理的な配慮として、対象者に対し研究の目的と方法について説明を行い、ガーゼ、創部の画像においてはコード化した情報をもらい、一切検体と対象者と連結しないことを明確にし同意を得た。また、愛知県立看護大学研究倫理審査委員会および協力の得られた医療機関の倫理審査委員会からの承認を得た。

V. 結 果

1. 対象者の属性と褥瘡創面の状態

分析の対象者は褥瘡と診断された 8 名(男性 4 名、女性 4 名)であった。対象者の基本的な背景と DESIGN については表 1 に示すとおりであった。褥瘡創面の状態は、対象者 1 は創縁部周囲が白～赤色様であり創表面全体に黄色で膜状のものが認められた。対象者 2 は創縁部が発赤しており、創表面の一部に黄色で膜状のものが認められた。対象者 3 は創縁部が発赤しており、創表面の一部に黄色で膜状のものが認められた。対象者 4 は炎症所見はなく、肉芽組織は上皮化が認められた。対象者 5 は創縁部周囲が浸軟しており漏出した状態であった。創表面の一部に黄白色で膜状のものが認められ、創表面は凸凹しており、創縁部と創面は深さが異なっていた。対象者 6 は炎症所見はなく、創縁部周囲は浸軟していた。対象者 7 は創表面の一部に黄白色で膜状のものが認められ、創縁部と創面は深さに差異はなかった。対象者 8 は創面の乾燥が認められ、創縁部周囲は浸軟しており漏出した状態であった。

2. ウェスタンブロット法によるタンパク質の分析

今回使用した抗体が認識する抗原の分解前の分子量は、FN が約 220 kDa、ITI が約 230 kDa、パーシカンは約 500 kDa である。分子量 50～25 kDa に抗体反応を示しているのは分解産物となって検出されたものである。抗体が反応している箇所は矢印で示した。また、ITI の反応については、SHAP-HA 複合体由来のバンドは矢印で示し、ITI の由来の分解物のバンドは矢頭で示した。矢印以外のバンドは二次抗体による非特異的結合反応であった。

対象者 1～4 に使用されていたガーゼから抽出され

表2 使用した抗体名

	局在	抗体名	抗原名	免疫動物	会社名
poly	血清	815051	Fibronectin	rabbit	LSL
poly	血清	091229C	Fiburinogen	rabbit	HYPHEN Biomed
poly	血清	O 85	ITI(Inter- α -Trypsin inhibitor)	rabbit	DAKO
poly	血清		HUTI(ピクニン)	rabbit	Zhuo et al., 2001
poly	血清	230708-1	Peroxidase	goat	EY
poly	血清	24021953	Vitronectin	rabbit	Biogenesis
mono	リンパ	sc-17882	CD 68	mouse	SANTA CRUZ
poly	細胞	25031701	Fractin	rabbit	CHEMICON
mono	細胞	CPP 32	Caspase-3	mouse	BD
poly	結合	6084	Versican N-terminal domain	rabbit	Hasegawa et al., 2007
poly	結合	7390	Versican C-terminal domain	rabbit	Ohno et al., 2008
poly	結合	5670	LTBP-1	rabbit	自家製
poly	結合	7670	fibrillin	rabbit	自家製
mono	結合	2-B-1	Versican	mouse	生化学工業
mono	結合	388	LTBP-1	mouse	R&D
mono	結合	BA-4	Erastin	mouse	SIGMA
mono	結合	26	fibrillin-1	mouse	Lynn Sakai
poly	結合	ab 292	Collagen Type I	rabbit	abCam
mono	基底	6-B-6	Decorin	rabbit	生化学工業
mono	基底	ab 17848	Perlcarn	rat	abCam
mono	基底	LAM-88	Laminin	mouse	SIGMA
poly	基底	ab 6586	Collagen Type IV	rabbit	abCam

ガーゼに付着した滲出液からタンパク質を抽出し、SDS-PAGEの分析にかけた後イムノブロットを行い、抽出されたタンパク質にどのようなECM関連分子が含まれているか、また、その存在有無の確認を行うために使用した抗体名を示す。局在は検出されるタンパクの存在部位である。mono: monoclonal antibody, poly: polyclonal antibody

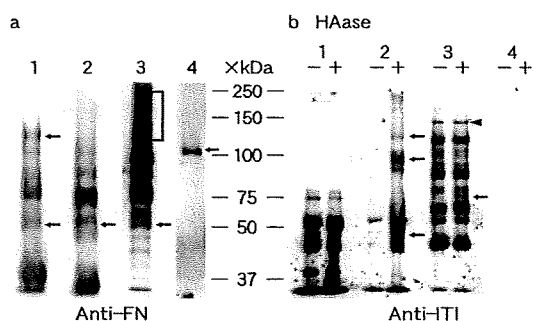


図2 褥瘡創面の抗体反応結果

抗ITI(インター- α -トリプシンインヒビター)抗体は、HAase処理をしないもの(-)とHAase処理したもの(+)を使用し比較を行った。抗体反応の箇所には矢印(←)で示した。なお、bのSHAP-HA複合体由来のバンドは矢印(←)、ITI由来の分解物バンドは矢頭(↖)で示した。

たタンパク質を表2に示した抗体で染色した結果、それぞれの褥瘡に応じて検出されたECMのパターンが異なることが確認できた。

FNは1, 2, 3, 4ともにそれぞれ検出されたECMのパターンが異なることが明らかになった(図2-a)。

なかでも、3は75~250 kDaにかけて強く検出され、4は100 kDaに検出された。ITIは図2-bのレーン2, 3のHAase処理したものにそれぞれ95と50 kDa, 75 kDaの新たなバンドが検出されたが、これらはSHAPおよびその分解物であった。2のHAase処理したレーンの130 kDaのバンドについては、2本のSHAPまたはその分解物が未消化HAでつながったものと考えられるが定かではない。また、3のHAase処理したレーンの150 kDaのバンドはITI由来の分解物であった。パーシカンにおいては検出されなかった。

次に、褥瘡創面の部位別で分析した結果について述べる。FNは、6の(a), (b), (c), (d)は150~200, 50 kDaに検出され、8の(a), (b)は150~250, 50~約25 kDaに検出された(図3-A)。5の(a), (b), (c)はともに150~250 kDaに検出されたが、(a), (c)に比べて(b)は強く検出され、7の(a), (b), (c)はともに50, 25 kDaに強く検出された(図3-B)。パーシカンは、5の(a), (c)で約70 kDaに検出され、

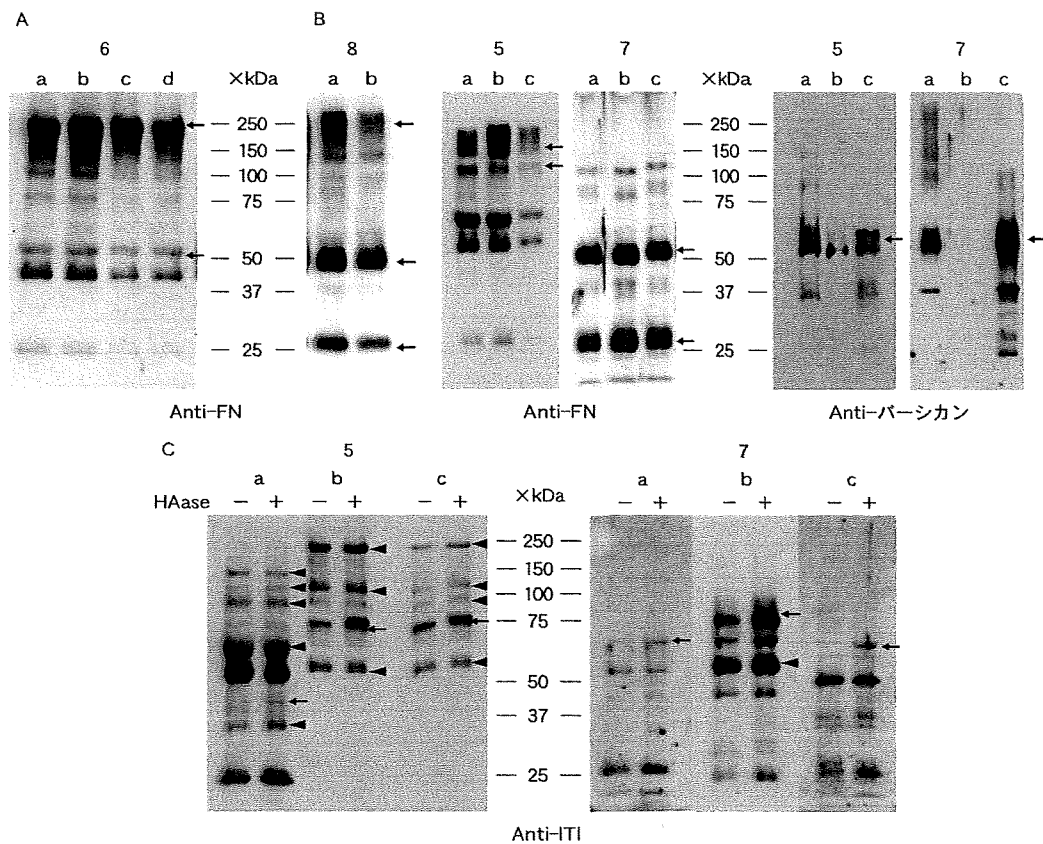


図3 褥瘡創面の各部位の抗体反応結果

対象者5, 7のガーゼを9分割, 6のガーゼを4分割, 8を2分割し図2で説明した同様の方法で試料を回収し SDS-PAGE を行った。a, b, c は9分割したガーゼの3カ所を選択した場所を表わし図1で示している。a: 右創縁部, b: 創部中央部, c: 左創縁部にあたる。

A: 対象者6, 8は上清を使用し SDS-PAGE を行った。

B: 対象者5, 7では, 抗 FN 抗体には上清を, 抗パーシカン抗体には沈殿物を使用し SDS-PAGE を行った。

C: 対象者5, 7は上清を使用し SDS-PAGE を行った。抗 ITI (インター- α -トリプシンインヒビター) 抗体は, HAase 処理をしないもの (-) と HAase 処理したもの (+) を使用し比較を行った。SHAP-HA 複合体由来のバンドは矢印 (\leftarrow)、ITI 由来の分解物バンドは矢頭 (\blacktriangle) で示した。それ以外のバンドは, 二次抗体による非特異反応であった。

(b)には検出されなかった。7は(a), (c)に75 kDaに検出され, (b)には検出されなかった。つまり, パーシカンは, 褥瘡創面の中央部には検出されず, 創縁部において検出された(図3-B)。抗 ITI 抗体を用いた結果では, 5(a)の HAase 処理したレーンに約40 kDaの SHAPの分解物が検出され, (b), (c)の HAase 処理したレーンでは約75 kDaの矢印で示している箇所が HAase 処理しないものと比べると濃く発色されていることから, SHAP由来のバンドが新たに出てくることが確認できた。5(b), (c)の250 kDaのバンドは ITI であり, その他, 矢頭で示している箇所は ITI 由来の分解物であった。7(a), (c)の約70 kDaのバンドは HAase 処理で検出されたことから SHAPの分解物であることが確認できた。7(b)

では, HAase 処理により75 kDaの上に新たなバンドが重複することで濃く発色していることから, HAから遊離された SHAPの存在が明らかとなった。

7(b)HAase 処理したレーンの約50 kDaは ITI由来の分解物であった(図3-C)。つまり, 5は創面の各部位から, 7は創部縁部に SHAPの存在が認められた。

以上のことから, 1つの褥瘡創面でも部位によって, すなわち創部の中央部と創縁部で滲出液中の ECMの量や組成には違いがあることが明らかになった。

3. ELISA によるタンパク質中の MMP 3 濃度の分析

8名の分析を行ったが, うち1名は量的に少なく検出できなかったため, 7名分の結果を示すこととした。

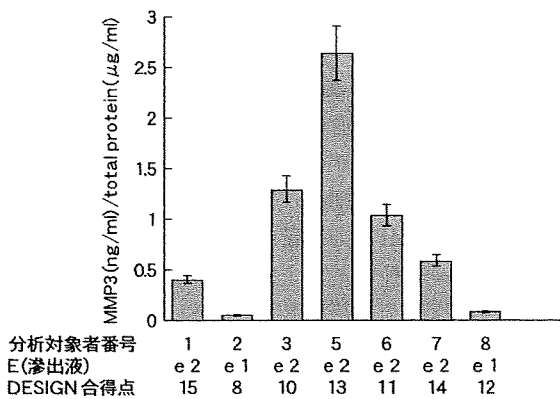


図4 酵素免疫測定法(ELISA)によるMMP3濃度の結果

ガーゼから得られたタンパク質を Human MMP-3(total) Quantikine [R&Dsystems] を使用し免疫反応を行った。その後、マイクロプレートリーダーモデル 680 装置[Bio-Rad]450 nm で吸光度を測定した。測定後、総タンパク質量中に存在する MMP 3 濃度を縦軸にしてグラフに示した。横軸は分析対象となったコード番号、DESIGN の E(滲出液量)の点数、DESIGN の合計点を示す。

MMP 3 量は図 4 に示すとおりであった。共通性として、2, 8 のように滲出液が少ないものは MMP 3 の量が少なく、1, 3, 5, 6, 7 の DESIGN で示す e レベルが 2 点以上に MMP 3 が多く含まれていた。

VI. 考 察

本研究では、褥瘡創面に使用されたガーゼに付着した滲出液を分析することにより、褥瘡創面から遊離した ECM の種類やその分解の状態(パターン)を視覚的に確認することができた。また、ECM の分解酵素である MMP 3 は DESIGN で示す e レベルが 2 点以上で含有量が多い傾向にあった。さらに、褥瘡創面の ECM の構築状況が対象によって違うこと、1 つの褥瘡創面においても部位によって ECM の構築状態に違いがあることが推察された。

1. 褥瘡創面における ECM について

対象者 1~4 に使用されていたガーゼのウェスタンブロット法の分析結果では、FN のパターンが異なることが認められた。1, 2 は FN の分解が進んでおり、3 は分解がそれほど進行しておらず、4 は FN の断片が 100 kDa のバンドのみと分解が抑制され、さらに滲出液中に約 220 kDa の分解前の FN が検出されていない。DESIGN の G スコアの点数は 1 は G 4 点、2, 3 は g 1 点で深さが皮下組織および皮下組織

を越えるものであったが、4 は g 0 点で深さが真皮の層で滲出液は少量のみであり、上皮化しつつある状態であった。創傷治癒過程の上皮化時期において FN が組織に蓄積して、線維を構築するという報告(Herrick et al., 1992, 1996)がある。4 は創部の状況から合成された 220 kDa の FN は組織にとどまり線維化の中で部分的に分解されたものが滲出液中に出てきたことから、治癒過程の時期であったと考えられる。ITI は、血清成分であり、0.4~0.5 mg/ml の濃度で含まれ、75~95 kDa の 2 本のポリペプチド(長鎖)と、30 kDa のコアタンパク質をもつコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(ビクニン)からなる分子量約 230 kDa の分子である。HA と血清中に存在する因子により 2 本の長鎖が HA と共有結合して、SHAP-HA 複合体を形成する(Yoneda et al., 2000; Yoneda, 2001)。炎症時には、組織での HA の合成と血清から ITI および因子が供給され SHAP-HA 複合体が形成される。SHAP-HA 複合体は、HA を線維性の形態へと促しリンパ球の接着を助ける(Motte et al., 2003)。さらに、白血球は表面の HA レセプター CD 44 を介して活性化され炎症を増幅する(Zhuo et al., 2006)。また、SHAP-HA がリウマチ患者の関節液中などに存在しているとの報告がある(Zhuo et al., 2004)。つまり、SHAP-HA の存在から炎症反応が起こっていると推測することができる。

2, 3 の褥瘡には HAase 処理したレーンに抗 ITI 抗体反応で新たに検出されたバンドがあることから、高分子 HA の分解で遊離された ITI の長鎖、すなわち SHAP-HA 複合体の SHAP およびその分解物が存在していることとなる。E スコアの点数は、2 は e 1 点、3 は e 2 点と異なるが、両者ともに創縁部周囲には発赤があり、創部表面の一部に黄色で膜状のものがバイオフィーム(Clark et al., 2007)であるとするならば、2, 3 の褥瘡は一部に炎症をもっている。パーシカンは、1~4 にはっきりとした検出が認められなかった。これは、パーシカンが結合組織に存在したままで組織から遊離していなかったか、方法であるガーゼからのタンパク質の抽出①の抽出条件では、パーシカンはガーゼに付着したままで検出できなかったと考えられる。

5~8 に使用されていたガーゼの分析結果からは、同じ褥瘡創面でも創部の部位によって ECM の分解パターンが量的な違いも含めて違うことが明らかとなった。5, 6 は FN の分解はそれほど進んでいないこと

が考えられるが、7, 8は25 kDaにも反応を示していることからFNに対する分解活性は強いと予測されるが、8には約220 kDaの未分解のFNがみられることから、7とは異なった状況にあると考えられる。肉芽組織の状態を示すGスコアの点数は、5はG3点、7はg2点、6はG3点、8はG3点であったが、これらの褥瘡創面の状態について経過観察を行っていないためGスコアと肉芽組織の状態から創傷治癒過程の時期について判断することは困難である。しかし、創部の特徴として5, 6, 8は創縁部周囲に漏出が認められたことから、毛細血管の血流循環が停滞し血漿成分を細胞外に滲出しやすい状態にあった。8については創表面が乾燥していたことからFNの分解に何らかの影響がある可能性が考えられる。パーシカンについては対象者5, 7の(a), (c)には検出され(b)には検出されなかったことから、創縁部においてパーシカンが分解・遊離されていることが考えられる。また、5はHAase処理したレーンの(a), (b), (c)にSHAPが検出され、(a)ではSHAPの分解が認められるが創面全体にSHAP-HA複合体が存在していることが考えられる。7は(a), (c)の創縁部に検出できたことから、創縁部においてSHAP-HA複合体が存在し炎症に関与していると思われる。つまり、5の創部では各部位に炎症反応があるなかで、中央部分はECMの構築が行われている。7の創部の中央部は、FNの分解から見てECMが構築されていない状態で創縁部に炎症反応があることが推察される。5の褥瘡創面の状態はeスコアが2点、一部に黄白色で膜上のものが認められ、創縁部周囲は浸軟しており、創面は凸凹し不均一であったことから、炎症を引き起こしやすい創面環境にあったのではないかと考えられる。7の褥瘡創面の状態はeスコアが2点、一部に黄白色で膜上のものが認められたことから炎症に関係していることは予測された。治癒過程では創縁部から肉芽形成が始まるが、分析結果より創縁部に炎症があることが推測され、治癒過程におけるECMの構築を遅延させている可能性も考えられる。

ガーゼは毛細管現象が生じるため、分割したガーゼは隣接するガーゼの影響を受けていることが考えられる。しかし、一つの創面においても場所によっては滲出液中のECMの量や組成に差があることから、創面全体が同じ状態ではないことはいえる。以上のことから、褥瘡創面によってECMの構築状況が違ふこと、同一の褥瘡創面においても創の部位によってECMの

状況が違ふことが考えられる。

2. 褥瘡とMMP3の関連性について

MMP3は慢性潰瘍において検出されていることは明らかにされているが(Saarialho et al., 1998; Fray et al., 2003)、褥瘡創面の滲出液からもMMP3が検出された。MMP3の基質にFNがあり、治癒過程ではMMP3がFNのタンパク質構造を切断することからFNの組織への構築に影響を及ぼしていることが考えられる。つまり、MMP3の部分的な分解を受けることで組織に定着できないといったECMの構築状態が考えられる。対象者2, 8のようにeスコアが1点で滲出液が少ないものはMMP3含有量が少なく、対象者1, 3, 5, 6, 7のようにeスコアが2点で滲出液が中等量ではMMP3含有量が高かった。慢性潰瘍においてMMPの産生が肉芽形成期や再構築期に過剰産生されると治癒遅延を引き起こす原因になることから、対象者3はgスコアが1点で良性肉芽が創面の90%以上であり、この時期が肉芽形成期ならばMMP3の含有量が高いため、治癒過程に何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。また、抗FN抗体反応の結果と照合すると、対象者5はG3点、6はG3点で良性肉芽は50%未満であり創縁部周囲に漏出が認められ、MMP3含有量が多いがFNの分解はそれほど進んでいない。これは、漏出により血漿成分に含まれるFNが創面に分泌されたからだと考えられる。7はg2点で創部が平坦であり漏出が認められず、MMP3含有量は5, 6と比べると少ないが、FNの分解は進んでいる。これは、血漿成分中のFN分泌量が少ないことによる影響ではないかと考える。8はG3点で良性肉芽は50%未満であり、MMP3含有量が少ないが、FNの分解が進んでいる。このことは、MMPsの一つであるMMP9が褥瘡の治癒過程の遅延に関係しているという報告もあり(Laudyig et al., 2002)、他のMMPsが関係していることが考えられる。その他MMP3の阻害分子の存在や、褥瘡発生部位による組織の違いなどが治癒過程に何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。

現在、さまざまな褥瘡スケールを用いて褥瘡の状態をアセスメントし必要な看護介入を導き出しているが、多様である褥瘡創面を正確にアセスメントするには課題が多いと思われる。褥瘡創面の傾向によってECMの構築状態に相違があること、一つの創面においても違いがあること、褥瘡と褥瘡創面の滲出液中に含まれ

る MMP 3 の含有量の違いから治癒過程や創面の状態の関連が詳細に明らかになれば、褥瘡創面の状態を創傷治癒過程の段階と照合した推測を行うことができ、褥瘡のアセスメントに活用することが期待できると考える。

3. 本研究の限界と今後の課題

本研究は、対象者のガーゼの条件によってガーゼに付着したタンパク質成分が ECM に影響を与えていること、MMP 3 濃度の結果は他の MMP や炎症によるサイトカインの影響を受けている可能性があることが限界として挙げられる。今後は、褥瘡を時間軸で観察し、創傷治癒過程の時期と褥瘡の潰瘍状態を類似するものに分類し、MMP 3 濃度の変化と褥瘡創面の ECM の構築状況の解析を行う必要がある。さらに、今回の研究をもとに具体的な看護介入との関連性を実証していく必要がある。

Ⅶ. 結 論

材料となったガーゼに付着した滲出液から抽出したタンパク質を分析した結果、以下の結論を得た。

1. 褥瘡創面において、FN、パーシカン、ITI および SHAP-HA の発現、分解程度に違いがあり、褥瘡創面と ECM の構築状態に関連性があることが明らかになった。また、同じ創面でも創部の部位によってウェスタンブロット法の結果に相違があることが明らかとなった。

2. 褥瘡創面において MMP 3 が関連しており、対象によって MMP 3 含有量が異なった。中でも、DESIGN の e スコアが 2 点で滲出液が中等量のものには MMP 3 含有量が高い傾向にあった。

謝辞：本研究を実施するにあたり、快くご協力してくださいました患者様と病院スタッフの皆様へ感謝いたします。また、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 磯貝善蔵先生に深謝し、お礼を申し上げます。

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、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。

文 献

- Clark R. A., Ghosh K., Tonnesen M. G. (2007) : Tissue engineering for cutaneous wounds, *J. Invest. Dermatol.*, 127(5), 1018-1029.
- Fray J. M., 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.
- 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.
- Herrick S. E., Ireland G. W., Simon D., et al. (1996) : Venous ulcer fibroblasts compared with normal fibroblasts show differences in collagen but not fibronectin production under both normal and hypoxic conditions, *J. Invest. Dermatol.*, 106(1), 187-193.
- Herrick S. E., Sloan P., McGurk M., et al. (1992) : Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers, *Am. J. Pathol.*, 141(5), 1085-1095.
- Laudyig P. G., Robson C. M., Liu R., et al. (2002) : Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers, *Wound Repair Regen.*, 10(1), 26-37.
- Martin P. (1997) : Wound healing-aiming for perfect skin regeneration, *Science*, 276, 75-81.
- 松井優子, 須釜淳子, 真田弘美, 他 4 名 (2005) : 褥瘡状態判定スケール (DESIGN) の予測妥当性の検証と重みづけの検討, *日本褥瘡学会誌*, 7(1), 67-75.
- Matsumoto H., Isogai Z., Yamanaka M., et al. (2006) : Compressive mechanical stress upregulates MMP-3, ADAMTS-4, fibronectin and versican/PG-M in human dermal fibroblasts, 38th Annual Meeting Japanese Society for Connective Tissue Research, 47(5), 312.
- Motte C. A., Hascall V. C., Drazba J., et al. (2003) : Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid : polycytidylic acid : inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function, *Am. J. Pathol.*, 163(1), 121-133.
- 日本看護褥瘡学会 編 (2005) : 科学的根拠に基づく褥瘡局所治療ガイドライン, 日本褥瘡学会出版, 東京.
- Ohno-Jinno A., Isogai Z., Yoneda M., et al. (2008) : Versican and fibrillin-1 form a major hyaluronan-binding complex in the ciliary body, *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, 49(7), 2870-2877.
- Okada Y., Nagase H., Harris E. D. (1986) : A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components, *J. Biol. Chem.*, 261(30), 14245-14255.
- Panfilis G., Ghidini A., Graifemberghi S., et al. (2000) :

- Dexamethasone-induced healing of chronic leg ulcers in a patient with defective organization of the extracellular matrix of fibronectin, *Br. J. Dermatol.*, **142**, 166-170.
- Saarialho-Kere U. K. (1998) : Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers, *Arch. Dermatol. Res.*, **290**, S 47-S 54.
- 真田弘美, 徳永恵子, 宮地良樹, 他 4 名 (2002) : 「DESIGN」-褥瘡アセスメントとしての信頼性の検証, *日本褥瘡学会誌*, **4**(1), 8-12.
- 田澤賢次編 (2003) : 創傷管理と治療システム, 金原出版, 東京.
- Tominaga K., Higuchi K., Watanabe T., et al. (2001) : Expression of gene for EIIIA and EIIIB fibronectin, fetal types of fibronectin, during gastric ulcer healing in rats, *Dig. Dis. Sci.*, **46**(2), 311-317.
- Yoneda M. (2001) : Key molecules to an understanding of intracellular hyaluronan function, *Connective Tissue*, **33**(3), 227-233.
- Yoneda M., Zhao M., Zhuo L., et al. (2000) : Roles of inter- α -trypsin inhibitor and hyaluronan-binding proteoglycans in hyaluronan-rich matrix formation, In G. Abatangelo and P. H. Weigel (eds.), *Redefining Hyaluronan*, 21-30, Elsevier Science.
- Zhuo L., Hascall V. C., Kimata K. (2004) : Inter- α -trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex, *J. Biol. Chem.*, **279**(37), 38079-38082.
- Zhuo L., Kanamori A., Kannagi R., et al. (2006) : SHAP potentiates the CD 44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum, *J. Biol. Chem.*, **281**(29), 20303-20314.
- Zhuo L., Yoneda M., Zhao M., et al. (2001) : Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility, *J. Biol. Chem.*, **276**(11), 7693-7696.