

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791743

研究課題名（和文） 閉鎖陰圧療法における神経の役割に関する研究及び臨床への応用

研究課題名（英文） Experimental research of the effect of nerve on negative pressure wound therapy and clinical application

研究代表者

藤原 敏宏 (FUJIWARA TOSHIHIRO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00423179

研究成果の概要（和文）：ラットより採取した皮膚線維芽細胞及び交感神経細胞様に分化させたPC12細胞の各種陰圧環境下での動態変化を調査した。結果、線維芽細胞単独培養の場合では大気圧下に比べ間欠的陰圧下で細胞増殖能、遊走能が促進された。また持続的陰圧下にてコラーゲンの収縮能が促進された。PC12細胞と共培養したコラーゲンは大気圧下に比べ間欠的陰圧下にて収縮能が促進された。これらの結果より間欠的陰圧環境がより効果的に創傷治癒を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Kinetic change of dermal fibroblasts of rats and differentiated PC12 cells like sympathetic ganglionic neuron was investigated under various types of negative pressure. The results indicated that proliferation and migration potencies of dermal fibroblasts were promoted under intermittent negative pressure more than under atmospheric pressure, and collagen gel including dermal fibroblasts contracted under continuous negative pressure more than under atmospheric pressure. Then, the collagen gel in which dermal fibroblasts and differentiated PC12 cells were co-cultured contracted under intermittent negative pressure more than under atmospheric pressure. The results suggested that intermittent negative pressure effectively promotes wound healing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒、閉鎖陰圧療法、線維芽細胞、神経細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病罹患患者数が増加の一途をたどっていることから、近い将来にその合併症

である下腿の難治性皮膚潰瘍の患者も増加してくることが予想される。また高齢化社会に伴い褥瘡の患者も増加することが予想さ

れる。このような難治性皮膚潰瘍は長期にわたり患者に通院または入院治療を必要とさせ QOL を低下させるだけでなく、組織が広範囲に壊死、感染した場合は蜂窩織炎や敗血症の原因となることもある。それゆえ初期の段階で原因疾患の治療と並行して皮膚潰瘍の早期治癒を目指す必要がある。

難治性皮膚潰瘍の治療法の一つに局所閉鎖陰圧療法 (Negative pressure wound therapy) がある。この方法は 1990 年代前半に報告されて以来、欧米諸国で急性及び慢性の皮膚潰瘍の創閉鎖目的として広く普及した治療法である。しかし、まだ確立された至適陰圧はなく、陰圧に対する創部の各種細胞への影響について詳細は不明のままである。また、神経細胞と創傷治癒の関連は古くから報告されているが (Barker, Ann Plast Surg, 2006)、神経細胞の何が創傷治癒を促進するか詳細はまだ分かっていない。そのため創傷治癒の中心的役割である線維芽細胞の様々な陰圧環境下での動態変化を調査研究する必要があると考えられる。また陰圧環境下での線維芽細胞と神経細胞の相互関与についても同様に調査研究が必要と考えられる。

2. 研究の目的

近年、成人病患者の増加や高齢化社会に伴って下肢の皮膚潰瘍や褥瘡の治療頻度が増加している。形成外科に受診するときには難治性となっていることが多く、治療に難渋することがしばしばある。難治性皮膚潰瘍の保存的治療のひとつに局所閉鎖陰圧療法 (NPWT) がある。NPWT は 20 年前より臨床で使用されているにも関わらず、その機構については不明な点が多い。また創傷治癒と神経細胞との関連は昔から報告されているが、詳細については不明である。今回は創部に存在する神経線維に注目し、NPWT における創傷治癒と神経細胞との関連について基礎学的研究を施行し、創傷治癒にとって最適な陰圧を調査し、臨床応用することを目的とする。

また、閉鎖陰圧環境は創傷治癒に伴う健康な細胞のみでなく、肉芽組織内に存在する細菌の増殖も促進する可能性がある。そこで各種閉鎖陰圧環境下における細菌の増殖能についての調査も必要と考えられる。

また、肉芽組織内に細菌が存在する創部に閉鎖陰圧療法を施行するときに浸透力のあ

る抗菌物質を含んだ創傷被覆材を併用することで細菌の増殖を防ぐことが可能と考えられる。そこで日常でよく使用される抗菌性のある創傷被覆材を用いて浸透の違いによる抗菌効果の比較調査も必要と考えられる。

3. 研究の方法

(1) ラットの背部より皮膚線維芽細胞を採取し、3 回継代した後に実験に使用した。神経細胞としてはラットの褐色細胞腫の株化細胞である PC12 細胞を使用した。PC12 細胞は NGF 刺激にて交感神経細胞様に分化誘導される。これらの細胞を各種陰圧環境下にて培養し、動態変化を調査した。グループ 1 は大気圧下、グループ 2 は 75mmHg の持続的陰圧下、グループ 3 は 1 分吸引 1 分休止サイクルの 75mmHg の間欠的陰圧下、グループ 4 は 3 分吸引 3 分休止サイクルの 75mmHg の間欠的陰圧下とした。上記の陰圧環境下において線維芽細胞を単独で培養し、細胞増殖能、遊走能、コラーゲンゲルの収縮能を調査した。また NGF 刺激した PC12 細胞と線維芽細胞をコラーゲンゲル内で共培養し、コラーゲンゲルの収縮能を調査した。

(2) 次に、液体 LB 培地中で Escherichia coli (E. coli) を上記の各種陰圧環境下において培養し、経時的に E. coli の相対量を細胞増殖試薬 WST-1 を用いて調査した。

(3) また、E. coli を含んだ LB 寒天培地の表面に抗菌成分を含んだ創傷被覆材を貼付し、培養した後に各種抗菌成分の浸透による抗菌効果を比較調査した。

4. 研究成果

(1) 線維芽細胞単独での各種陰圧環境下での培養の結果、グループ 4、3、2、1 の順で細胞増殖能を示した (figure1)。遊走能に関してはグループ 3、4、2、1 の順で遊走能を示した (figure2)。コラーゲンゲル収縮に関してはグループ 2、3、4、1 の順で収縮能を示した (figure3)。次に線維芽細胞と NGF 刺激した PC12 細胞をコラーゲンゲル内で共培養した結果、グループ 4、3、2、1 の順で収縮能を示した。これらの結果から間欠的陰圧環境が効率的に線維芽細胞及び神経細胞を刺激して創傷治癒を促進する可能性が示唆された。

figure1

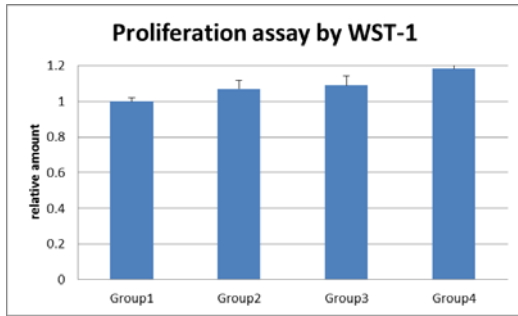


figure2

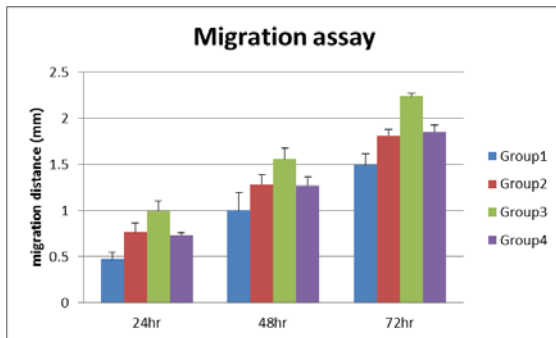


figure3

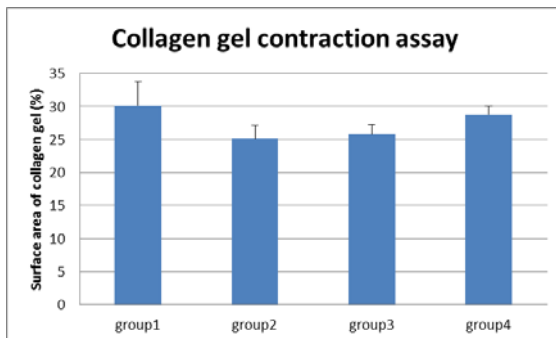
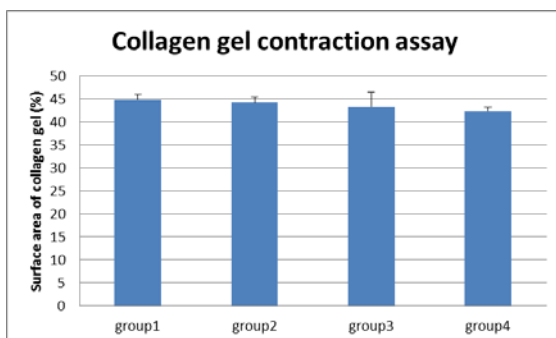
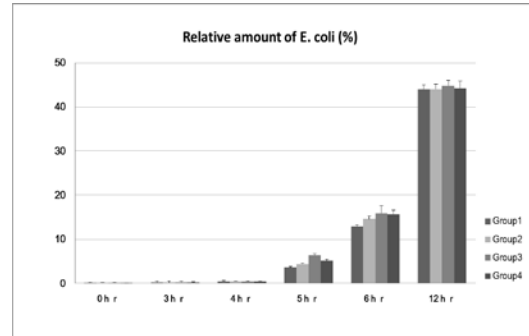


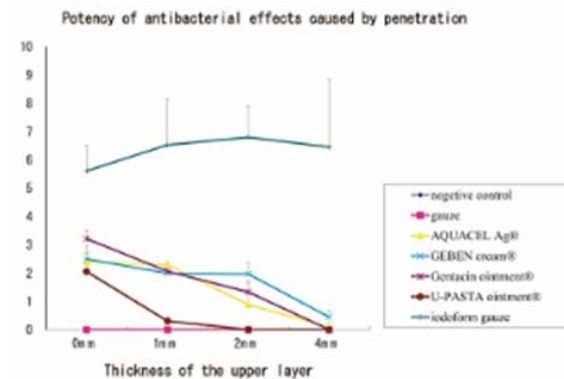
figure4



(2) 各種陰圧環境下において E. coli を液体 LB 培地中で培養した結果、開始 4、5 時間後においてグループ 3、4、2、1 の順で増殖能を示した。このことから間欠的陰圧環境は細菌においても増殖を促進する可能性が示唆された。ただし E. coli は通性嫌気性菌であり、他の細菌に関しては結果が異なる可能性が考えられる。



(3) E. coli を含んだ LB 寒天培地の表面に抗菌成分を含んだ各種創傷被覆材を貼付した浸透による抗菌効果の比較検討においては、ヨードホルムガーゼ®が一番強い浸透による抗菌効果を持っていた。次にゲーベンクリーム®、アクアセルAg®、ゲンタシン軟膏®、ユーパスタ軟膏®の順で浸透による抗菌力を示した。



まとめ

今回の研究結果から、局所閉鎖陰圧療法時には細かいサイクルの間欠的陰圧モードが創部の線維芽細胞及び神経細胞を刺激して、創傷治癒をより促進する可能性があることが示唆された。また閉鎖陰圧環境が細菌の増殖を促進する危険性がある一方で、浸透性の高い抗菌成分を含有した創傷被覆材を併用することでその危険性を軽減できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Fujiwara T, Nishimoto S, Ishise H, Kawai K, Fukuda K, Kakibuchi M. Comparative study of the antibacterial penetrating effects of wound dressings. J Plast Surg Hand Surg 2012;46:2-7. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. 藤原敏宏 福田健児、西本聡、垣淵正男、久保盾貴、細川互 各創傷被覆材の浸透深度の違いによる抗菌効果の比較検討 第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会 2010 年 9 月 17 日 (神奈川)

2. 藤原敏宏、河合建一郎、福田健児、西本聡、垣淵正男 各創傷被覆材の菌保持力の比較検討、第 2 回日本創傷外科学会総会・学術集会 2010 年 7 月 31 日 (兵庫)

6. 研究組織

(1) 研究代表

藤原 敏宏 (FUJIWARA TOSHIHIRO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 00423179

(2) 研究分担者

研究者番号 :

(3) 連携研究者

研究者番号 :