

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700435

研究課題名（和文）褥瘡の発生機序の解明とリハビリテーションアプローチの検討

研究課題名（英文）Generating mechanism and rehabilitation approach of pressure ulcer

研究代表者

黒瀬 智之（KUROSE TOMOYUKI）

広島大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：20363054

研究成果の概要:ラットの腹壁を 2 個の磁石で挟む褥瘡モデルを作製し、圧迫後の遺伝子発現の解析を行った。マイクロアレイと、リアルタイム PCR で mRNA 発現の変化を解析すると、炎症に関連した多くの遺伝子が、圧迫開始から 12 時間後、1 日後に増加していた。炎症性サイトカインが褥瘡発生に関与していると考えられる。しかし、炎症性サイトカインの発現部位やそれぞれの相互作用などは、まだ不明な点が多い。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野:総合領域

科研費の分科・細目:人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード:リハビリテーション医学・障害学・理学療法学

## 1. 研究開始当初の背景

日本における褥瘡有病率は、病院では 2003 年 10 月時点で 36.4 % (日本褥瘡学会調査委員会、2006)、在宅の訪問看護ステーション利用者では 2006 年 7 月時点で 5.7 % (日本褥瘡学会在宅医療委員会、2007) と報告されている。日本だけでなく世界的にも罹患患者が多く、治療費による医療保険費の負担が、多くの国で問題となっている。

褥瘡の発生条件は患者一人一人によって異なるために、ヒトの組織を用いた研究が困難となっている。そのため、褥瘡発生機序に対する追及は少なく、不明な点も多い。さらに、これまでの報告の多くは組織学的観察によるものが多く、

分子生物学的な調査はほとんど行われていない。また、リハビリテーションでは、主に褥瘡の予防目的として、除圧方法の指導や、治療目的で物理療法を使用する試みがなされている。しかし、これらの対策に関するエビデンスは乏しく、議論の余地がある。

## 2. 研究の目的

褥瘡の発生機序を明らかにすることを目的とした。マイクロアレイを用いて、圧迫後の腹壁の遺伝子発現を網羅的に調べ、褥瘡発生過程にどのような反応や遺伝子が関与するかを調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

8~9 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。磁石で腹壁を圧迫する圧迫群とシャム手術群、無処置群にわけた。

ラットの腹壁を腹膜腔内と体外の磁石 2 個で挟む褥瘡モデルを作製した(図 1)。100 mmHg の圧力で、ラットの腹壁を 4 時間圧迫した。下腹部を横切開し、腹膜腔内に表面をシリコン処理したネオジム磁石 (20×25×2 mm、表面磁束約 2,100 ガウス、西興産業、市川市、日本) を挿入して、切開部を縫合した。圧迫は、ネオジム磁石 (20×25×5 mm、表面磁束約 3,100 ガウス、西興産業) を外部から吸着させ、腹壁を腹膜腔と皮膚上の磁石で挟むことにより行った。圧迫開始から 12 時間、1、3 日後に、ラットを屠殺し、腹壁を採取した。対照のシャム手術群は、腹膜腔に磁石を挿入したが、圧迫を行わなかった。

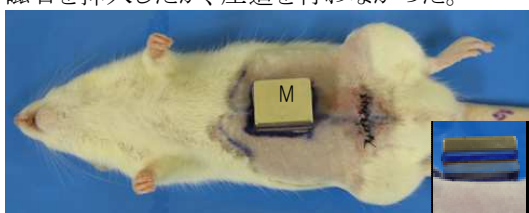
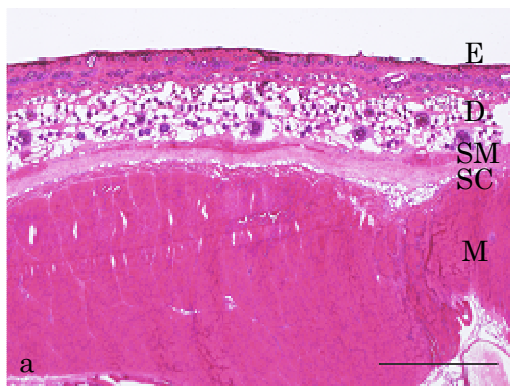


図 1. 磁石 (M) で腹壁を圧迫しているラット。

圧迫部の腹壁を分割し、頭側を凍結固定し、クリオスタットで薄切した。切片にはヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

腹壁の表皮から皮下組織までの部分を試料として total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析とリアルタイム PCR に使用した。Total RNA の抽出には、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit を用いた。

抽出した RNA は、Agilent 2100 Bioanalyzer で質と量を測定した。マイクロアレイは GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array を用いた。



RNA の一部は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor を使って逆転写した後、リアルタイム PCR 解析を行った。炎症反応に関連したもの(表 1)と、内部標準因子である  $\beta$ -actin の TaqMan® Gene Expression Assays を購入した。

表 1. リアルタイム PCR で解析した遺伝子一覧

GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
INF- $\gamma$	interferon gamma
IL-1 $\alpha$	Interleukin 1 alpha
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta
IL-1Ra	interleukin 1 receptor antagonist gene
IL-2	interleukin 2
IL-6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
IL-10	interleukin 10
MMP-3	matrix metalloproteinase 3
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor, beta-1
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor, alpha

### 4. 研究成果

圧迫群では、4 時間の圧迫後に磁石を取り外した時に、圧迫部位がくぼんでいた。圧迫 12 時間後には、圧迫部位が腫れて、赤みがかっていた。その後、腫れや赤みは徐々になくなり、周囲との区別は無くなっていった。シャム手術群の腹部は、実験期間中に肉眼的な変化はみられなかった。

無処置群のラット腹壁は表皮、真皮、皮筋、皮下組織、腹筋層で構成されていた。シャム手術群に変化はみられなかったが、圧迫群は、真皮や皮下組織、腹筋層などが傷害されていた。圧迫開始から 12 時間後に浮腫が顕著で、真皮や皮下組織の厚みが著しく増していた。厚みの増していた皮下組織では、細胞や結合組織が乏し

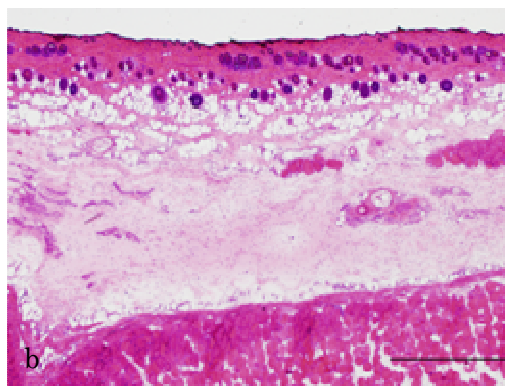


図 2. シャム手術群と圧迫群のヘマトキシリン・エオジン染色像。a. シャム手術群の組織像。表皮 (E)、真皮 (D)、皮筋 (CM)、皮下組織 (SC)、腹筋層 (M) で構成され、無処置群と比べて変わりが無い。b. 圧迫群の組織像。真皮や皮下組織の厚みが増している。スケールバー = 1 mm

く、間隙が広がっていた。浸潤細胞が真皮や皮下組織にまばらにみられ、筋層では線維間隙が広がる部分に浸潤細胞がみられた。深層部では壊死線維やいくつかの貪食されている線維がみられた。圧迫 1 日後も真皮や皮下組織は厚みを増していたが、12 時間後より厚みは減少していた。浸潤細胞が真皮や皮下組織に著しく増加し、筋層の広範な壊死が観察された。圧迫 3 日後には浮腫は軽減したが、皮下組織に多数の浸潤細胞が集積していた。筋層は、表層を除く広範な領域で筋線維が貪食されていた。

GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array で、約 31,000 個の遺伝子発現を調べ、シャム手術群や無処置群の発現量に対する比率で圧迫群の発現量を求めた。シャム手術群に対する発現量が 2 倍以上であった遺伝子は、圧迫 12 時間後で 4,607 個、圧迫 1 日後では 4,454 個、圧迫 3 日後では 2,368 個であった。一方、シャム手術群に対する発現量が 0.5 倍以下であった遺伝子は、圧迫 12 時間後では 5,412 個、圧迫 1 日後では 2,953 個、圧迫 3 日後では 2,927 個であった。

圧迫 12 時間後に増加していた遺伝子には、アポトーシスや炎症反応、酸化ストレスに対する反応、タンパク質分解、低酸素に対する反応に関わるものが多かった。圧迫 1 日後に増加していた遺伝子には、炎症反応、タンパク質分解に関わるものが多かった。圧迫 3 日後に増加していた遺伝子には、炎症反応、タンパク質分解に関わるものが多かったが、12 時間後や 1 日後よりは減っていた。圧迫後の炎症に関連した遺伝子を表 2 に示す。圧迫 12 時間後に GM-CSF、IL-1 $\beta$ 、IL1R、IL-6、IL-10、IL-11、LT- $\beta$ 、MMP-3、TIMP-1、TNF- $\alpha$  が増加していた。圧迫 1 日後には IFN- $\gamma$ 、IL-11、TGF- $\beta$  2、TGF- $\beta$  3 が増加し、IL-1 $\beta$ 、IL1Ra、IL-6、IL-10、LT- $\beta$ 、MMP-3、TIMP-1 は減少していた。圧迫 3 日後には IFN- $\gamma$ 、IL-12 が増加し、IL-4、IL-10、TGF- $\beta$  1、TIMP-1 は減少していた。

表 2. マイクロアレイ解析による炎症に関連した遺伝子の発現量の変化。

遺伝子名	12h	1d	3d
GM-CSF	8.25	1.91	0.61
IFN- $\gamma$	0.60	25.00	3.71
IL-1 $\alpha$	1.96	0.72	1.42
IL-1 $\beta$	16.95	0.24	1.23
IL1Ra	8.31	0.13	0.98
IL-2	1.08	1.22	0.60
IL-6	82.42	0.01	0.74
IL-10	38.32	0.25	0.16
MMP-3	22.18	0.06	0.61
TGF- $\beta$ 1	1.10	0.71	0.49
TIMP-1	4.83	0.36	0.40

TNF- $\alpha$	6.05	0.99	1.18
---------------	------	------	------

また、リアルタイム PCR でも炎症に関連した遺伝子の変化を調べた(表 3)。GM-CSF や、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL1Ra、IL-6、IL-10、MMP-3、TIMP-1、TNF- $\alpha$  が、圧迫 12 時間後に著しく増加していた。1 日後には IFN- $\gamma$  や IL-6、IL-10、MMP-3、TIMP-1 が増加し、IL-1 $\alpha$  や IL-2 は減少していた。3 日後には IFN- $\gamma$  や IL-6、MMP-3 が増加し、IL-1 $\alpha$  や IL-2 は減少していた。

表 3. リアルタイム PCR 解析による炎症に関連した遺伝子の発現量の変化。

遺伝子名	12h	1d	3d
GM-CSF	7.85	1.71	0.60
INF- $\gamma$	2.06	2.26	4.93
IL-1 $\alpha$	1.97	0.34	0.33
IL-1 $\beta$	22.24	1.28	1.45
IL-1Ra	3.98	0.73	0.54
IL-2	0.64	0.40	0.17
IL-6	38.78	10.06	2.52
IL-10	4.36	3.95	1.07
MMP-3	9.01	12.54	2.61
TGF- $\beta$ 1	1.13	0.59	1.26
TIMP-1	2.93	3.35	1.54
TNF- $\alpha$	17.96	1.36	0.77

今回の実験では、マイクロアレイにより、持続的な圧迫後の遺伝子発現を網羅的に調査し、発現量が大きく変動する遺伝子を絞り込むことができた。炎症に関連した遺伝子の発現を調べたところ、GM-CSF や、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL1Ra、IL-6、IL-10、MMP-3、TIMP-1、TNF- $\alpha$  が増加していた。持続的な圧迫による虚血や、虚血再灌流により、炎症性サイトカインが増加し、圧迫部位に過剰に集まった炎症細胞が組織傷害を誘導したと考える。炎症に関連した遺伝子の関係性は複雑で、圧迫後の炎症発生のメカニズムはまだ説明が不十分である。今後さらに炎症発生を制御する遺伝子の同定と、発現部位や作用部位を特定することで、褥瘡の発生機序解明が進み、褥瘡予防や治癒に貢献できると考える。

## 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 5 件)

- ① Hashimoto M, Kurose T, Kawamata S, Comparison between a weight compression and a magnet compression for experimental pressure ulcers in the rat. Histological studies and effects of anesthesia. Arch. Histol. Cytol. 査読有、(In press)

- ②Ozawa J, Morphological changes in hindlimb muscles elicited by adjuvant-induced arthritis of the rat knee. Scand. J. Med. Sci. Sports、査読有、(In press)
- ③Ichinose E, Kurose T, Daitoku D, Kawamata S, The skeletal muscle vascular supply closely correlates with the muscle fiber surface area in the rat, Arch. Histol. Cytol、査読有、71 巻、2008、45-57
- ④Moriyama H, Yoshimura O, Kawamata S, Takayanagi K, Kurose T, Kubota A, Hosoda M, Tobimatsu Y, Alteration in articular cartilage of rat knee joints after spinal cord injury, Osteoarthritis Cartilage、査読有、16 巻、2008 年、392-398
- ⑤Daitoku D, Kurose T, Mori E, Hashimoto M, Kawamata S, Changes in the rat subcutaneous connective tissue after saline and histamine injection in relation to fluid storage and excretion, Arch. Histol. Cytol.、査読有、70 巻、2007 年、29-41

[学会発表] (計 6 件)

- ①川真田聖一、黒瀬智之、人体解剖見学で各種器官の大きさ概念がどう変わるか、第 114 回日本解剖学会総会・学術集会、2009 年 3 月 29 日、岡山市
- ②黒瀬智之、橋本将和、川真田聖一、ラット褥瘡実験モデルの作製と褥瘡関連遺伝子の解析、第 10 回日本褥瘡学会学術集会、2008 年 8 月 29 日、神戸市
- ③小澤淳也、川真田聖一、黒瀬智之、橋本将和、山岡薫、ラット脱神経筋におけるナトリウムチャンネル遺伝子発現の変化、第 43 回日本理学療法学術集会、2008 年 5 月 15 日、福岡市
- ④黒瀬智之、橋本将和、小澤淳也、川真田聖一、褥瘡発生に関与する遺伝子の実験モデルによる解析、第 43 回日本理学療法学術集会、2008 年 5 月 15 日、福岡市
- ⑤黒瀬智之、橋本将和、小澤淳也、川真田聖一、ラット褥瘡実験モデルによる発現遺伝子の解析、第 113 回日本解剖学会総会・学術集会、2008 年 3 月 27 日、大分市
- ⑥橋本将和、黒瀬智之、小澤淳也、川真田聖一、ラット実験モデルによる褥瘡の組織変化、第 113 回日本解剖学会総会・学術集会、2008 年 3 月 27 日、大分市

[図書] (計 1 件)

- ①黒瀬智之、神稜文庫、理学療法学テキスト 第 IX 巻 物理療法 第 2 版、2009 年発行、総ページ数 365 ページ(担当 38-45 ページ)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒瀬 智之 (KUROSE TOMOYUKI)  
 広島大学・大学院保健学研究科・助教  
 研究者番号：20363054

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者