

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24年 5月15日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590759

研究課題名（和文） 漢方薬による褥瘡治療の作用機序の解明

研究課題名（英文） Efficacy of Japanese Kampo medicine for pressure-loading skin ulcer

研究代表者

引網 宏彰 (HIKAMI HIROAKI)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号：70345586

研究成果の概要（和文）：褥瘡モデルラットを用いて、漢方方剤・帰耆建中湯の褥瘡に対する効果を検討した結果、帰耆建中湯は炎症性サイトカインの産生を抑制し、線維芽細胞が筋線維芽細胞に形質転換することを促進し、皮膚潰瘍の経過の終盤には細胞外マトリックスの再構築を促進させる作用を有する可能性が考えられた。帰耆建中湯は褥瘡治療において、貴重な経口治療薬になりうることを示唆された。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the effect of kigikenchuto (KKT), a traditional Japanese formula, in a modified rat pressure-loading skin ulcer model. KKT shortened the duration until healing. Immunohistochemically, KKT increased CD-31-positive vessels in early phase, and increased α -smooth muscle actin (α -SMA)-positive fibroblastic cells in early phase and decreased them in late phase of wound healing. By Western blotting, KKT showed the potential to decrease inflammatory cytokines in early phase, decrease vascular endothelial growth factor in early phase and increase it in late phase, and modulate the expression of extracellular protein matrix. These results suggested the possibility that KKT accelerates pressure ulcer healing through decreases of inflammatory cytokines, increase of angiogenesis, and induction of extracellular matrix remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学一般（含心身医学）

キーワード：東洋医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦は、2010年には65歳以上の人口が総人口の4分の1を占めるようになり、高齢化が急速に進行している。この傾向は、諸外国においても同様である。高齢化社会では高

齢者特有の疾病が問題となっており、その一つに褥瘡の発生の増加がある。

(2) 褥瘡は、患者の日常生活の質を低下させることから、その治療法の開発は重要である。

褥瘡は一般的に「浅い潰瘍（真皮までの損傷）」と「深い潰瘍（皮下組織から深部）」に分類される。「浅い潰瘍」と比較して「深い潰瘍」の治療はより困難であることから、現在は「深い潰瘍」に対する効果的な治療法の確立が期待されている。現在、褥瘡の外用治療薬として成長因子製剤が臨床応用されており効果をあげているが、経口治療薬は少ない。

(3) 近年、褥瘡の治療に漢方薬が用いられるようになり、漢方薬による褥瘡治療の治験報告がされている。当講座でも漢方方剤・帰耆建中湯による褥瘡治療を報告してきた。帰耆建中湯は痩せて発熱・発汗があり、肉芽が生じてこない状態が適応病態であるとされており、古くから褥瘡などの難治性潰瘍性病変に応用されてきた。しかし、褥瘡に対する帰耆建中湯の作用機序についての検討は不十分であるのが現状である。

(4) 近年、褥瘡形成過程における虚血再還流障害に着目し、磁気圧縮を用いた新しい褥瘡動物モデルが開発されたが、この褥瘡動物モデルでは、磁気による皮膚への圧縮を持続しても圧力が及ぶ範囲は皮膚表面までにとどまり、深部の筋層まで及ばないので、より臨床に近い「深い潰瘍」の動物モデルとしては不完全である。また、他の動物モデルも高価であるため、汎用性が低い。

2. 研究の目的

(1) 帰耆建中湯は褥瘡に対する臨床効果が報告されている漢方方剤であるが、その作用機序については未だ明らかとはなっていない。作用機序の検討のため、従来の褥瘡動物モデルより潰瘍形成が確実なモデルを確立するため、ステンレス棒を用いた加圧負荷褥瘡モデル(腹臥位加圧法)の加圧時間、加圧反復日数、体位の影響について検討し、修正を加えた。

(2) 考案した加圧負荷褥瘡モデル(側臥位加圧法)を用いて帰耆建中湯の褥瘡治癒効果とその作用機序について検討した。

3. 研究の方法

(1) 雄性 Wistar 系ラット(24 週齢)を麻酔下で、木製固定板の上に腹臥位(腹臥位固定法)あるいは側臥位(側臥位固定法)に固定した。加圧負荷は先端に直径 10 mm のシリコン栓を付けた 1.02-1.03 kg のステンレス棒をラットの右大転子上の皮膚にのせて行った。加圧時間の検討は、腹臥位固定法にて加圧持続時間を 6 時間(n=4)、12 時間(n=4)の 2 群に分け、24 時間後の潰瘍発生率、死亡率、成功率により評価した。加圧反復日数の検討は、腹

臥位固定法を行ったラット(n=40)に対して、加圧時間 6 時間/日、連日加圧負荷を行い、加圧反復日数による潰瘍化の比較で評価した。腹臥位および側臥位(n=30)の加圧負荷体位による影響の検討においても、同様の方法で評価した。また、加圧部位の肉眼的観察所見を比較した。

(2) 加圧時間 6 時間/日、加圧反復日数 4 日の加圧負荷褥瘡モデル(側臥位加圧法)を用いて、漢方方剤・帰耆建中湯の褥瘡治癒効果とその作用機序解明のための研究を行った。雄性 Wistar 系ラット(24 週齢)(n=30)を無作為に 5 群(6 匹/群)に分け、250 mg/kg 帰耆建中湯エキス含有水(LD-KKT)、500 mg/kg 帰耆建中湯エキス含有水(HD-KKT)、1000 mg/kg 帰耆建中湯エキス含有水(1000 KK)、2000 mg/kg 帰耆建中湯エキス含有水(2000 KK)及び水道水(Control)を 1 日 1 回経口的に 35 日間連続投与し、帰耆建中湯の褥瘡治癒効果を検討するため、経日的な潰瘍面積および潰瘍消失日数を比較した。

(3) 帰耆建中湯の褥瘡治癒効果の作用機序を調べるため、Control 群、LD-KKT 群、HD-KKT 群の 3 群で病理組織学的、免疫組織学的に検討した。皮膚病理組織のヘマトキシリン-エオジン染色標本、Azan 染色標本、抗 CD-31 抗体、抗 α -SMA 抗体、抗 VEGF 抗体による免疫染色を行った。さらに Western blot 法を用い、炎症性サイトカイン(MCP-1、IL-1 β 、TNF- α)、血管新生促進因子(VEGF、PDGF)、細胞外マトリックス関連タンパク質(α -SMA、bFGF、TGF- β 1、Collagen III、Collagen I)の発現量についても検討を行い、Control 群、LD-KKT 群、HD-KKT 群の 3 群で比較検討した。

4. 研究成果

(1) 新たな加圧負荷褥瘡モデルラットの作製

加圧負荷褥瘡モデルラットの作製については、加圧時間が 6、12 時間の加圧時間で死亡率はそれぞれ 0%、75%であった。潰瘍発生率は、加圧反復日数 4 日目が有意に高かった。死亡率は 4 日目が 2 日目に比べ有意に高かったが、成功率は 3 日目、4 日目は 2 日目と比較し有意に高かった。加圧負荷体位の検討については、潰瘍発生率はともに 100%を示したが、死亡率は腹臥位が側臥位に比べ有意に高かった。また成功率でも腹臥位は有意に低い値を示した。加圧部位の肉眼的観察では、腹臥位での潰瘍の形態は非対称性で、筋挫傷が加圧負荷部位以外の組織に認められたが、側臥位での潰瘍の形態は対称性で、筋挫傷は加圧負荷周囲の筋層に及んでいなかった。

以上の結果より、新たな加圧負荷褥瘡モデルラットの作製方法として、側臥位固定条件

下で、一日一回あたり6時間の加圧負荷を4日間反復することを提案した。本モデルの最大の特徴は、加圧負荷体位として側臥位を選択した点である。従来使用されている腹臥位固定条件下での加圧負荷では、負荷による組織の損傷は筋組織にまで達して「深い潰瘍」を呈するものの、組織損傷領域は加圧方向に限定されず、各個体で損傷範囲の再現性に乏しかった。一方側臥位固定法においては、腹臥位固定法と同じ深度の「深い潰瘍」を呈したが、加圧方向に局限しており、各個体での再現性が高かった。この体位による所見の差は、腹臥位固定法では、股関節を屈曲した状態で加圧負荷をかけることで、加圧部位とステンレス棒との間にズレが生じ、垂直な加圧を保てず、加圧負荷部位の筋層に偏位が生じた結果として生じた可能性が考えられた。褥瘡研究に動物モデルを使用するに当たり、個体ごとの組織損傷範囲に大きな差があるのは望ましくない。この点において、我々の提案するモデルは今後の褥瘡研究に大きく貢献できるモデルであると考えられた。

(2) 帰着建中湯の褥瘡に対する治癒促進効果の有無とその作用機序についての検討では、肉眼的治癒観察評価における加圧負荷褥瘡モデルラットの皮膚潰瘍は、Control群に比較し帰着建中湯を投与するLD-KKT群およびHD-KKT群で有意に治癒日数が短縮していた。また、帰着建中湯投与により比較的早い段階で潰瘍の縮小が見られた。(図1)

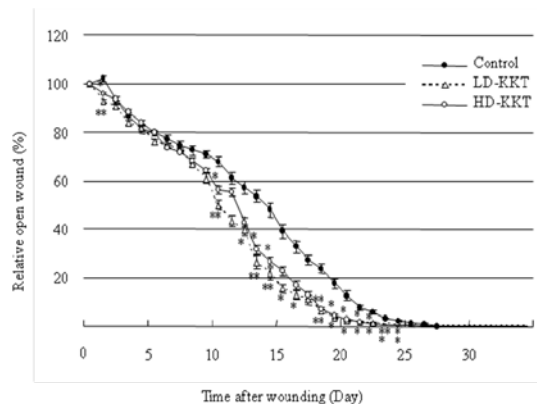


図1 皮膚潰瘍面積率の推移

帰着建中湯を投与した群では創傷治癒過程の比較的初期から潰瘍の縮小が見られたことから、帰着建中湯が上皮化の促進、肉芽形成の促進に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(3) 炎症性サイトカイン・ケモカインであるMCP-1、IL-1 β 、TNF- α はHD-KKT群において、3、7日におけるそれぞれのタンパク質発現量がControl群に比較し、有意に低下して

いた。本研究では潰瘍部に浸潤している炎症細胞の種類の評価は行っていないが、帰着建中湯は3日目の時点で皮膚潰瘍部分へのマクロファージの遊走を遅らせることによってか、あるいは何らかの機序でサイトカイン産生細胞からの炎症性サイトカインの産生を抑えた可能性が考えられた。

(4) 血管内皮細胞の指標となる抗CD-31抗体による血管数は、3、7日目においてLD-KKT群、HD-KKT群がControl群に比較し有意に増加していた。VEGFは、初期に発現量が低下し、PDGFは3日目に増加を示していた。皮膚潰瘍部の新生血管数の増加にはVEGFよりもPDGFの関与がより大きいものと考えられた。早期の段階における帰着建中湯の血管新生に対するVEGFの関与は今回の研究においては否定的であったが、LD-KKT群およびHD-KKT群のVEGF発現量のピークが3日目以前に存在していた可能性は否定できない。また、14日目以降にVEGFがControl群よりも有意に高発現していることについては、抗VEGF抗体による免疫染色標本の評価で線維芽細胞が染色されていたことから、コラーゲンの蓄積に関与した可能性が考えられた。

(5) 細胞外マトリックスの蓄積を評価するため、抗 α -SMA陽性面積を測定した。抗 α -SMA陽性面積はControl群に比較し、HD-KKT群において初期に増加し、35日目にはControl群に比較し低下していた。 α -SMAタンパク質発現量においても、組織的検討と同じ結果が得られた。また、線維芽細胞を筋線維芽細胞に形質転換させるTGF- β 1のタンパク質発現量はHD-KKT群は3日目および14日目にControl群よりも有意に上昇した。この結果は、 α -SMAタンパク質発現量の増加とほぼ一致する結果であった。以上のことから、帰着建中湯は、3日目にはTGF- β 1が線維芽細胞から筋線維芽細胞への形質転換をControl群よりも早く誘導することが示された。筋線維芽細胞のアポトーシスの誘導に関与するbFGFの発現量は、35日目のHD-KKT群において有意に増加していた。また、病理組織評価においても抗 α -SMA陽性筋線維芽細胞面積は35日目にLD-KKT群、HD-KKT群において有意に減少していた。また、細胞外マトリックス関連タンパクであるTGF- β 1は、3日目のHD-KKT群で上昇した。また、HD-KKT群でCollagen IIIは3日目に、Collagen Iは35日目にそれぞれのタンパク質発現が増加した。帰着建中湯がTGF- β 1に作用し、3日目より線維芽細胞が筋線維芽細胞に形質転換することを促し、35日目よりbFGF発現を増加させ、筋線維芽細胞のアポトーシスの誘導に関与することで、細胞外マトリックスの再構築を促進して、Control群よりも有意に

短期間で皮膚潰瘍を治癒させた可能性が考えられた。

近年の褥瘡治療においては、単に治癒を促進させるだけではなく、創傷部の癒着化をも減少させる質の高い治癒が望まれている。帰者建中湯の投与は細胞外マトリックスの再構築を促進し、褥瘡の治癒を促進することが明らかとなったが、bFGF タンパク質の誘導が35日目にはControl群よりも増加していることから、帰者建中湯の投与が皮膚潰瘍の癒着化範囲を減少させ、質の高い治癒に貢献できる可能性が示唆された。

(6) 帰者建中湯は、①炎症初期の皮膚潰瘍周辺へのマクロファージの遊走を抑制するか、あるいは何らかの機序でサイトカイン産生細胞からの炎症性サイトカインの産生を抑制し、②TGF- β 1 の発現を誘導することで、線維芽細胞が筋線維芽細胞に形質転換することを促進し、③皮膚潰瘍の経過の終盤にはbFGF 発現を増加させて筋線維芽細胞をアポトーシスに誘導することで、細胞外マトリックスの再構築を促進させる作用を有する可能性が考えられた。このことから、帰者建中湯は褥瘡治療において、貴重な「経口」治療薬になりうると考えられた。

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 Kimura M., Shibahara N., Hikiami H., Yoshida T., Jo M., Kaneko M., Nogami T., Fujimoto M., Goto H., and Shimada Y.: Traditional Japanese formula kigikenchuto accelerates healing of pressure-loading skin ulcer in rats. Evid Based Complement Alternat Med. Volume 2011, Article ID 592791, 9 pages, 2011 (査読有)

[学会発表] (計3件)

- ① 木村真梨, 条美智子, 野上達也, 藤本誠, 引網宏彰, 後藤博三, 柴原直利, 嶋田豊: 加圧負荷褥瘡モデルラットにおける帰者建中湯の効果 (第4報). 第28回和漢医薬学会学術大会, 2011, 8, 27-28, 富山.
- ② 木村真梨, 金子真利亜, 条美智子, 野上達也, 藤本誠, 引網宏彰, 後藤博三, 嶋田豊, 柴原直利: 加圧負荷褥瘡モデルラットにおける帰者建中湯の効果 (第3報). 第27回和漢医薬学会学術大会, 2010, 8, 28-29, 京都.
- ③ 木村真梨, 中塚友貴子, 条美智子, 引網宏彰, 後藤博三, 嶋田豊, 柴原直利: 加圧負荷褥瘡モデルラットにおける帰者

建中湯の効果 (第2報). 第26回和漢医薬学会学術大会, 2009, 8, 29-30, 千葉.

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

引網 宏彰 (HIKIAMI HIROAKI)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号: 70345586

(2) 研究分担者

柴原 直利 (SHIBAHARA NAOTOSHI)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授

研究者番号: 10272907