

機関番号：15401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700533

研究課題名 (和文) 褥瘡発生の分子機構の解明と物理療法による予防への取り組み

研究課題名 (英文) Clarification of molecular mechanism of pressure ulcers and approach on prevention by physical therapy

研究代表者：

黒瀬 智之 (TOMOYUKI KUROSE)

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 (和文)：

炎症性サイトカインの発現と関係のあるNF- $\kappa$ Bや、HIF-1 $\alpha$ 、酸化ストレスを起こすNOS (nNOS、iNOS、nNOS) の発現をリアルタイムPCRで調べたところ、iNOSのみ著しく増加した。iNOSを阻害することで酸化ストレスを抑制すれば、褥瘡の発生を抑えるかもしれない。

圧迫を繰り返した臨床的な褥瘡モデルでは、1回の圧迫よりも炎症性サイトカインが増加していた。炎症性サイトカインの重要性のさらなる裏付けとなると考える。

研究成果の概要 (英文)：

NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$ , and NOS (nNOS, iNOS, nNOS) that causes an oxidant stress were examined with Real-Time PCR. Only iNOS has increased remarkably. If the oxidant stress is controlled by obstructing iNOS, the generation of the pressure ulcers might be suppressed.

For a clinical pressure ulcers model by whom pressure is repeated, the proinflammatory cytokines have increased more than application of single pressure. I think further of importance of the proinflammatory cytokine if it proves.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

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：褥瘡, リアルタイムPCR, 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

ラットの腹壁を磁石で挟む褥瘡モデルにおいて、炎症反応に関連する遺伝子発現が褥瘡の発生に関与することがわかっている

(平成19～20年度科学研究費 課題番号19700435)。炎症性サイトカインの増加は調べたが、どのような経路で炎症性サイトカインが増加するのか、また、炎症性サイトカイン

ンが褥瘡発生にどの程度寄与するのかは不明なままである。

## 2. 研究の目的

炎症性サイトカインの発現量変化にどのような経路が関係しているのかを明らかにするために、炎症性サイトカインの増加につながる因子の変化を調べることを目的とし、転写調節因子 NF- $\kappa$ B や低酸素誘導因子 HIF-1 $\alpha$ 、一酸化窒素合成酵素群 NOS について調べた。

また、圧迫を繰り返してより臨床的な褥瘡モデルを作製し、深い潰瘍形成の過程での炎症性サイトカインの関与を調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

Wistar ラットの腹壁をネオジウム磁石で挟んで圧迫した。100mmHg で 4 時間圧迫し、圧迫開始から 12 時間、1、3 日後に腹壁を採取した。採取した腹壁は分割して、一方を凍結切片作製用に急速凍結し、他方は mRNA 解析のために RNAlater に浸漬した。一部は表皮から皮下組織までを一塊とし、残りは皮下組織だけを取り出して mRNA の解析に使用した。抽出した RNA を逆転写し、炎症性サイトカインの発現と関係のある NF- $\kappa$ B や、低酸素状態で増加する HIF-1 $\alpha$ 、一酸化窒素を合成して酸化ストレスを起こす NOS (nNOS、iNOS、eNOS) の発現をリアルタイム PCR で調べ、褥瘡への関与を調べた。

圧迫を繰り返す実験では、体内に挿入する磁石はメッキで表面を覆った。100mmHg で 4 時間の圧迫を 1 日 1 回行い、5 日間繰り返した。圧迫期間やその後は毎日圧迫部を観察し、デジタルカメラで撮影した。2 回圧迫 1 日後、4 回圧迫 1 日後、5 回圧迫 2 日後 5 回圧迫 4 日後 5 回圧迫 8 日後 5 回圧迫 12 日後 5 回圧

迫 16 日後 5 回圧迫 20 日後に屠殺し、腹壁を採取した。採取した腹壁は分割して、肉眼的に変化のある圧迫部を凍結切片作製用に急速凍結し、一部を mRNA 解析のために RNAlater に浸漬した。抽出した RNA を逆転写し、炎症性サイトカインの発現を調べた。

## 4. 研究成果

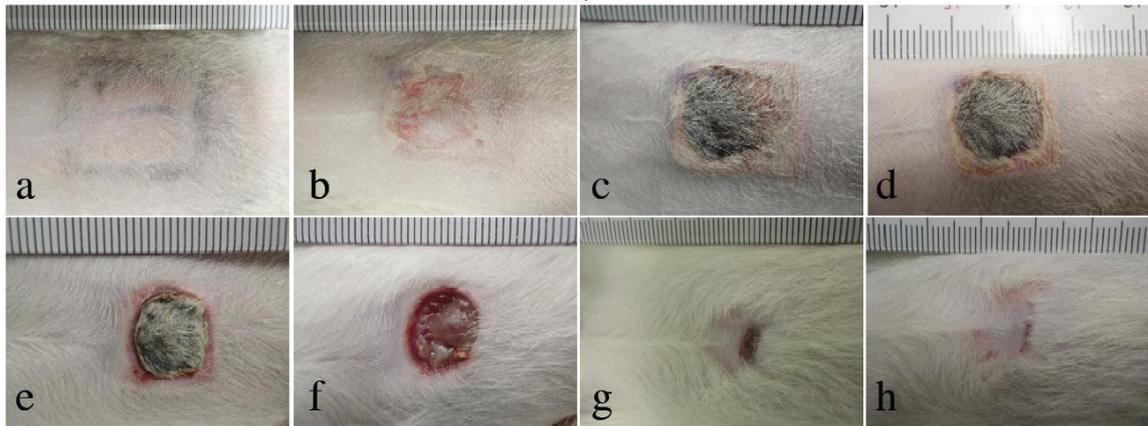
NF- $\kappa$ B の mRNA は圧迫開始から 12 時間、1、3 日後のいずれにおいても変化していなかった。圧迫後の炎症性サイトカインの増加は、他の転写調節因子の影響が考えられる。HIF-1 $\alpha$  の mRNA も変化が確認できず、これは褥瘡発生に虚血による低酸素の影響が少ないことを示唆する。

nNOS や eNOS は減少し、iNOS は著しく増加していた。iNOS の増加は過剰な NO の産生と、それによる局所での酸化ストレスの発生を示唆する。酸化ストレスは、炎症性サイトカインの産生を刺激するだけでなく、組織を破壊する働きがある。酸化ストレスを抑制することで、褥瘡の発生を部分的に抑えることができると思われる。

遺伝子略名	表皮-皮下組織					
	12h	n=4	1d	n=4	3d	n=4
HIF-1 $\alpha$		3.18		1.35		0.78
iNOS		338.62		17.61		20.06
eNOS		11.52		0.75		0.98
nNOS		0.18		0.02		0.02
NF $\kappa$ B1		1.71		0.78		0.68
NF $\kappa$ B2		11.85		1.73		1.19

遺伝子略名	皮下組織					
	12h	n=3	1d	n=3	3d	n=3
HIF-1 $\alpha$		1.76		1.70		1.25
iNOS		15.45		34.89		3.04
eNOS		0.37		0.30		0.45
nNOS		0.12		0.12		1.20
NF $\kappa$ B1		0.84		0.60		0.58
NF $\kappa$ B2		0.62		0.30		0.32

また、圧迫を繰り返したところ、より臨床的な褥瘡様所見が得られた。100 mmHg で 4 時



100 mmHg で4時間の圧迫を繰り返した腹壁の変化。a. 2回圧迫1日後、b. 4回圧迫1日後、c. 5回圧迫2日後 d. 5回圧迫4日後 e. 5回圧迫8日後 f. 5回圧迫12日後 g. 5回圧迫16日後 h. 5回圧迫20日後の圧迫部位の肉眼的所見を示す。

間の圧迫を5日行うと、圧迫期間中も圧迫期間後も進行性に腹壁が傷害された。圧迫開始から数日で炎症所見がみられ、徐々に痂皮が形成した。痂皮が剥がれ落ちた後は徐々に肉芽組織が盛り上がり修復した。炎症性サイトカインの発現量を調べると、1回の圧迫よりも炎症性サイトカインが増加していた。実際の患者で褥瘡が形成されるときにも、炎症性サイトカインが徐々に増加し、潰瘍形成にかかわっていると考える。

##### 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2件)

1. Usami S, Kurose T, Ando Y, Hayakawa M, Kawamata S.: Reduced soleus muscle injury at long muscle length during contraction in the rat. *Anat Sci Int.* 86: 50-7, 2011, 査読有
2. Ozawa J, Kurose T, Kawamata S, Yamaoka K.: Morphological changes in hind limb muscles elicited by adjuvant-induced arthritis of the rat knee. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 20: e72-e79, 2010, 査読有

[学会発表] (計6件)

1. Kawamata, S., Kurose, T., Honkawa, Y., Kubori, Y., Muramoto, H.  
Experimental pressure ulcers induced by repeated compression using magnets. 第116回日本解剖学会全国学術集会. 横浜. (震災のため誌上開催) 2011.3.29
2. 黒瀬智之、川真田聖一: 磁石を用いた褥瘡モデルの皮下組織における炎症性サイトカインの変化. 第115回日本解剖学会全国学術集会. 岩手. 2010. 3. 30
3. Maejima H., Sakano S., Otani T., Kurose T., Deie M. Modification of cerebellar AMPA receptor by balance exercise in rats. The Society for Neuroscience 39th Annual meeting. Chicago, IL, USA, 2009, 10.20.
4. Maejima H., Sakano S., Otani T., Kurose T., Deie M. The modification of cerebellar AMPA receptor expression by motor exercises. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009). Kyoto. 2009. 7.28.
5. 前島洋, 坂野周平, 大谷拓哉, 黒瀬智之, 出家正隆. 走行運動によるラット小脳 AMPA 受容体の修飾. 第14回理学療法の医学的基礎研究会学術集会. 東京. 2009. 5. 27

6.石井陽祐, 蔵重雄基, 黒瀬智之, 川真田聖一: アルコール飲用がラット下腿筋の運動肥大効果に及ぼす影響. 第 14 回理学療法の医学的基礎研究会学術集会. 東京. 2009. 5. 27

7.蔵重雄基, 石井陽祐, 黒瀬智之, 川真田聖一: 低温刺激と温熱刺激による骨格筋肥大効果の検討. 第 14 回理学療法の医学的基礎研究会学術集会. 東京. 2009. 5. 27

〔図書〕(計 2 件)

1. 理学療法学テキスト 機能障害科学入門 神稜文庫 監修: 千住秀明, 編集: 沖田実: 第 4 章 創傷(p73-88)、第 6 章 腱損傷(p101-113), 2010

2. 理学療法学テキスト 第 IX 巻 物理療法 第 2 版 神稜文庫 監修: 千住秀明, 編集: 沖田実: 2. 物理療法の適応の多い病態の理解 2-2: 組織修復(p38-46), 2009

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

黒瀬 智之(TOMOYUKI KUROSE)

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