

博士論文

創傷治癒と酸素環境

～創傷酸素分圧可変モデルの開発と応用～

佐野仁美

## 目次

表紙	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p. 1
目次	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p. 2
要旨	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p. 3
序文	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p. 4-8
方法	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p. 8-14
結果	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p. 14-24
考察	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p. 25-27
結論	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p. 28
謝辞	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p. 29
引用文献	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	p. 30-38

## 要旨

創傷局所の酸素分圧可変モデルを開発し酸素環境が治癒過程に及ぼす影響を検証した。正常および糖尿病マウスの背部両側に皮膚欠損創を作成し、酸素不透過膜(低酸素環境)、酸素透過膜(大気圧酸素環境)で被覆した。創表面酸素分圧および創面積の測定・組織学的検討を行った。その結果、正常マウスでは低酸素環境で高い血管密度を認めたが、創縮小と肉芽形成は遅延した。糖尿病マウスでは低酸素環境で血管密度は低く、創縮小と肉芽形成は遅延した。本結果より正常マウスでみられた血管新生の促進は酸素不足を補うための生体適応反応と考えられた。難治性創傷ではこの代償的血管新生が減弱していると考えられた。

## 序文

創傷は、外部からの作用により皮膚・皮下組織および粘膜に解剖学的な非連続性が引き起こされた状態、と定義される。皮膚は、外界から受ける刺激や変化に対して身を守るための防御機能といえる。創傷はこの防御機構が破壊された状態であり、微生物の侵入や恒常性維持の破綻といったリスクを発生させる。これに対する生体の防御・修復反応が創傷治癒である。

創傷は出血凝固期、炎症期、増殖期、癒痕期の過程をたどり治癒する[1-3]。

出血・凝固期は受傷直後～数時間に見られ、その主役は、血小板と血小板より放出される各種サイトカインである。受傷直後、出血を抑えるために一過性の血管収縮が起こると同時に、損傷血管内皮に付着した血小板により凝固・止血系が稼動し、線維化したフィブリンによる血餅が創を一時的に閉鎖する。これに並行し、創内の血小板より血小板由来増殖因子 (platelet derived growth factor: PDGF)、Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、プロスタグランディンなどの生理活性物質が放出され、本格的な創傷修復を開始するために、白血球や線維芽細胞の遊走を刺激し、引き続き炎症期へと移行する[4-6]。炎症期は、受傷数時間～数日に見られ、損傷を受けた組織が本格的な修復を開始するための準備期間であり、その主役を担うのは白血球を代表とする炎症性細胞で

ある。炎症期にはまず毛細血管の拡張と透過性亢進により、好中球を主体とした白血球が創内へ遊走する[7][8]。遊走した好中球の主な働きは、殺菌作用と貪食作用である。好中球から放出される好中球プロテアーゼなどの酵素群が、死滅した細胞片・異物・細菌などを分解する。次いで、単球や単球から変化したマクロファージが、分解された細菌や異物を貪食・除去する[9-12]。最後に、マクロファージより遅れて出現したリンパ球の免疫応答反応により細菌・異物が攻撃される[13]。これらに並行し、創内に線維芽細胞が出現する。活性化リンパ球から遊離したリンフォカインが、線維芽細胞の増殖を促進し、肉芽形成など本格的な創傷修復反応である増殖期へと移行する[14]。増殖期は受傷数日～数週間に見られ、血管新生[15-17]、創収縮[18][19]、上皮形成[20]といった組織修復のための一連の反応が進行し、創傷治癒においても特に重要である[21][22]。創閉鎖後は成熟期と呼ばれ、数年かけて ECM 内の再構築が行われ、当初赤く肥厚していた癒痕は、過剰な細胞がアポトーシスすることで赤みや肥厚が減少する[23]。またコラーゲン置換による架橋強化が進み、外力からの抵抗力を増強する[24][25]。最終的には白く平坦な成熟癒痕となる。

創傷治癒はその形態によって、一次治癒、二次治癒、三次治癒に分類される[26]。一次治癒とは、縫合やテーピングなどで創縁を寄せて欠損が最小限にした状態での治癒形態である。癒痕もわずかで短期間で創傷治癒が完結する。二

一次治癒とは、創縁が離開した状態で組織の喪失が生じた場合の治癒形態で、一次治癒に比べて治癒期間は長く、瘢痕はより多く形成される。三次治癒とは、主に感染に伴う創傷に対して一定期間意図的に開放創として処置し、感染がなくなった後に縫合した場合の治癒形態である。本研究では二次治癒を対象とした。

増殖期は上皮化、肉芽形成により欠損部が修復される時期であり、多くの血管新生がおこり治癒に必要な栄養や酸素、細胞が供給され活発に細胞分裂が起こる。低酸素環境では血管新生が促進され[15][25]、サイトカインや血管内皮前駆細胞が動員されること[27]が知られており、低酸素による血管新生促進効果を期待した酸素不透過の創傷被覆材が臨床現場で広く用いられている[25][28]。その一方で、酸素は細胞活動や増殖に不可欠であり、創傷治癒過程において代謝[29]、細胞外マトリックス新生[30][31]、細胞遊走・増殖[30][32]を促進することが知られている。また全身を高濃度酸素で暴露し呼吸による酸素取り込みを図る高圧酸素療法[33]や創傷局所を酸素に暴露する局所酸素療法[34][35]は、難治性創傷治療において高い有効性が示唆されている。低酸素環境、高酸素環境いずれが創傷治癒に至適なのか、創傷治癒における至適酸素環境は不明である。創傷治療において適切な酸素環境は重要課題であるにも関わらず未だに統一した見解が示されていない理由として、これまでの酸素が創傷

に与える影響を検証した研究では、細胞や動物自体を様々な酸素環境に暴露する方法であったため、純粋に被覆下創表面局所の酸素環境の影響を検証することはできなかつたためと考えられる[31][34-43]。

我々は創傷を異なる酸素透過度の膜で被覆することによって、創傷局所に異なる酸素環境を創出できるのではないかと考えた。問題は被覆下創表面の酸素分圧を計測する方法である。酸素分圧測定には一般的に測定部位に針状のプロローベを刺入する方法やコード付きセンサーを装着する測定機器が用いられる。しかし密閉した状態を維持したまま被覆下創傷部にプロローベやセンサーを挿入し酸素分圧を測定することは不可能であった。そこで血管内酸素分圧の測定に用いられるリン光プローブによる光学的測定に着目した。Pd ポルフィリンは励起光の照射によりリン光を発生する[44]。本測定方法はリン光が酸素存在下で減弱することを利用し、発生したリン光の強度・寿命を測定することで酸素分圧を算出する[44-48]。皮膚欠損層に Pd ポルフィリンセンサーを接着した透明膜を貼付し、外側から励起光をあてることで被覆下創傷部の酸素分圧測定が可能となると考えた。研究目的に合致する測定デバイスとして Minisensor Oxygen Meter (Fibox 3, PreSens 社) を導入し、酸素透過度の異なる透明膜を組み合わせることで、創傷局所の酸素分圧可変モデルを開発した。本研究では開発したモデルの有用性を評価し、これを用いて異なる酸素環境が正常創傷および難治性

創傷の治癒過程に及ぼす影響を検証した。

## 方法

埼玉医科大学動物実験委員会の承認のもと(承認番号;454)、日本実験動物学会が提唱する「実験動物に関する方針」に準じて行なった。実験動物は日本クレア社(東京)より入手した。まず実験 1. で開発した創傷酸素分圧可変モデルの有用性を確認し、実験 2. で酸素環境が創傷治癒へ及ぼす影響を検証した。

### 実験 1. 創傷酸素分圧可変モデルの開発

7-9 週齢の ddy マウス 6 匹を対象とした。麻酔器は THE UNIVENTOR 400 (ANESTHESIA<sup>®</sup>: UNITUNIVENTOR 社) を使用し、吸入麻酔はイソフルラン (エスカイン<sup>®</sup>; メルク社) を使用した。ddy マウスに対し、エアー流量 100ml/分のもとイソフルラン濃度 1.5~2.0% で麻酔を維持した。除毛後、顕微鏡観察下に微小外科用手術器具を用いて、背部に左右対称的に直径 8mm の全層皮膚欠損創を作成した。次に異なる創傷酸素環境を創出する目的で、創の一方を酸素透過膜 (ポリメチルペンテン、酸素透過度: 60000-65000ml/m<sup>2</sup>・24hr・1atm、理研テクノ、東京)、もう一方を酸素不透過膜 (ポリ塩化ビニリデン、酸素透過度: 40-90ml/m<sup>2</sup>・



24hr・1atm、旭化成、東京)で被覆した(図1)。直径1cmの穴をあけた粘着テープを用いて、膜を皮膚に固着させた。膜の内側にはPdポルフィリンセンサーを接着した。このPdポルフィリンセンサーにMinisensor Oxygen Meter(Fibox 3、PreSens社)を用いて外側から505nmの励起光をあて、その反射光を解析することで、被覆下創表面の酸素分圧を経時的(被覆後6-8時間、3、5、7日目)に評価した(図2)。あらかじめパイロットスタディとして、大気および純酸素を充填して各膜で被覆したビーカー内の酸素分圧の測定を行い、膜の存在が測定値に影響を与えないことを確認した。

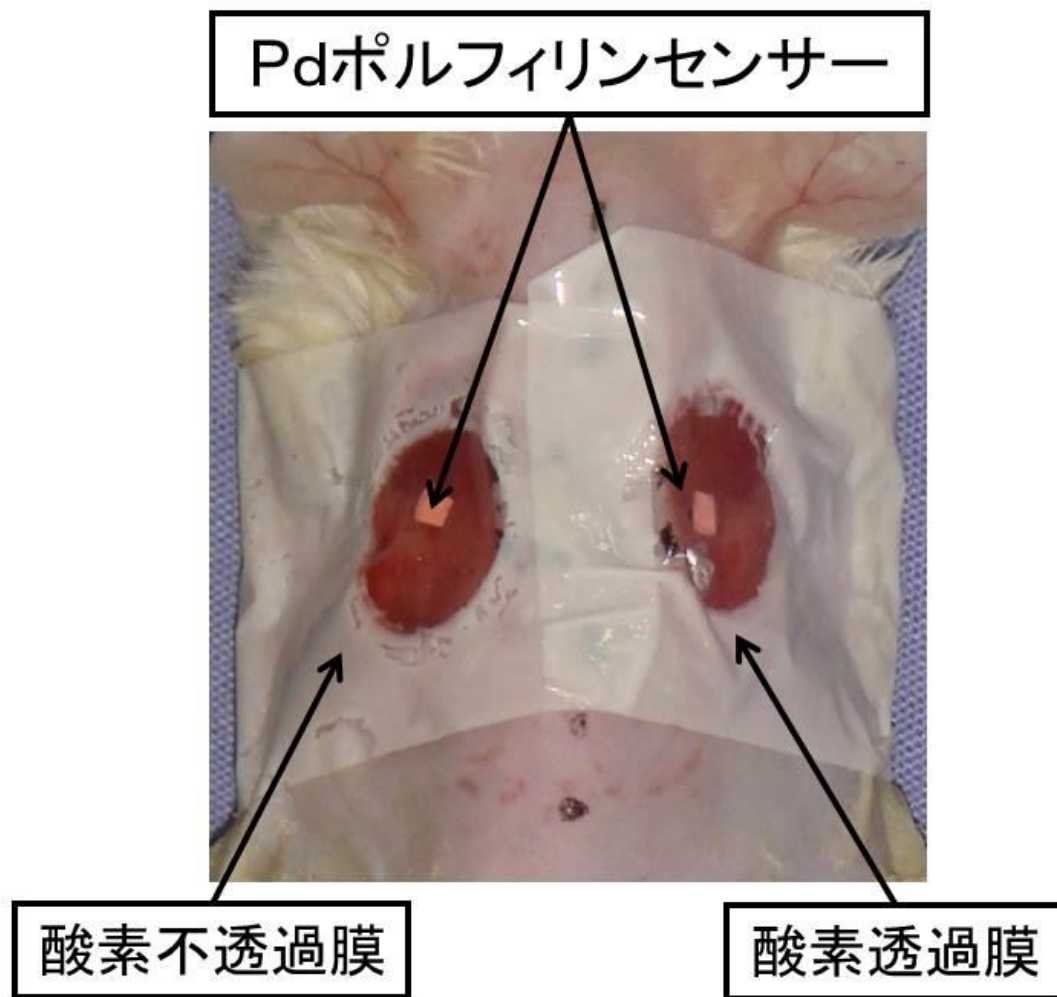


図 1. 実験モデル

ddy マウスの背部に左右対称的に直径 8mm の全層皮膚欠損創を作成した。異なる創傷酸素環境を創出する目的で、創の一方を酸素透過膜、もう一方を酸素不透過膜で被覆した。あらかじめ膜の内側には Pd ポルフィリンセンサーを接着した。

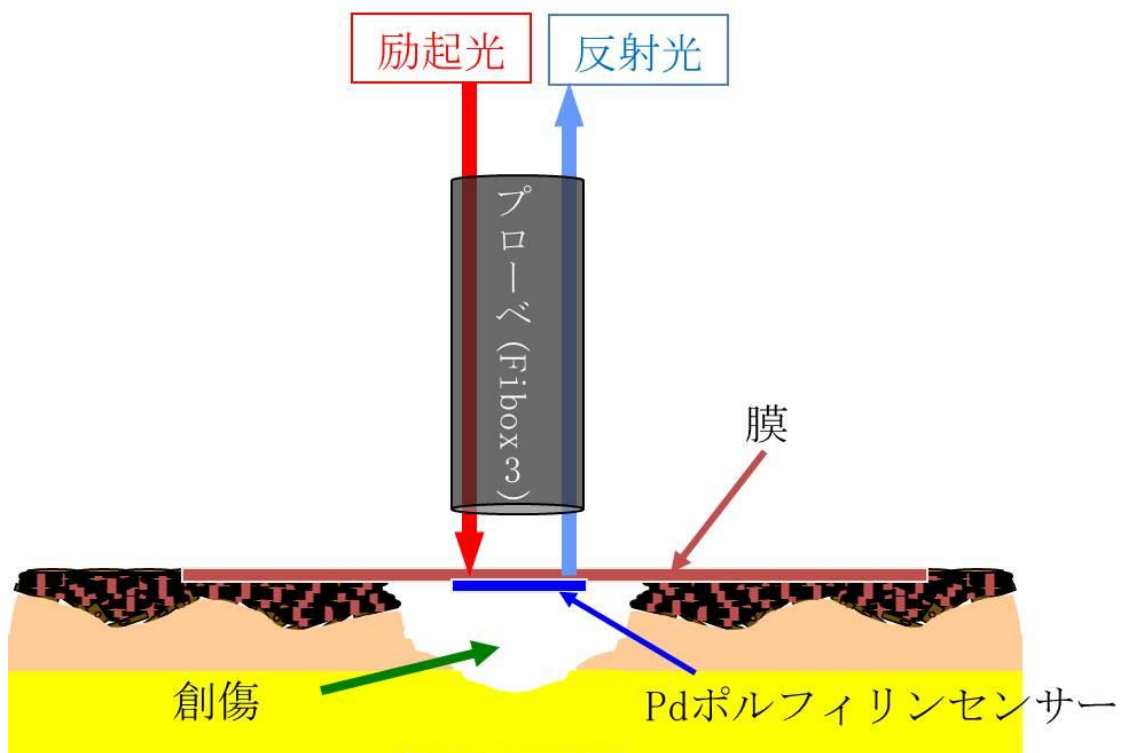


図2. 創表面酸素分圧の測定

このPdポルフィリンセンサーにMinisensor Oxygen Meter (Fibox 3、PreSens社) を用いて膜の外側から励起光をあて、その反射光を解析することで、被覆下創表面の酸素分圧を評価した。

## 実験 2. 酸素環境が創傷治癒へ及ぼす影響の検証

実験 1. で開発した創傷酸素分圧可変モデルを用いて異なる酸素環境が創傷治癒に及ぼす影響を検証した。正常な創傷モデルとして ddy マウス 24 匹を、難治性創傷モデルとして dbdb マウス 24 匹を対象とした。実験 1. と同様にモデルを作成し、創傷面積を経時的(創作成直後、1、3、5、7 日目)に評価した。また 7 日目の組織を採取し、HE 染色および免疫染色 (CD34) を行い、肉芽の厚さおよび肉芽中の血管密度を評価した。

### <創傷面積の評価>

創傷面積は透明フィルム上に創傷をトレースし、スキャナー (ES 10000G<sup>®</sup>: EPSON 社) を用いて取り込み、画像解析ソフト (beta 4.02 version; Scion Corporation、Frederick、MD、USA) を用いて創傷面積を算出した。創傷面積の縮小率 (以下、相対創面積) を (各日目の創傷面積/創傷作成直後の創傷面積) (%) と定義し 1、3、5、7 日目の相対創面積を算出した。

### <組織学的および免疫組織学的検討>

マウスは7日目に屠殺し、創傷をその周辺組織と共に筋層を含めて鋭的に採取した。採取した組織は、ホルマリンフリー溶液 (IHC ZINC fixative、BD

Pharmingen、Tokyo、Japan)にて固定し、パラフィン包埋した。創傷中央部を含む部位を4 $\mu$ mに薄切し、ヘマトキシリンエオジン(H&E)染色した。Win Roof version 5.5 (Mitani Corporation、Japan) softwareを用いて組織画像を得、左右の創縁と創部中央の肉芽の厚さを計測し、その平均値を肉芽の厚さとして算出した。

また同部位の4 $\mu$ mの薄切片を、血管内皮細胞を染色する抗CD34抗体で免疫染色した。免疫染色の手順は以下の通りである。キシレンで脱パラフィン後、1mM、pH8.0のEDTAに検体を浸して500w20分間マイクロウェーブをかけ抗原の賦活化を得た。次にBackground Buster (Innovex bioscience社 product no. NB306-50)を用いて10分間のブロッキングを行った。1次抗体は抗CD34モノクローナル抗体(BD Pharmingen、Tokyo、Japan)を100倍希釈し5 $\mu$ g/mlとして、4 $^{\circ}$ Cに一晩静置した。2次抗体はBiotin標識goat anti-rat IgG (BD Pharmingen、Tokyo、Japan) 10 $\mu$ l/mlを使用し、室温で1時間静置した。その後、horseradish peroxidase/diaminobenzidine (DAB) substrate kit (BD Pharmingen、Tokyo、Japan)を用いて発色反応を行った。最後にヘマトキシリンで2分間浸漬し、核を薄く染めて脱水・透徹・封入した。Win Roof version 5.5 softwareを用いて得られた組織画像よりフォトショップ(Adobe Photoshop、San Jose、CA、USA)を用いて血管内腔と肉芽面積を染色した。染色した画像より画像解析ソフト

(beta 4.02 version; Scion Corporation, Frederick, MD, USA)を用いて血管内腔と肉芽の総面積を測定し、肉芽組織における血管内腔の占める割合を血管密度 ( $\text{mm}^2/\text{mm}^2$ ) として算出した。

#### <統計学的評価>

データは平均値±標準偏差で示した。酸素分圧および創面積の経時的変化の2群間比較には2元配置分散分析を、血管密度や肉芽の厚さの2群間比較にはPaired Student-t testを用いた。統計解析にはSPSS15.0J (IBM, USA)を用いた。P < 0.05で統計学的有意差ありと判断した。

## 結果

### 実験1

創表面酸素分圧を経時的に評価した。その結果、各時点において2群間に有意差が認められた。被覆後数時間から実験終了時まで酸素透過膜で被覆した創傷は100-140mmHgと大気酸素分圧(約150mmHg)に近い酸素分圧(以下、大気圧酸素環境)であったのに対し、酸素不透過膜で被覆した創傷は10-30mmHgと極端な低酸素分圧(以下、低酸素環境)であった。創表面酸素分圧は大気圧酸素環境で、

創傷作成 6-8 時間後、3、5、7 日目：119.3 ± 73.5、112.0 ± 24.6、102.5 ± 46.3、114.1 ± 29.8 mmHg、低酸素環境で、創傷作成 6-8 時間後、3、5、7 日目：39.7 ± 15.8、21.8 ± 16.0、8.25 ± 4.45、5.72 ± 2.99 mmHg であった(図 3)。

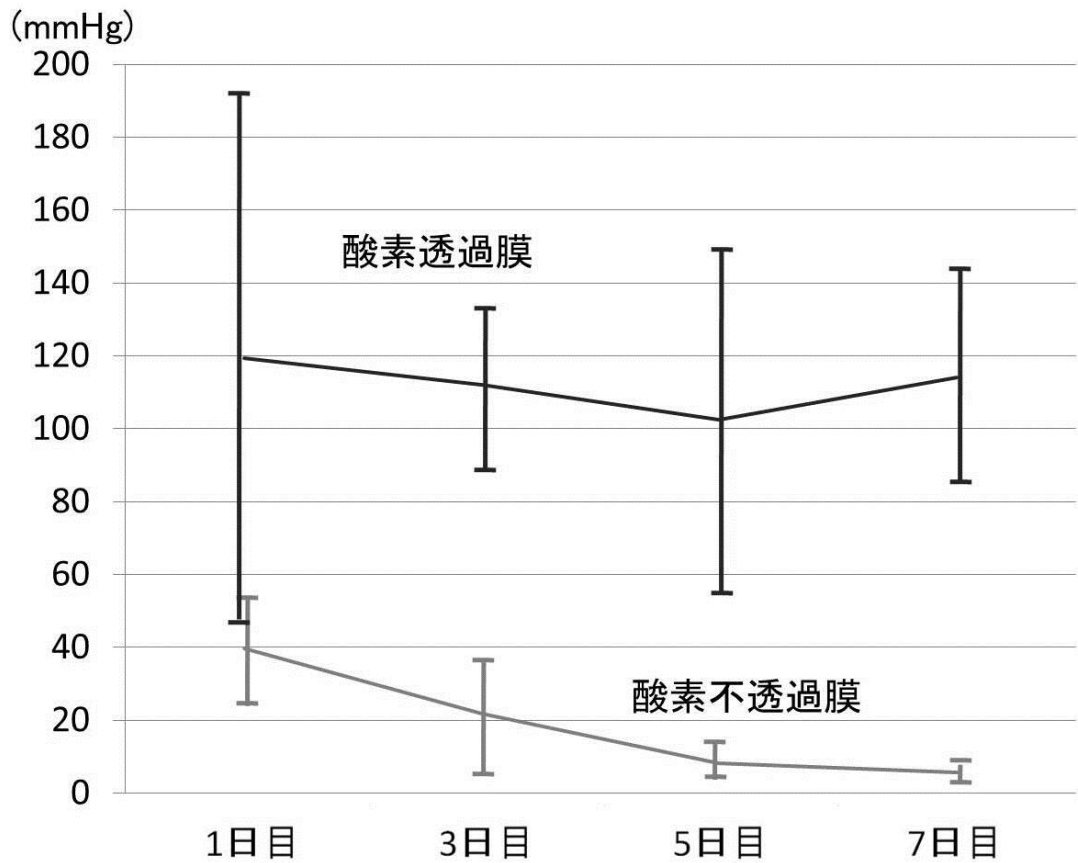


図3 創表面酸素分圧の経時的変化

被覆下創表面の酸素分圧を経時的(被覆後 6-8 時間、3、5、7 日目)に評価した。被覆後数時間から実験終了時まで酸素透過膜で被覆した創は大気酸素分圧に近い酸素分圧であったのに対し、酸素不透過膜で被覆した創は極端な低酸素分圧であった。POD: post operative day。



## 実験 2

創傷作成7日目の肉眼的所見を図4に示す。相対創面積は低値でより強い創縮小を示す。

正常マウスでは、低酸素環境と比較して大気圧酸素環境でより低い相対創面積を認め、その差は創作成後5、7日目で有意であった ( $p < 0.01$ ) (図5A)。低酸素環境の相対創面積は創傷作成後1、3、5、7日目 :  $68.6 \pm 8.28$ 、 $56.0 \pm 6.41$ 、 $37.1 \pm 3.45$ 、and  $27.6 \pm 3.47\%$ 、大気圧酸素環境では $73.5 \pm 14.3$ 、 $38.1 \pm 10.8$ 、 $15.4 \pm 2.03$ 、and  $11.1 \pm 1.66\%$ であった (図5A)。低酸素環境と比較して大気圧酸素環境で有意に厚い肉芽形成を認めた。(低酸素環境vs. 大気圧酸素環境 :  $295.3 \pm 180.9$  vs.  $491.8 \pm 243.2 \mu\text{m}$ 、 $p < 0.01$ ) (図6A、7A)。大気圧酸素環境と比較して低酸素環境で有意に高い血管密度を認めた(低酸素環境vs. 大気圧酸素環境:  $0.046 \pm 0.025$  vs.  $0.011 \pm 0.008\text{mm}^2/\text{mm}^2$ 、 $p < 0.01$ ) (図8A、9A)。

糖尿病マウスでは、大気圧酸素群では低酸素環境と比較して創面積の縮小が早く、その差は創作成後3、5、7日目で有意であった ( $p < 0.01$ ) (図5B)。低酸素環境の相対創面積は創傷作成後1、3、5、7日目 :  $84.8 \pm 9.41$ 、 $83.1 \pm 8.02$ 、 $66.3 \pm 14.3$  and  $34.1 \pm 4.98\%$ 、大気圧酸素環境では $83.3 \pm 5.84$ 、 $71.4 \pm 8.19$ 、 $50.8 \pm 8.36$  and  $20.7 \pm 3.64\%$ であった (図5B)。低酸素環境と比

較して大気圧酸素環境で有意に厚い肉芽形成を認めた。(低酸素環境vs. 大気圧酸素環境 :  $128.7 \pm 42.4$  vs.  $225.7 \pm 54.7 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.01$ ) (図6B、7B)。低酸素環境では大気圧酸素環境と比較して、血管密度では有意差を認めなかった(低酸素環境vs. 大気圧酸素環境 :  $0.038 \pm 0.017$  vs.  $0.046 \pm 0.022 \text{mm}^2/\text{mm}^2$ 、 $p = 0.80$ ) (図8B、9B)。

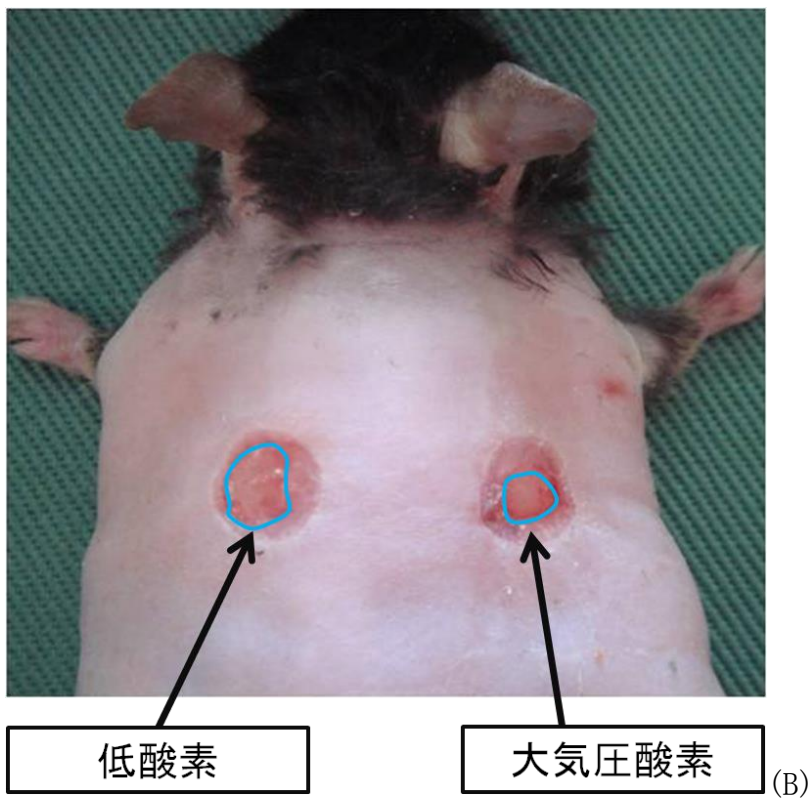
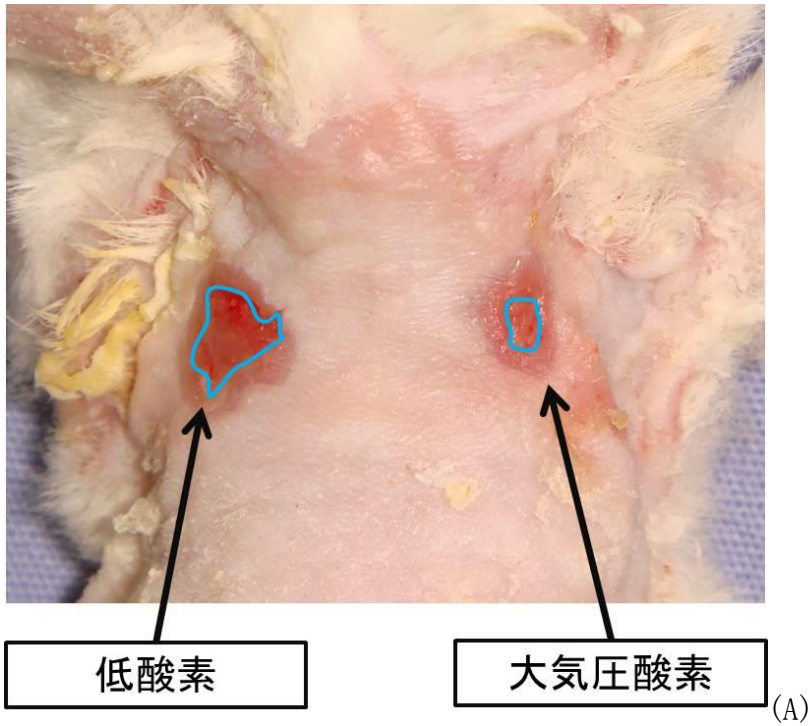
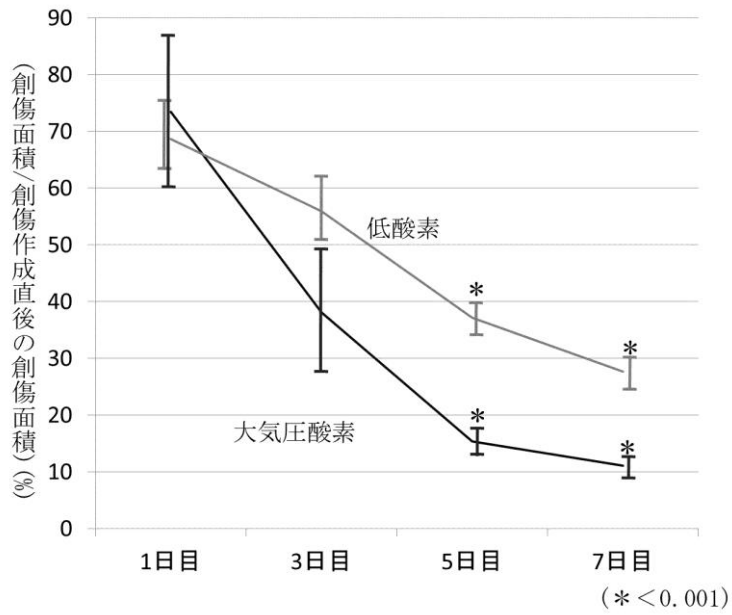
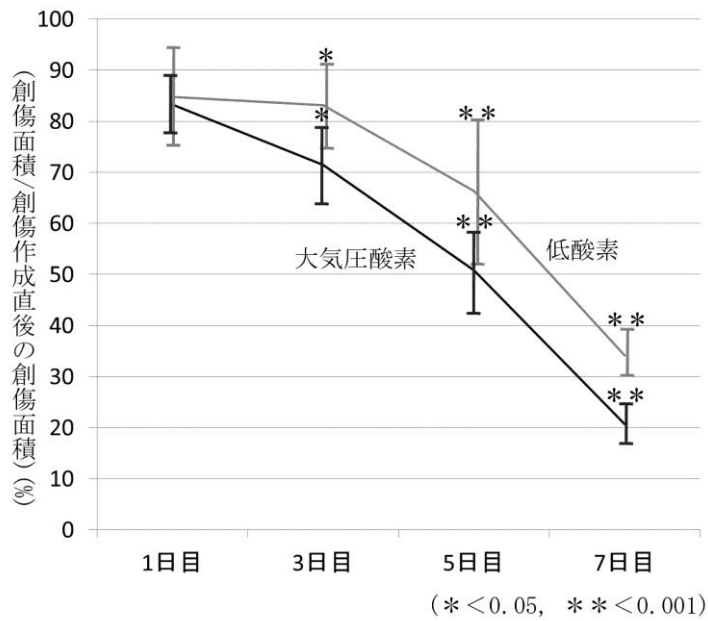


図4. 創傷作成後7日目の肉眼的所見

正常マウス(A)糖尿病マウス(B)いずれも低酸素環境と比較して、大気圧酸素環境でより創縮小を認める。



(A)



(B)

図5. 相対創面積の経時的変化 (N=24)

(A) 正常マウスでは、低酸素環境と比較して大気圧酸素環境でより縮小を認め、その差は創作成後5、7日目で有意であった。

(B) 糖尿病マウスでも、低酸素環境と比較して大気圧酸素環境でより縮小を認め、その差は創作成後3、5、7日目で有意であった。

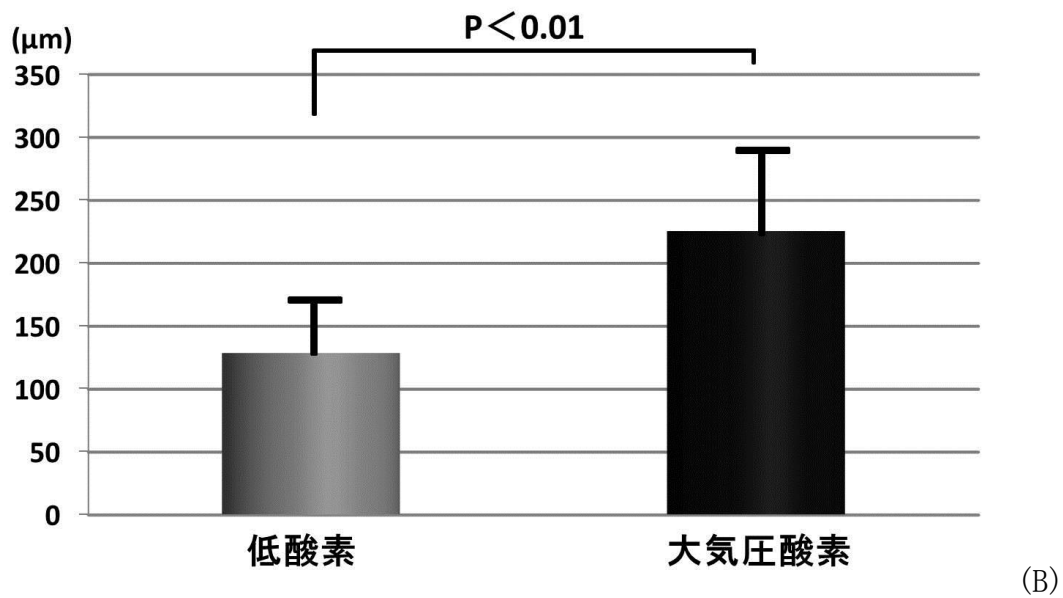
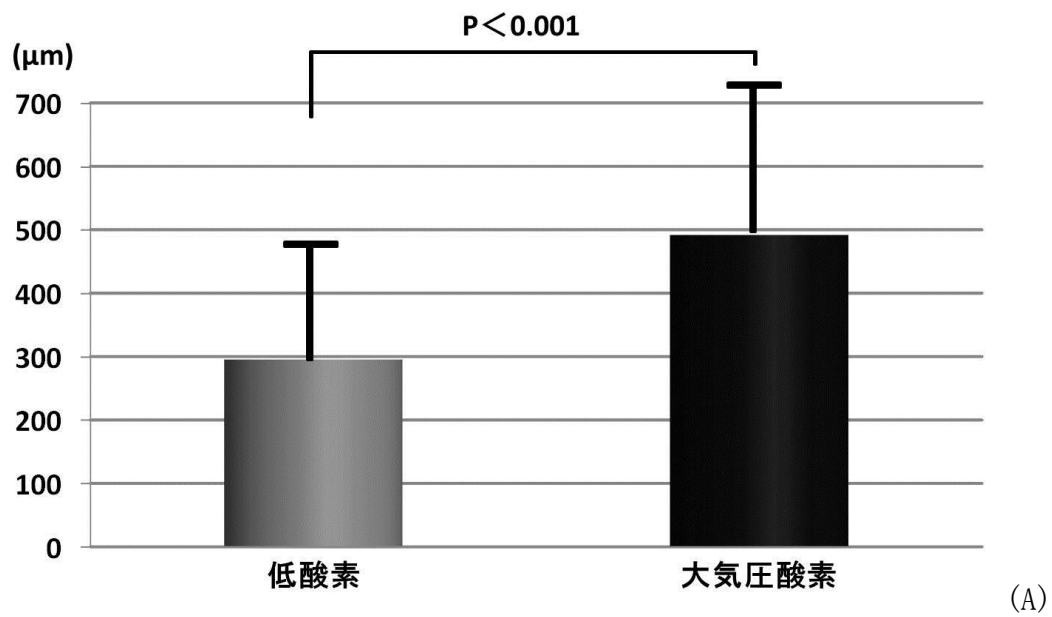
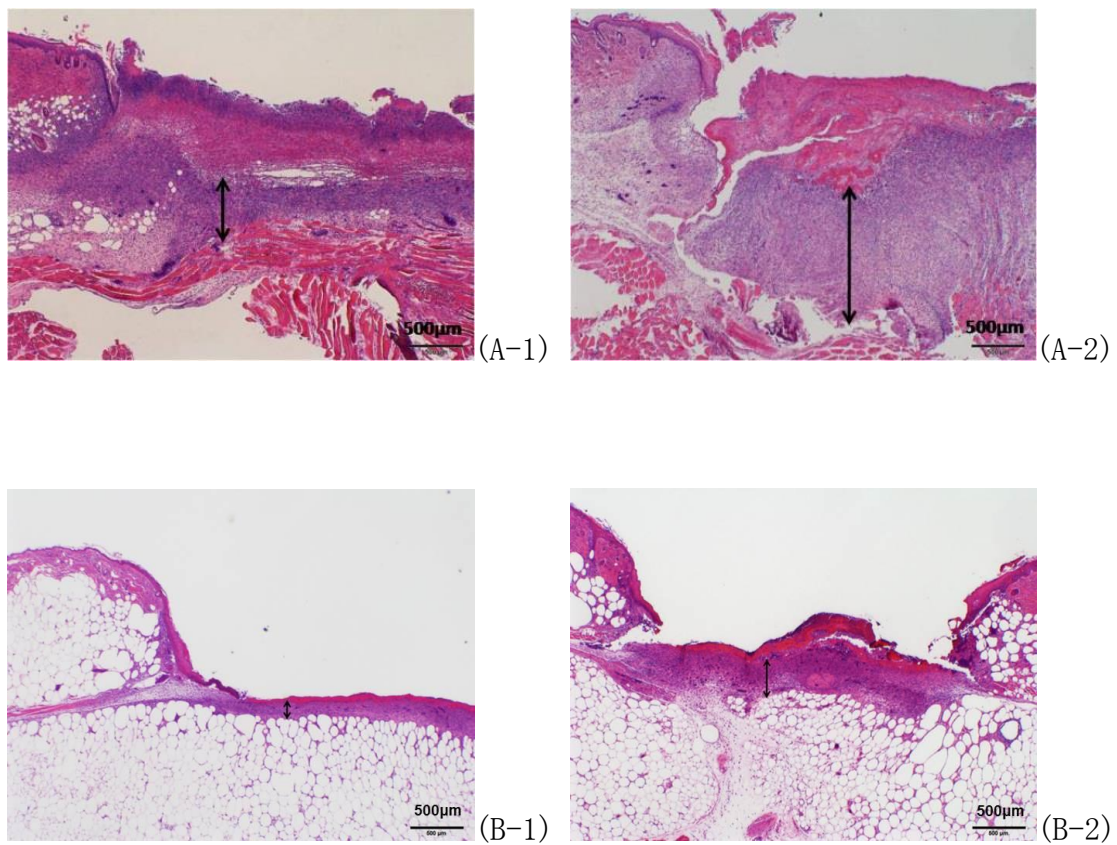


図 6. 創作成後 7 日目の肉芽の厚さ (N=6)

正常マウス (A) および糖尿病マウス (B) で、低酸素環境と比較して大気圧酸素環境で有意に厚い肉芽組織を認めた。



### 図7. 創傷作成後7日目のHE染色所見

正常マウスでは低酸素環境(A-1)と比較して大気圧酸素環境(A-2)で有意に厚い肉芽形成を認めた。糖尿病マウスでも同様に低酸素環境(B-1)と比較して大気圧酸素環境(B-2)で有意に厚い肉芽形成を認めた。

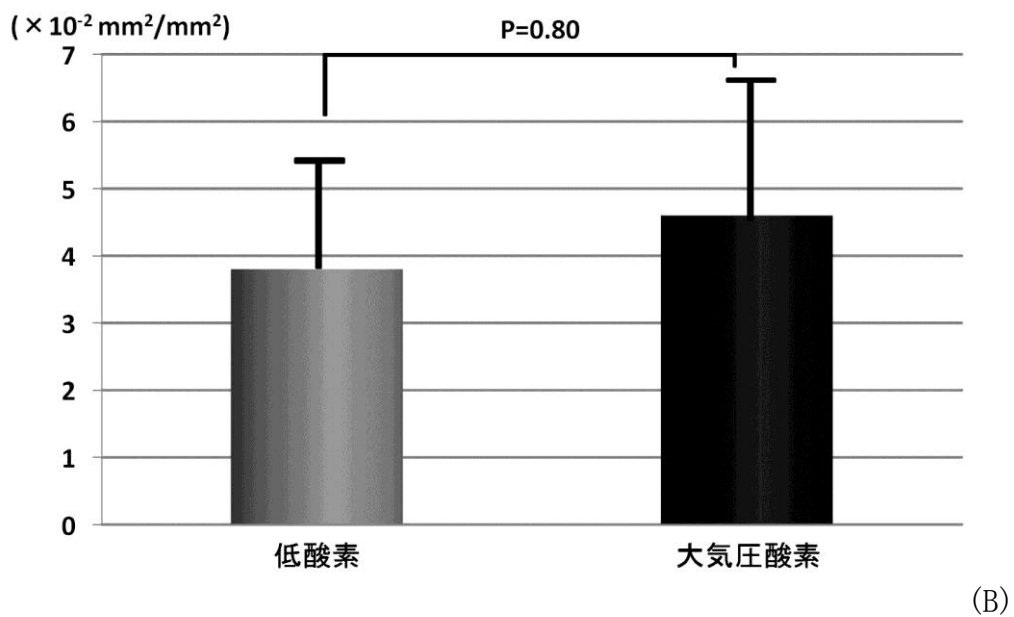
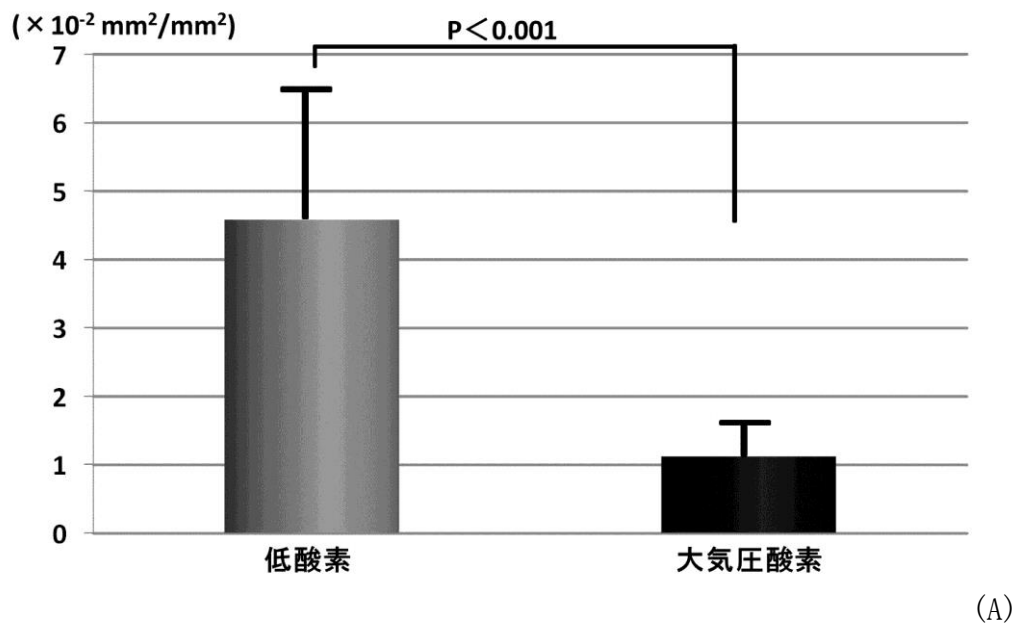


図 8. 創傷作成後 7 日目の血管密度 (N=6)

正常マウス (A) では大気圧酸素環境と比較して低酸素環境で有意に高い血管密度を認めたが、糖尿病マウス (B) では両者に有意差はなく、大気圧酸素環境でやや高い血管密度を認めた。

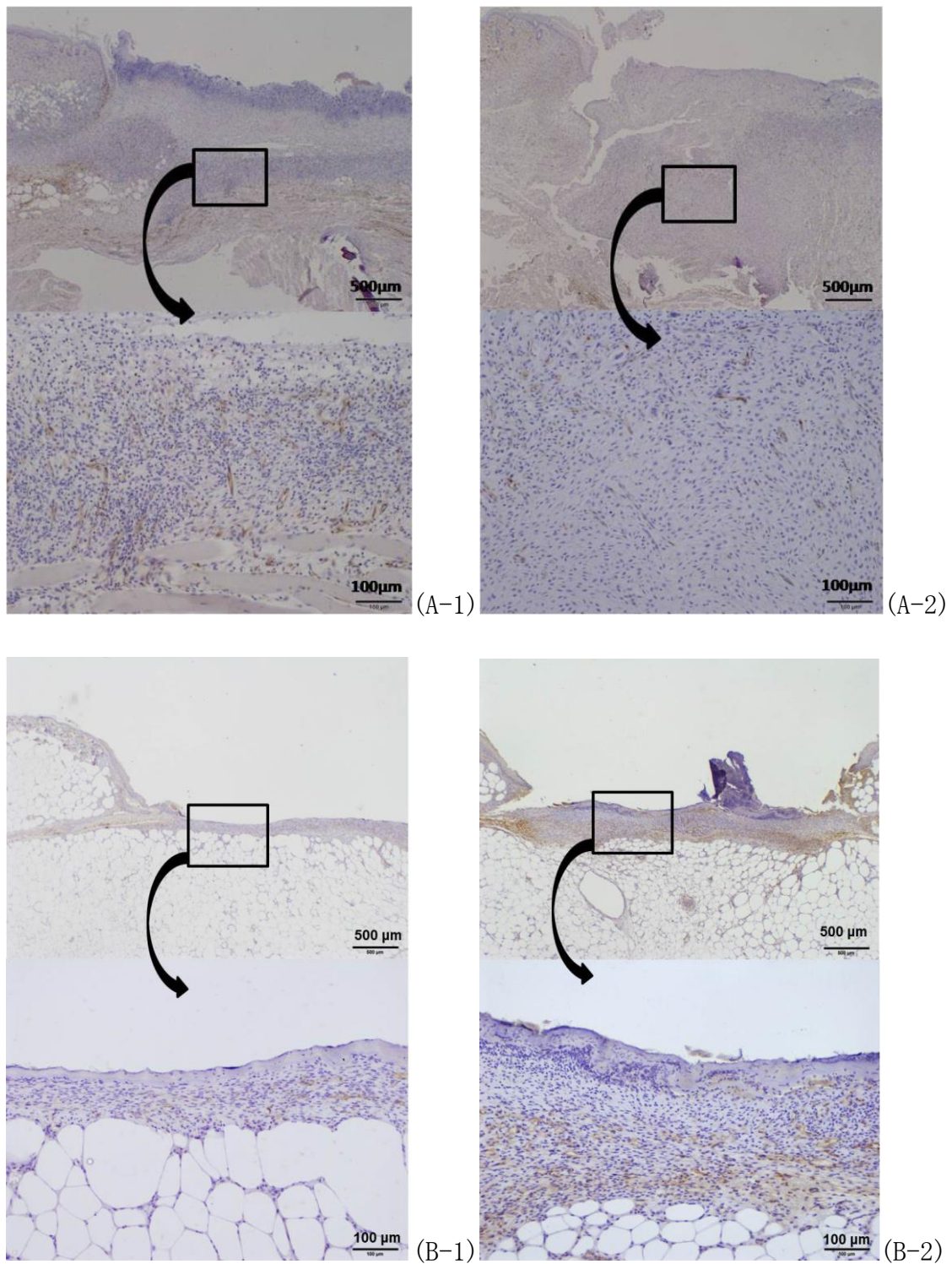


図 9. 創傷作成後 7 日目の免疫染色 (CD34) 所見

免疫染色を用いて血管密度を評価した。正常マウスでは大気圧酸素環境 (A-2) と比較して低酸素環境 (A-1) でより高い血管密度を認めた。糖尿病マウスでは両者に有意差はなく、低酸素環境 (B-1) と比較して大気圧酸素環境 (B-2) でやや高い血管密度を認めた。



## 考察

これまでの創傷と酸素環境に関する *vitro* の研究では創傷治癒に関わる個々の細胞増殖に最適な酸素環境を検証した報告[36-38]はあるが、創傷治癒には多種多様な細胞やサイトカインが関与しているため研究結果をそのまま生体創傷における至適酸素環境としてあてはめることはできない。*Vivo* の研究では、実験動物そのものを低酸素環境や高酸素環境に暴露して検証した報告[39][40]があるが、呼吸による酸素取り込みが強く影響するため、純粋な創周囲の酸素環境を評価したモデルとは言えない。また創傷局所に直接酸素を投与したり、酸素不透過膜で低酸素環境を創出して創傷治癒動態を検証した報告[31][34][35][39][41]もあるが、創表面の酸素濃度を測定しておらず評価不十分と言える。創傷治療において酸素環境設計は重要な課題にも関わらず、酸素環境が創傷局所に与える影響や至適酸素環境を検証した報告はない。この理由は創表面の酸素環境のみを変化し得る有用なモデルが欠如しているためと考えられる。これは被覆下の酸素分圧のみを変化させ測定する方法がなかったためと考えられる。今回我々は酸素透過膜、酸素不透過膜で創傷を被覆することで、大気圧酸素環境、低酸素環境を作成し得た。またリン光プローブによる光学的測定を利用した独自の実験モデルの開発により、被覆下創表面の酸素分圧の評

価が可能であった。しかし本研究で用いた被覆膜は液体の水分は透過させないが、水蒸気の透過性については評価の対象としていない。実験時肉眼的にすべての創が乾燥状態でないことは確認しているが、厳密に創傷面周囲の湿度の違いが治癒に及ぼす影響については今後の課題といえる。

酸素は生命活動に必須の要素であり、創傷治癒においても線維芽細胞増殖[49]やコラーゲンの産すべて生[31][32][34][35][50]、血管新生[34][51]など様々な過程で関与している。正常な皮膚において角質層は大気からの気体取り込みを防止している。近年、角質が破壊された創傷では、大気からの拡散によって創傷深部まで酸素が取り込まれることが明らかにされている[34][52][53]。このため創傷治癒過程には大気と血液を介した酸素供給が影響を与える。

酸素は上皮化を促進することが告されている[34][35]。局所酸素投与が豚の全層皮膚欠損創[34]やウサギの虚血耳モデル[35]の創傷治癒を促進させることが報告されている。本研究結果でも正常マウス、糖尿病マウスの両方において大気圧酸素環境でより早い創縮小が認められ、創傷の早期閉鎖に向けては酸素透過性ドレッシングがより望ましいと考えられた。

肉芽組織は新生血管、細胞、細胞外マトリックスより成る。コラーゲンは全身のタンパク質の約 30%を占める最も多いタンパク質であり、肉芽組織の細胞外マトリックスの主な構成成分である。コラーゲン産生や置換には大量の酸素

を必要とする[31][32][54]。Niinikoski らの報告によると 50%酸素環境では大気圧酸素環境と比較して 25%創傷の抗張力が上昇したことを報告した[32]。この他にもウサギの創傷局所に酸素投与するとコラーゲン置換が促進されること[31]、外科手術後の貧血患者に酸素投与すると創傷の抗張力が3倍であった[50]ことが報告されている。本実験では正常マウス、糖尿病マウスの両方において大気圧環境群が低酸素環境群よりも厚い肉芽組織が形成された。臨床において骨や腱の露出創を二次治癒に誘導する際や植皮術の移植床を準備する時にはより速やかに厚い肉芽組織の増生が望まれる。この点においても酸素透過性ドレッシングのほうが有利であることが示唆されたと考える。

その一方で低酸素が血管新生を促進することが報告されている[25][43]。

Knightonらはウサギの創傷モデルを用いて低酸素が創傷治癒における血管新生を促進することを示した[25]。ハイドロコロイド製剤も同様の低酸素効果によって血管新生を促進することが報告されている[43]。これらの報告は臨床において酸素不透過の創傷被覆材が最適であると結論づけている。このように十分な酸素供給が有用であるとの報告と低酸素環境が有用であるとの相反する見解があり、創傷治癒に最適な酸素環境の見解は一致していない。

本研究モデルでは、低酸素環境で血管新生が促進されたが創縮小や肉芽形成が遅延した。低酸素環境では、大気からの酸素供給が障害され、大気圧酸素環

境と比較して酸素不足の状態にあると考えられる。このため低酸素環境における血管新生の促進は酸素不足を補うための生体適応反応と考えられ、臨床においては酸素透過性の創傷被覆材が望ましいことが示唆された。また糖尿病マウスを用いた難治性創傷モデルでは低酸素環境と大気圧酸素環境で血管密度に有意差はなく、大気圧酸素環境でやや高い血管密度を認めた。これより難治性創傷モデルでは、この代償的血管新生が減弱していると考えられた。臨床現場で治療に難渋する難治性創傷では、不適切な治療が治癒の遷延・増悪ひいては下肢切断に直結しかねない。本研究結果は汎用されている酸素不透過の創傷被覆材が逆効果となる可能性を示唆しており、その使用に警鐘をならすものである。

## 結論

酸素透過膜、酸素不透過膜で創傷を被覆することで、大気圧酸素環境、低酸素環境を作成し得た。リン光プローブによる光学的測定を利用した独自の実験モデルの開発により、被覆下創表面の酸素分圧の評価が可能であった。正常マウスでは低酸素環境において血管新生が促進されたが創縮小や肉芽形成が遅延したことより、血管新生の促進は酸素不足を補うための生体適応反応と考えられ、臨床においては酸素透過性の創傷被覆材が望ましいと考えられた。

## 謝辞

実験のご指導を頂いた埼玉医科大学形成外科教授 市岡滋先生、東京大学大学院医学系研究科形成外科教授 光嶋勲先生に深謝する。

## 引用文献

1. Falabella AF, Falanga V. Wound healing. In: Frienkel R, Woodley DT, editors. The biology of the skin. New York: The Pathenon Publishing Group; 281-297, 2001.
2. Tobin GR. Wound repair: biologic foundations and clinical considerations. In: Richardson JD, Polk HC Jr, Flint LM Jr (eds). Trauma: Clinical Care and Pathophysiology. Chicago, IL: Yearbook Medical Publishers. 213-216, 1987.
3. Howes S, Harry SC. Healing of wounds as determined by their tensile strength. JAMA. 92:42, 1929.
4. Werner S, Grose R: Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev. 83:835-870, 2003.
5. Weeks JR. Prostaglandins. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 12:317-336, 1972.
6. Steed DL. The role of growth factors in wound healing. Surg Clin North Am. 77:575-586, 1997.
7. Miles AA, Miles EM, Burke JF. The value and duration of defense reactions of the skin to the primary lodgment of bacteria. Br J Exp Pathol.

- 38:575-586, 1957.
8. Martin P: Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 276:75-81, 1997.
  9. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*. 31:674-686, 2005.
  10. Pull SL, Doherty JM, Mills JC, Gordon JI, Stappenbeck TS. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:99-104, 2005
  11. Newman SL, Henson JE, Henson PM. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J Exp Med*. 156:430-442, 1982
  12. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 78:71-100, 1975.
  13. Wahl SM, Wahl LM, McCarthy JB. Lymphocyte-mediated activation of fibroblast and proliferation and collagen production. *J Immunol*. 121:942-946, 1978.

14. Dielgelmann RF, Cohen IK, Kaplan AM. The role of macrophages in wound repair: a review. *Plastic Reconstr Surg.* 68:107–113, 1981.
15. Alexopoulou AN, Multhaupt HA, Couchman JR. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:505–528, 2007.
16. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen.* 17:153–162, 2009.
17. Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res.* 304:274–286, 2005.
18. Gabbiani G, Ryan GB, Manjino G. Presense of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia.* 27:549–550, 1971.
19. Montandon D, D' Andiran G, Gabbiani G. The mechanism of wound contraction and epithelialization: clinical and experimental studies. *Clin Plast Surg.* 4:325–346, 1977.
20. Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res.* 304:274–286, 2005.
21. Robinson JB, Friedman RM. Wound healing and closure, abnormal scars,



- tattoos, envenomation, and extravasation injuries. Selected Readings  
Plast Surg. 8:1-36, 1995.
22. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders. N Engl J Med. 1979;301:13-23.
23. Madden JW, Peacock EE Jr. Studies on the biology of collagen in wound healing. I. Rate of collagen synthesis and deposition in cutaneous wounds of the rat. Surgery. 64:288-294, 1968.
24. Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. Int J Biochem Cell Biol. 29:5-17, 1997.
25. Knighton DR, Silver IA, Hunt. TK Regulation of wound-healing angiogenesis—effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. Surgery. 90:262-270, 1981.
26. Paul Price. Wound healing, sutures, needles, and stapling devices. In: Price Paul, Frey Kevin B, Junge Teri L (eds). Surgical Technology for the Surgical Technologist : A Positive Care Approach (2<sup>nd</sup>). 291-316, 2003.
27. Semenza GL. Vascular responses to hypoxia and ischemia. Arterioscler

- Thromb Vasc Biol. 30:648-652, 2010.
28. Alvarez OM, Mertz PM, Eaglstein WH. The effect of occlusive dressings on collagen synthesis and re-epithelialization in superficial wounds. J Surg Res. 35:142-148, 1983.
29. Hunt TK, Zederfeldt B, Goldstick TK. Oxygen and healing. Am J Surg. 118:521-525, 1969.
30. Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P. Oxygen in acute and chronic wound healing. Br J Dermatol. 163:257-268, 2010.
31. Hunt TK, Pai MP. The effect of varying ambient oxygen tension on wound metabolism and collagen synthesis. Surg Gynecol Obstet. 135:561-567, 1972.
32. Niinikoski J. Effect of oxygen supply on wound healing and formation of experimental granulation tissue. Acta Physiol Scand Suppl. 334:1-72, 1969.
33. Warriner RA 3rd, Hopf HW. The effect of hyperbaric oxygen in the enhancement of healing in selected problem wounds. Undersea Hyperb Med. 39:923-935, 2012.

34. Fries RB, Wallace WA, Roy S, Kuppusamy P, Bergdall V, Gordillo GM, Melvin WS, Sen CK. Dermal excisional wound healing in pigs following treatment with topically applied pure oxygen. *Mutat Res.* 579:172-181, 2005.
35. Said HK, Hijjawi J, Roy N, Mogford J, Mustoe T. Transdermal sustained-delivery oxygen improves epithelial healing in a rabbit ear wound model. *Arch Surg.* 140:998-1004, 2005.
36. Knighton DR, Hunt TK, Scheuenstuhl H, Halliday BJ, Werb Z, Banda MJ. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science.* 221:1283-1285, 1983.
37. Pentland AP, Marcelo CL. Modulation of proliferation in epidermal keratinocyte cultures by lowered oxygen tension. *Exp Cell Res.* 145:31-43, 1983.
38. Dimitrijevič SD, Paranjape S, Wilson JR, Gracy RW, Mills JG. Effect of hyperbaric oxygen on human skin cells in culture and in human dermal and skin equivalents. *Wound Repair Regen.* 7:53-64, 1999.
39. Kivisaari J, Vihersaari T, Renvall S, Niinikoski J. Energy metabolism of experimental wounds at various oxygen environments. *Ann Surg.* 181:823-828, 1975.

40. Niinikoski J, Hunt TK, Dunphy JE. Oxygen supply in healing tissue. *Am J Surg.* 123:247-252, 1972.
41. Hohn DC, MacKay RD, Halliday B, Hunt TK. Effect of O<sub>2</sub> tension on microbicidal function of leukocytes in wounds and in vitro. *Surg Forum.* 27:18-20, 1976.
42. Asmis R, Qiao M, Zhao Q. Low flow oxygenation of full-excisional skin wounds on diabetic mice improves wound healing by accelerating wound closure and reepithelialization. *Int Wound J.* 7:349-357, 2010.
43. Cherry GW, Ryan TJ. Enhanced wound angiogenesis with a new hydrocolloid dressing. In: Ryan TJ editor. *An Environment for Healing: The Role of Occlusion.* Royal Society of Medicine International Congress and Symposium Series No. 88: Royal Society of Medicine. 61-68, 1984.
44. Shibata M, Ichioka S, Ando J, Kamiya A. Microvascular and interstitial P<sub>O</sub>(2) measurements in rat skeletal muscle by phosphorescence quenching. *J Appl Physiol.* 91:321-327, 2001.
45. Shibata M, Ichioka S, Kamiya A. Estimating oxygen consumption rates of arteriolar walls under physiological conditions in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289:295-300, 2005.

46. Shibata M, Ichioka S, Ando J, Togawa T, Kamiya A. Nonlinear regulation of capillary perfusion in relation to ambient  $pO_2$  changes in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* 94:352-355, 2005.
47. Shibata M, Qin K, Ichioka S, Kamiya A. Vascular wall energetics in arterioles during nitric oxide-dependent and -independent vasodilation. *J Appl Physiol.* 100:1793-1798, 2006.
48. Shibata M, Ichioka S, Togawa T, Kamiya A. Arterioles' contribution to oxygen supply to the skeletal muscles at rest. *Eur J Appl Physiol.* 97:327-331, 2006.
49. Brismar K, Lind F, Kratz G. Dose-dependent hyperbaric oxygen stimulation of human fibroblast proliferation. *Wound Repair Regen.* 5:147-150, 1997.
50. Jonsson K, Jensen JA, Goodson WH 3rd, Scheuenstuhl H, West J, Hopf HW, Hunt TK. Tissue oxygenation, anemia, and perfusion in relation to wound healing in surgical patients. *Ann Surg.* 214:605-613, 1991.
51. Gordillo GM, Roy S, Khanna S, Schlanger R, Khandelwal S, Phillips G, Sen CK. Topical oxygen therapy induces vascular endothelial growth factor expression and improves closure of clinically presented chronic wounds. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 35:957-964, 2008.

52. Sutter CH, Laughner E, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. Proc Natl Acad Sci U S A. 97:4748-4753, 2000.
53. Heise HM, Lampen P, Stücker M. Reflectance spectroscopy can quantify cutaneous haemoglobin oxygenation by oxygen uptake from the atmosphere after epidermal barrier disruption. Skin Res Technol. 9:295-298, 2003.
54. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). N Engl J Med 301:13-23, 1979.