

ラット背部皮弁の生着に及ぼす ブクラデシンナトリウム軟膏の影響

奈良県立医科大学皮膚科形成外科診療班

大野 治彦, 波床 光男, 多田 百合恵,
桑原 理充, 柴 亜伊子, 多田 英之, 岡崎 正

奈良県立医科大学皮膚科学教室

村松 勉, 白井 利彦

THE EFFECT OF DIBUTYRYL CYCLIC AMP OINTMENT ON RAT DORSAL SKIN FLAP SURVIVAL

HARUHIKO OHNO, MITSUO HATOKO, YURIE TADA,
MASAMITSU KUWAHARA, AIKO SHIBA, HIDEYUKI TADA and TADASHI OKAZAKI
Division of Plastic Surgery ; Department of Dermatology, Nara Medical University

TSUTOMU MURAMATSU and TOSHIHIKO SHIRAI
Department of Dermatology, Nara Medical University

Received

Abstract : Dibutyl cyclic AMP (DBcAMP) ointment has a possibility of successfully increasing flap survival through its pharmacological effects. In this study, the authors investigated the effect of DBcAMP ointment (containing 3 %, 5 %, 7 % DBcAMP) on flap survival, and measured biochemical products (lactate, nor-adrenalin, creatine kinase and lactate dehydrogenase) in the flap tissue using rat dorsal skin flap. The mean length of the surviving flaps in the animals receiving 5 % DBcAMP was longer than those in other animal groups. In all portions of the flap, the mean level of lactate in the tissues of the rats receiving 5 % DBcAMP was lower than those in other groups. Thus, use of the ointment containing an appropriate dose of DBcAMP may successfully enhance flap survival. The fact that the length of surviving flap was negatively correlated with the quantity of lactate in the flap tissues suggests that DBcAMP ointment might increase local blood circulation in the flap.

Index Terms

DBcAMP, flap survival, biochemistry

はじめに

ブクラデシンナトリウム軟膏は、局所血流改善作用・血管新生作用・肉芽形成促進作用・表皮形成促進作用を

有する¹⁻³⁾ことから、皮膚潰瘍などの治療薬として、汎用されている外用剤である。皮弁内の血流を良好に保つことは、皮弁の生着率を向上させるうえで最も重要な因子であると考えられ、本剤の持つ薬理作用は、皮弁の生着

に対しても好影響を及ぼすことが予想される。今回、我々は、ラット背部皮弁を用いて、ブクラデシンナトリウム軟膏の皮弁生着に及ぼす影響を皮弁生着率と皮弁組織内の生化学的変動の両面から検討し、若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

1. 皮弁の作製

8週齢雄、wister系ラットをネブタールの腹腔内投与(0.1 ml/100 g)にて麻酔し、背部を剃毛した。尾側を基部とする2×7 cmの皮弁を挙上し、挙上後4-0ナイロン糸を用いて1 cm間隔で元の位置に縫合した(Fig. 1)。

2. 軟膏の外用

ブクラデシンナトリウムの原末(第一製薬、東京)をマグコロール軟膏と混合しブクラデシンナトリウム含有軟膏を作製した。軟膏の濃度は、3%、5%、7%とし、使用直前に調整した。コントロールとしては基剤のみを用いた。軟膏の外用は、各群とも皮弁作製直後・24時間後・48時間後の3回、各々1gをへらを用いて皮弁上に均

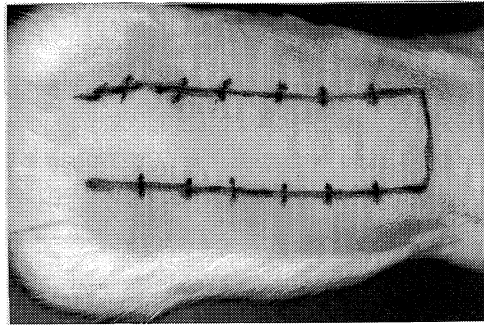


Fig. 1. Caudally based dorsal skin flap, 2×7 cm sized, were raised and sutured back at 1 cm intervals.

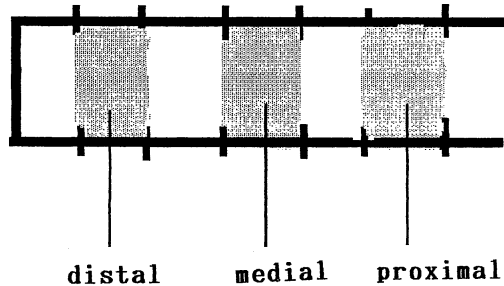


Fig. 2. Skin biopsy were made from these three portions of the flap. Then lactate, nor-adrenaldin, CPK and LDH in those tissues were quantitated.

Solution A; 4%EDTA
Solution B; 4N perchloric acid: 10% ascorbic acid: distilled water=1:1:6
sampling buffer; solution A: solution B=1:4

Table 1. Composition of the sampling buffer.

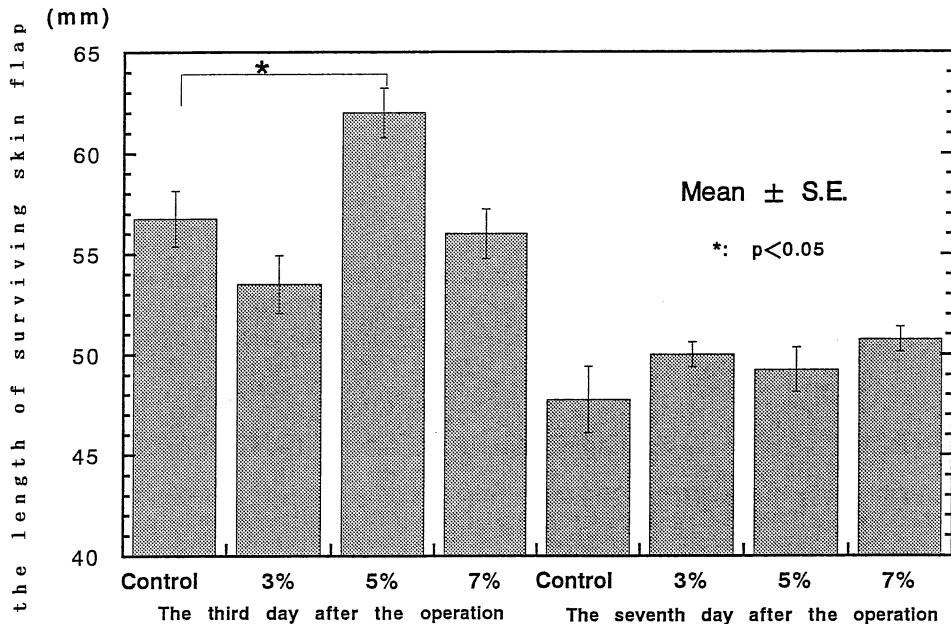


Fig. 3. Survival-length on the third day and seventh day after the operation.

等に塗布した。

3. 皮弁生着率の判定

皮弁生着率の判定は、皮弁挙上後3日目と7日目の2群に分けて、生着した皮弁の基部からの長さを肉眼的に測定することにより行なった。また、皮弁の生着部と壊死部との境界が不整形の場合は、その遠位端と近位端と

の中央までの長さとした。なお、dye distanceの測定は行なわなかった。

4. 皮弁組織の採取及び生化学的検討

皮弁作製後3日目にエーテルを用いてラットを屠殺した後、皮弁の尾側より1cmから2cmまでを近位部、3cmから4cmまでを中央部、5cmから6cmまでを遠位

Lactate

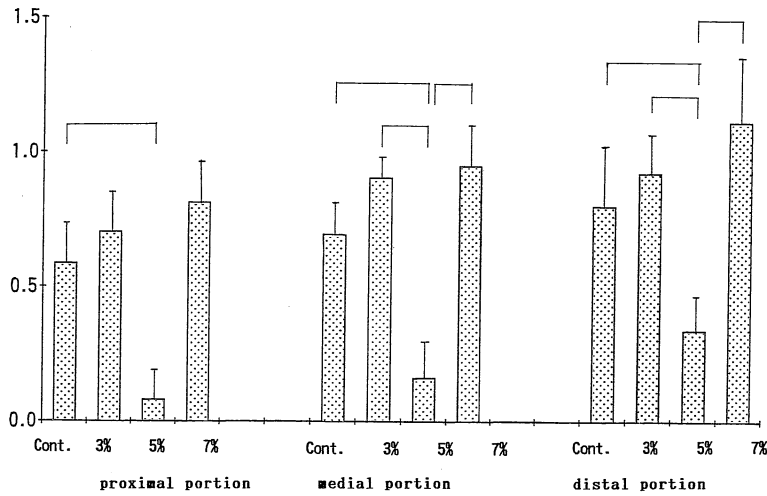


Fig. 4. The mean levels of lactate in the tissues.

Noradrenalin

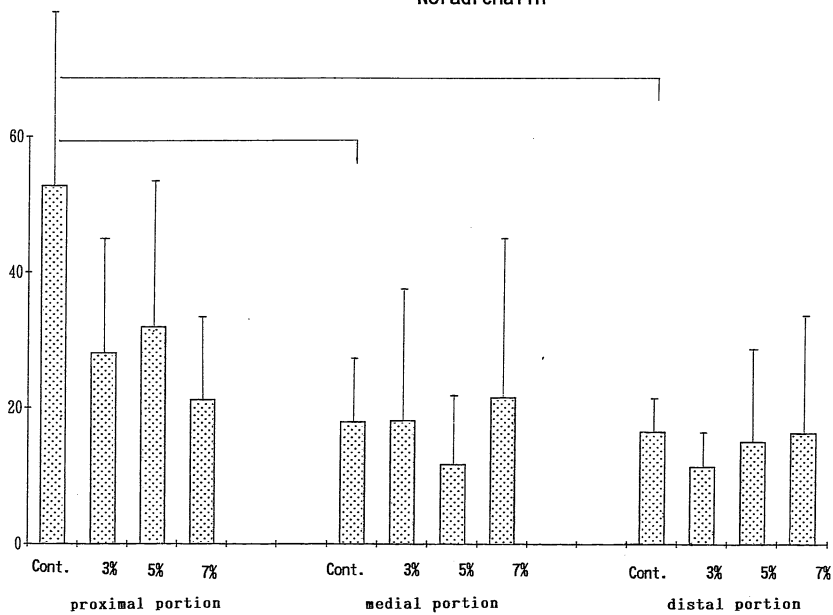


Fig. 5. The mean levels of nor-adrenalin in the tissues.

部として皮弁を肉様膜を含めて採取し(Fig. 2), phosphate buffered saline(PBS)にて洗浄した後 -70℃で凍結保存した。

生化学的測定は以下の手順で行なった。サンプル組織の湿重量を測定し、組織を細切、挫滅し、これに緩衝液を加えて氷中に10分間静置した(Table 1)。3000回転、

7分間、さらに10000回転、4分間遠心した後上清を採取し、乳酸、LDH、CPK、ノルアドレナリンの定量を行なった。なお、測定はSRL社(東京)に依頼した。実験は、各群5匹ずつ行ない、実験途中で死亡したものは結果から除外した。

5. 検定

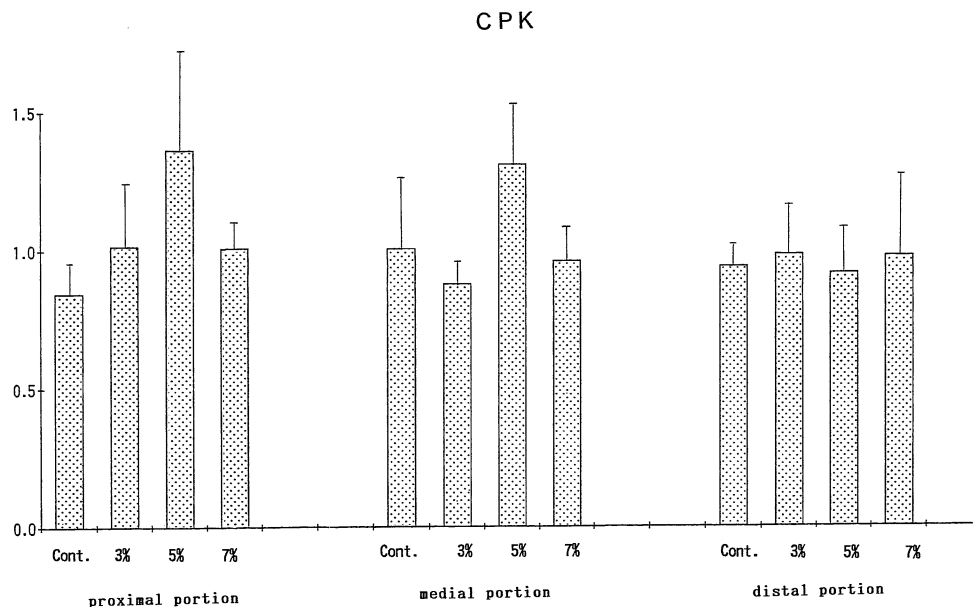


Fig. 6. The mean levels of creatine kinase in the tissues.

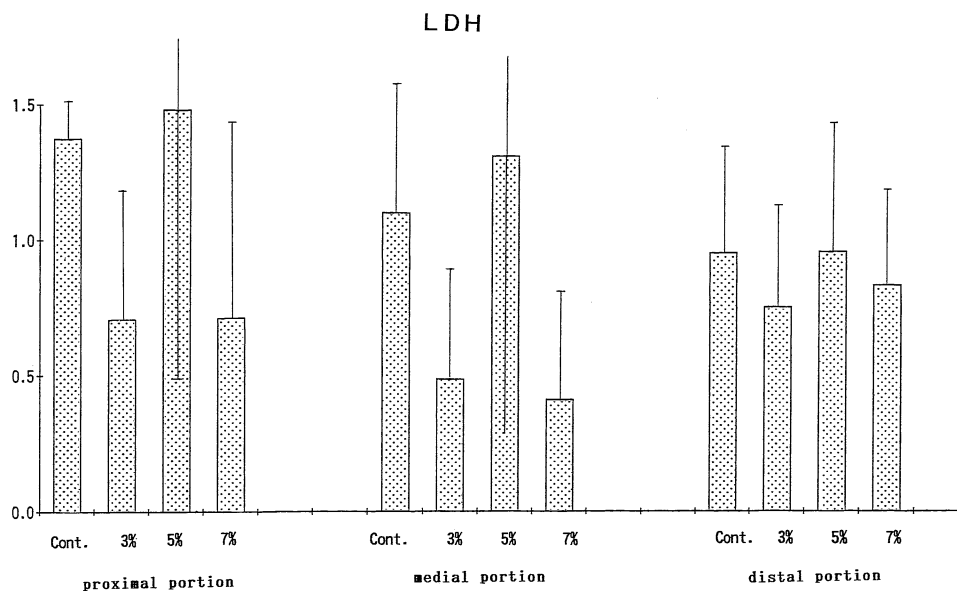


Fig. 7. The mean levels of lactate dehydrogenase levels in the tissues.

皮弁生着率についてはt検定を, 生化学的項目についてはサンプルが等分散と見なし得なかったため Mann-Whitney 検定を採用した⁹⁾。

結 果

1. 皮弁生着率

7日後に判定した場合, 各群間に差は認められなかった。これに対して, 3日後に判定した場合には5%群が他群に比べて皮弁生着率が有意($p < 0.05$)に良好であった(Fig. 3)。

2. 皮弁組織内の生化学的変動

乳酸値は, 近位部・中央部・遠位部のいずれにおいても5%群が他の3群よりも有意に低値であった。また, いずれの濃度においても遠位になる程乳酸値は高くなる傾向がみられた(Fig. 4)。ノルアドレナリンはコントロール群の近位部のみが他に比べて高値を示した(Fig. 5)。CPK と LDH については, 皮弁内の部位や軟膏の濃度の違いのいずれにおいても一定の傾向は見いだせなかった(Fig. 6, 7)。

考 察

1. 皮弁生着率に及ぼす影響

7日後に判定した場合には, 各濃度間に差異は認められなかったが, 3日後に判定した場合には, 5%群の皮弁生着率が良い傾向にあった。ただし, 皮弁挙上の3日後ではまだ demarcation が完了する前の段階にあると考えられ, この時点での皮弁生着率の判定は, 厳密には困難ではある。しかしながら, 後に述べるように, 3日後に採取した皮弁組織中の生化学的変動と3日後の時点での皮弁生着率との間に明らかな相関があることや, 今回の実験においては, 皮弁挙上後48時間目までしかブクラデシンナトリウム軟膏の外用を行っていない点を考慮すると, 本剤の外用が皮弁生着率を向上させる可能性があるものと考えられる。外用期間の延長などを加えて, さらに検討したい。

3日後に判定した際に, 各濃度間に皮弁生着率の差異が生じた要因については以下のように考えられる。まず3%群の場合には, 組織中の薬物濃度が有効量に達しなかったのではないかとと思われる。逆に, 7%群については, 組織中の cyclic AMP(cAMP)の濃度が過剰となり, かって細胞毒性を発揮したのと考えられる^{5,6)}。

2. 皮弁組織内の生化学的変動について

乳酸値は, 皮弁内のいずれの部位においても, 5%群で他群よりも低値であり, この結果は, 3日後の皮弁生着率において5%群が最も優れていたことと良く相関して

いる。乳酸値が低値であったのは, ブクラデシンナトリウムの持つ局所血流改善作用により皮弁内の血液循環が向上し, 乳酸の蓄積が抑制されたこと, 組織細胞中の cAMP 濃度が上昇し細胞の活動が賦活化されたことに起因していると考えられる。

3%および7%の両群が5%群程乳酸の組織内への蓄積が抑えられなかったことは, この2群においては, 皮弁生着率の改善が得られなかったことと矛盾しない。

ブクラデシンナトリウム軟膏の外用時の皮弁組織中のノルアドレナリンの動態については, 残念ながら, 今回のデータから推察することは困難である。しかしながら, ノルアドレナリンは細胞中の cAMP 濃度を上昇させる働きがあることから^{7,8)}, 近位部で見られたすべての濃度でのノルアドレナリン含量の低下は, 外部から cAMP が与えられることで negative feedback がかかり, その結果, ノルアドレナリンの分泌が抑制されたのかもしれない。

LDH および CPK といった組織逸脱酵素については, 組織破壊の進行に伴って組織中の含量が低下することが報告されており⁹⁾, 逆に組織破壊が軽度である程, 組織中の含量は多くなるものと考えられる。つまり, 皮弁生着率が向上した群においては, 他群よりも高値を示すものと思われる。ところが, 今回の実験では, 皮弁生着率の向上が認められた5%群と他群との間で, LDH と CPK の有意な差異は見られなかった。その要因については, 皮弁生着率が向上しなかった群であっても皮弁のおよそ80%は生着していることから, 組織破壊すなわち細胞死という点においては3群間にLDHやCPKに差をもたらすほどの差がない可能性や, 抽出方法等の実験の手的問題による可能性も考えられる。今後, さらに検討が必要である。

結 語

ラット背部皮弁に対して皮弁挙上48時間後までブクラデシンナトリウム軟膏を外用したが, 7日後の皮弁生着率に明らかな影響は認められなかった。しかしながら, 3日後の段階では, 5%群の皮弁生着率が他群よりも有意に良好であった。この時期に皮弁生着率を正確に判定することは困難ではあるが, 同時期に採取した皮弁組織中の乳酸値が, 皮弁生着率と良く相関していることから, その使用方法によっては, 本剤の使用が皮弁生着率を向上させる可能性があるものと考えられた。

本稿の要旨は, 第5回日本形成外科学会基礎学術集会(於 長崎)にて報告した。

文 献

- 1) **Falanga, V., Katz, M. H. and Alvarez, A. F.** : Dibutyryl cyclic AMP is a mitogen for human keratinocytes and human dermal fibroblasts. *Wounds* **3** : 70-78, 1991.
- 2) 増澤幹男, 大川 司, 藤村響男, 浅井俊弥, 西山茂夫, 西岡 清 : DBcAMP のヒト皮膚微小血管内皮細胞に対する細胞増殖作用の検討. *皮膚科紀要* **85** : 453-456, 1990.
- 3) 馬野詠子, 伊藤祐成, 永島敬士 : Dibutyryl Cyclic AMP の皮膚潰瘍に対する臨床的応用. *西日皮膚* **50** : 130-134, 1988.
- 4) 市原清志 : バイオサイエンスの統計学. 90-99, 南江堂, 東京, 1990.
- 5) **Burk, R. W., Serafin, D. and Klitzman B.** : Toxic effects of catecholamines on skin. *Plast. Reconstr. Surg.* **85** : 92-99, 1990.
- 6) **Hatoko, M., Tada, H., Kuwahara, M., Muramatsu, T. and Shirai, T.** : Epinephrine induces 72-kD heat shock protein (HSP72) in cultured human fibroblasts. *J. Nara Med. Ass.* **47** : 187-197, 1996.
- 7) **Jakobs, K. H. and Schultz G.** : Signal transformation involving α -adrenoceptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **4** : S63-S67, 1982.
- 8) **Lefkowitz, R. J. and Caron, M. G.** : Adrenergic receptors : Molecular mechanisms of clinical relevant regulation. *Clin. Res.* **33** : 395-406, 1985.