

Thesis

創傷底微小循環可視化技術の開発と陰圧負荷の急性効果

大学病院 形成外科・美容外科

大河内 裕美

【背景と目的】局所陰圧閉鎖療法 (negative pressure wound therapy, 以下 NPWT) は創傷を密閉して陰圧を負荷することにより治癒を促進する治療法で、適切な湿潤環境の維持、過剰な組織間液の排出、血行改善、細菌負荷軽減により創傷治癒を促進するとされている。NPWTの有効性に関しては臨床研究や基礎研究で多数検証されているが、創傷治癒を促進する詳細なメカニズムについてはまだ解明されていない。NPWTの創傷治癒促進機序として最も重要と考えられる局所循環動態の変化については過去の論文では創傷縁周囲の血流量を計測するのみであった。本実験では創傷治癒過程の母床である創傷底の微小循環を可視化する動物実験モデルを開発し、陰圧負荷による創傷底微小循環の応答を解析した。

【方法】創傷底微小循環可視化モデルの開発では手術用顕微鏡下にマウスの臀部に真皮下血管網を温存した創を作成し、得られた蛍光顕微鏡画像を生体顕微鏡-ビデオコンピューターシステムを利用して観察・記録した。陰圧下の創傷底微小循環への急性効果については独自の陰圧負荷システムを使用して -125 mmHg (n = 12), -500 mmHg (n = 12), 0 mmHg (n = 8) の3段階の圧を負荷し、血流量の変化を計測し、比較を行った。

【結果】本実験モデルでは陰圧を負荷された創傷底微小循環を安定的に観察できた。-125 mmHg 群で有意な血流増加を認め、-500 mmHg 群で負荷5分後に有意な減少を認めた。

【結論】陰圧負荷による創傷治癒メカニズムには創傷底の微小循環血流増大も関与することが示唆された。

緒 言

局所陰圧閉鎖療法 (negative pressure wound therapy, 以下 NPWT) は、適切な湿潤環境の維持、過剰な組織間液の排出、局所の血行改善、細菌負荷軽減により、創傷治癒を促す治療法として国内外で施行されている¹⁻¹³⁾。現在、本邦においても Vacuum-Assisted Closure System® (VAC: KCI 社 (米国), 以下 VAC) と レナシス® (スミスアンドネフュー (英国)) が医事承認をうけて使用されている。わが国では VAC 承認前において各施設で身近な医療材料を駆使して閉鎖陰圧療法を施行していた⁸⁻¹³⁾。埼玉医科大学病院形成外科においても独自の NPWT を施行しており、以前、我々はその治療効果と細菌負荷軽減効果を検討した。ここでは、褥瘡から関節腔につながる瘻孔まで、さまざまな種類の32例39部位の難治性潰瘍に対して独自の NPWT を施行し、潰瘍の治癒の過程を褥瘡アセスメントツールである DESIGN-P に準ずる方法で定量的に評価し、NPWT 前後で有意差を認めた。また、MRSA 感染を伴う潰瘍6例に対して NPWT 施行時と NPWT

非施行時の細菌数を半定量し、有意差はないものの、NPWT 後に減少傾向を認めた。

局所陰圧閉鎖療法の有効性に関しては実験的にも臨床的にも多数検証されているが、創傷治癒を促進する詳細なメカニズムについてはまだ解明されていない¹⁻²³⁾。

陰圧閉鎖環境下における局所血流量変化に関する研究は過去に報告があり、陰圧による創縁周囲の血流増加が認められているが、創傷治癒過程において免疫反応・血管新生・線維芽細胞の増殖・細胞外マトリックスの生成・肉芽形成の主な母床となるのは創縁よりもむしろ創傷底である^{24, 25)}。過去の研究は創傷底の観察・測定が困難であることから創縁外周部分の組織血流量をレーザードップラー血流計などで計測し、創縁周囲の血流増加を根拠に創傷底の血流増加を類推して、局所陰圧負荷による血流増加が治癒促進に寄与していると考察しており¹⁴⁻¹⁷⁾、創傷底の血流の変化を実際に調べた報告はまだ存在しない。Wackensfors ら¹⁶⁾はブタの創傷モデルを用いて創縁から0.5 cmの部分では陰圧負荷により血流が低下するのに対し創傷から少し離れた部分においては血流が増加すること、また組織によっても陰圧負荷に対する血流量の応答が異なること

を示した. このように創傷周囲のわずかな範囲でも部位により血行動態が異なることをみると創縁周囲の血流をもって完全に創傷底血流を代表することはできない.

陰圧を受ける局所の血流を測定すべく, 生体顕微鏡-ビデオコンピューターシステムを利用して創傷底の微小循環を可視化する実験モデルを開発し, 陰圧負荷による創傷底微小循環の応答を解析した.

対象と方法

対象

32匹の雄ddyマウス(埼玉実験動物供給, 埼玉(日本))(30-40 g)を使用した. マウスは実験前に少なくとも5日間は実験室で飼育して設備に順応させてから実験をおこなった.

動物は, 実験動物注意の法則(NIH出版 1985年改訂)に準じて扱った. 実験のプロトコルはすべて埼玉医科大学の実験動物管理委員会によって承認された.

真皮下血管網可視化モデル

マウスの麻酔はウレタン(Sigma-Aldrich社, 米国)(1 g/Kg)の腹腔内注射でおこなった.

ウレタンは心血管反射を維持するので心血管系の薬理的な調査にふさわしいとされており, 急性実験においては血流に関する繊細な実験に非常に有用な麻酔薬と考えられる²⁶⁾.

血流を観察するにあたり, 呼吸運動の影響を最小限とするため, 観察部位として臀部を選択した. マウスの背部から臀部にかけて剃毛を行い, 臀部に直径6 mmの円形に皮膚表層を切開し, 真皮の深い層を保存して皮膚の表層を切除した. この操作は顕微鏡下で真皮下血管網に損傷を与えないようにマイクロ用の摂子と剪刀を使用しておこなった(図1).

この温存された真皮下血管網を創床微小循環として観察した(図2(a)). これに対し, 通常の動物の創傷モデルは皮膚を全層切除しており, 創底で背筋または筋膜が露出している(図2(b)).

創床底微小循環系の可視化

生体顕微鏡-ビデオコンピューターシステム下に真皮下血管網を創傷底微小循環として可視化した. 血管造影画像を得るため平均分子量 2.5×10^6 で2.5 mg/100 mLに調整したfluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FITC-dextran: Sigma-Aldrich社, 米国) 0.1 mLのを尾静脈から投与した. Green fluorescent protein (GFP) フィルターを通した100ワット水銀ランプを落射光として用い, high-gain intensified charged couple device (ICCD) カメラ(C2400-89V, 浜松ホトニクス株式会社, 浜松)で微小循環を可視化した. 微小循環画像はタイマー(VTG-33, FOR-A, 東京)に連結してハードディスクビデオレコーダー(Rec-On, I-Oデータ, 金沢)に記録し解析した.

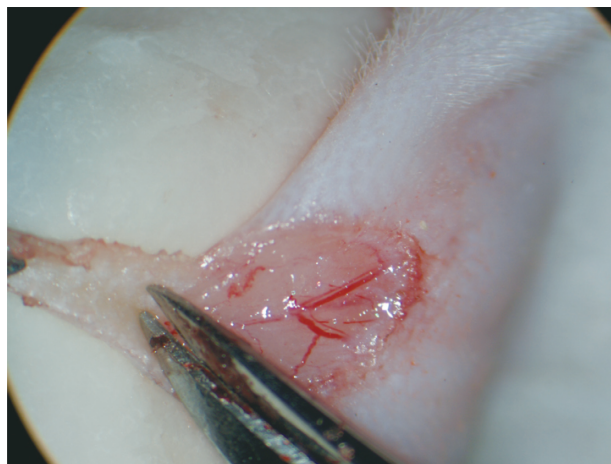


図1. 創傷底の作成. マイクロサージェリー用の剪刃と鑷子を用いて真皮下血管網を温存しながら表層の皮膚を削除する. (Shigeru I, et al. Wound Rep Reg 2008;16:460-5のFig. 1を許可を得て転載)



図2(a)

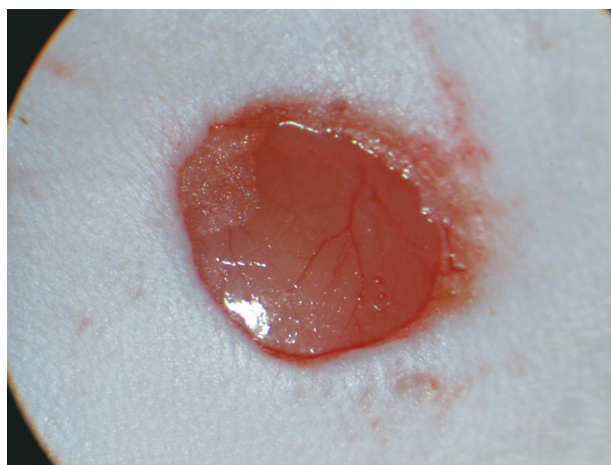


図2(b)

図2. 創傷実験モデルの肉眼所見. (a) 今回われわれが開発した実験モデルでは真皮下血管網が創傷底微小循環として温存されている. (b) これに対し従来の創傷モデルでは全層皮膚が切除され背部の筋が創傷底に露出している. (Shigeru I, et al. Wound Rep Reg 2008;16:460-5のFig. 2を許可を得て転載)

創傷への陰圧負荷

吸引チューブ (20ゲージ 留置カテーテル (サーフロー®: テルモ, 東京) の先端を少量のポリウレタンスポンジに埋め込み創縁に置いた。スポンジはチューブが組織を吸引して閉塞してしまうのを防ぐフィルターとして必要である。つぎに創傷と留置チューブを透明なポリメチルペンテンフィルム (理研, 東京) で覆い密閉した (図3)。留置チューブの他端は圧力測定ゲージ (バキュームゲージTA142BL, 長野計器, 東京) を通して吸引装置 (パワースマイル KS-700, 新鋭工業, 埼玉) に連結した (図4)。

実験プロトコール

実験動物をつぎの3群に分けた。

- (1) 陰圧負荷群 I (n = 12) : 125 mmHgの陰圧を5分間負荷した。
- (2) 陰圧負荷群 II (n = 12) : 500 mmHgの陰圧を5分間負荷した。
- (3) コントロール群 (n = 8) : 陰圧負荷以外を上記2群と同じ状況に置き観察した。陰圧負荷群に関してはつぎの6時点で血流量を計測した。
 - (i) ベースラインとして陰圧負荷前 (BL)
 - (ii) 陰圧負荷直後 (PA)
 - (iii) 陰圧負荷後1分
 - (iv) 陰圧負荷後5分
 - (v) 陰圧解除直後 (PR)
 - (vi) 陰圧解除後1分

コントロール群に関しては動物を観察ステージに設置後, 上記6時点に相当する時間に血流量を計測した。

すべての実験は室温 24℃ の環境で動物を 37℃ の加温パッド (ヒーターマット KN-475, 夏目製作所, 東京) に置いて実施された。

微小循環血流量の計測

40-90 μm の細静脈を計測の対象とした。専用に開発されたビデオ信号の相互相関に基づいた画像解析ソフトウェア (Capi-Scope II: KKTechnology, 英国) を用いた。このソフトウェアでは録画像の血管内に指定された領域のグレーレベルパターンについて, 相互相関係数を計算して時間的变化 (1/60 秒) を比較することにより血流速度を求める (図5)。

血管径は画像解析ソフトウェア (Beta 4.0.3 of Scion Image, Scion Corporation, 米国) を使って計測した。

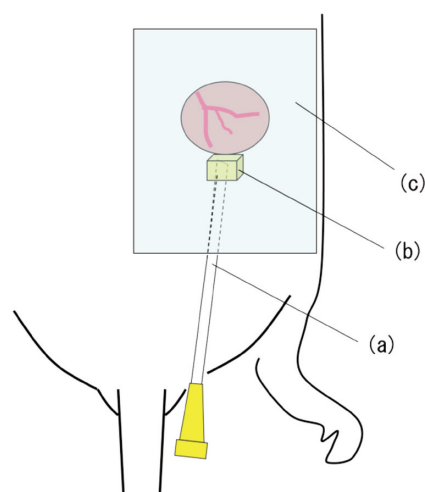


図3. 陰圧負荷のための創傷周辺のセッティング。吸引チューブ (a) の先端を少量のポリウレタンスポンジに埋め込み創縁に置く (b)。創傷と留置チューブを透明なポリメチルペンテンフィルムで覆い密閉する (c)。(Shigeru I, et al. Wound Rep Reg 2008;16:460-5のFig. 3を許可を得て転載)

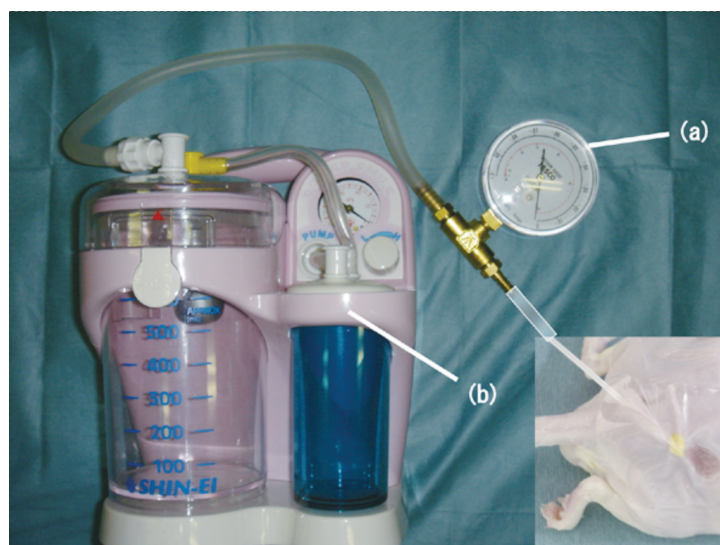


図4. 陰圧負荷システムの概要。留置チューブの他端は圧力測定ゲージ (a) を通して吸引装置 (b) に連結する。(Shigeru I, et al. Wound Rep Reg 2008;16:460-5のFig. 4を許可を得て転載)

血流速度 (v) と血管径 (d) から血流量 (F) を次の式から算出した.

$$F = \pi d^2 v / 4$$

統計解析

データは平均値±標準偏差で表した. 各群内の血流変化は各時点と陰圧負荷前のベースラインとを比較した. 繰り返しのある分散分析 (repeated analysis of variance) で有意差を検定した後, Bonferroni 法による

多重比較を行った. $P < 0.05$ を有意差ありと判定した.

結果

今回開発した実験モデルでは蛍光生体顕微鏡下に陰圧を負荷された創傷底の微小循環を安定的に観察することができた (図 6). 組織学的所見で分層皮膚を剥離切除した本実験モデルにおいては創傷底の最表層に真皮下血管がみられる (図 7 (a)). このように血管を

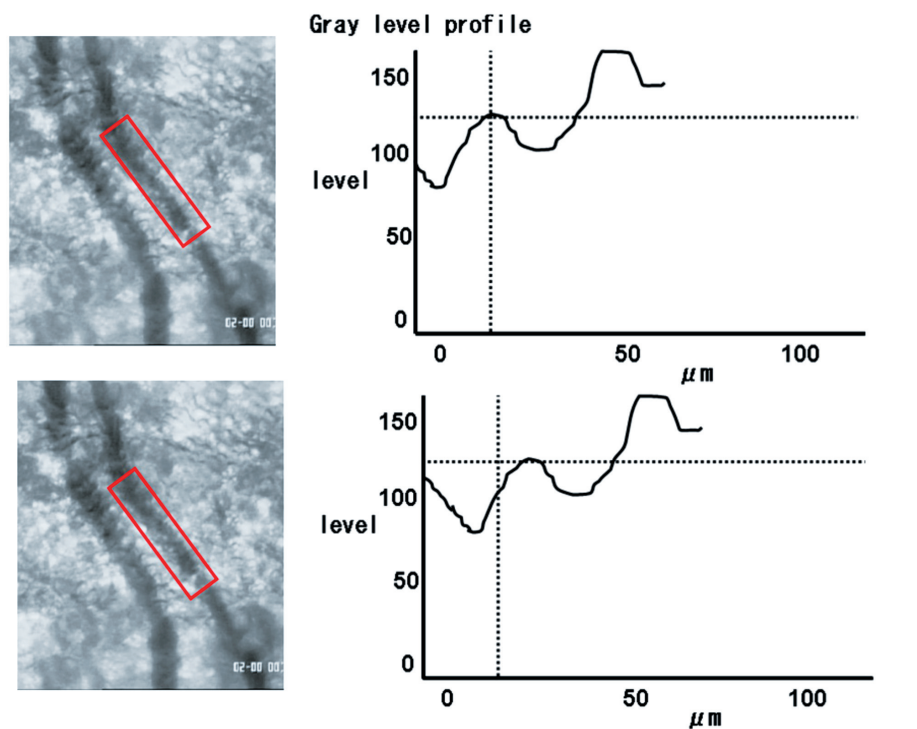


図 5. Capiscope を使った血流速度の測定. (上図) 録画像の血管内に指定された領域におけるビデオ信号のグレイレベルパターンを検知する. (下図) そのグレイレベルパターンを次のビデオフレームのパターンと比較する. 相関のあるパターンがビデオフレーム間で移動する距離に基づいて速度を計算することができる. (Shigeru I, et al. Wound Rep Reg 2008;16:460-5 の Fig. 5 を許可を得て転載)

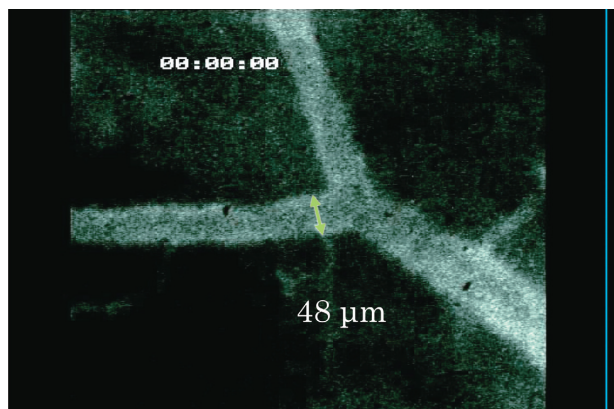


図 6 (a)

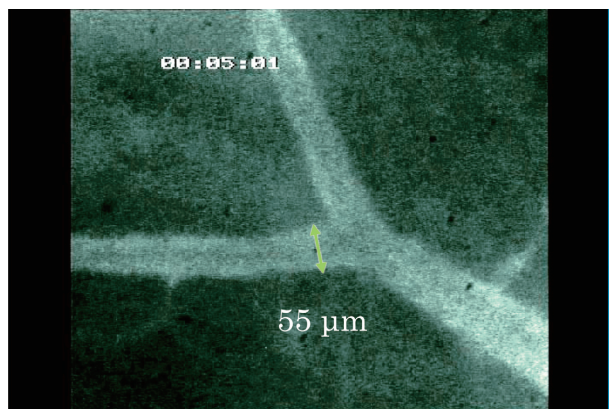


図 6 (b)

図 6. 蛍光生体顕微鏡による創傷底微小循環の画像. (a) 陰圧負荷前の微小血管像. (b) - 125 mm Hg の陰圧負荷 5 分後の微小血管像. 血管拡張が観察される. (Shigeru I, et al. Wound Rep Reg 2008;16:460-5 の Fig. 6 を許可を得て転載)

覆う軟部組織が除去されているため、この実験モデルではコントラストのよい微小循環が観察できる。これに対し、通常の全層皮膚欠損創傷モデルでは筋膜下の深いところに創傷底微小循環が存在するため良好な可視化画像は得られ難い(図7(b))。

陰圧負荷群 I (−125 mmHg) では陰圧をかけた直後から血流が増大し、陰圧終了後1分まで有意な増加が続いた(図8)。

陰圧負荷群 II (−500 mmHg) では逆に陰圧負荷後徐々に血流が低下し、5分で減少は有意となった。陰圧解除後1分まで有意な減少が続いた(図9)。

コントロール群ではすべての観察期間中血流は変化しなかった(図10)。

考 察

大量の滲出液や膿を含む創に対して、Fleischmannら

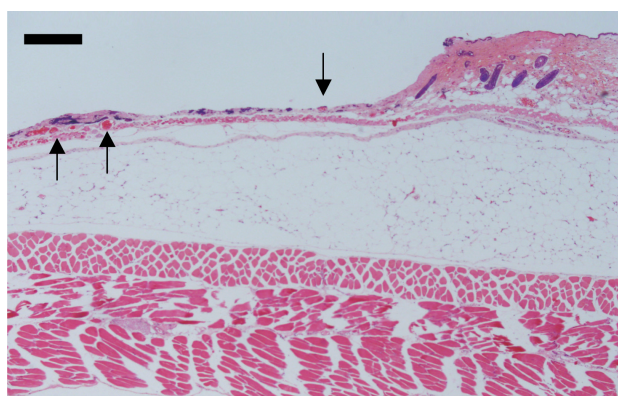


図7(a)

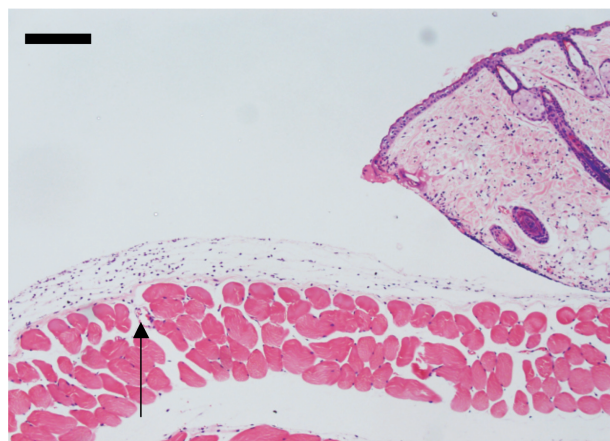


図7(b)

図7. 創傷モデルの組織学的所見。(a)分層皮膚を剥離切除した本実験モデルにおいては創傷底の最表層に真皮下血管(矢印)がみられる。(b)従来の創傷モデルでは筋膜下の深い所に微小血管(矢印)が存在する。スケールバーは100 μ m. (Shigeru I, et al. Wound Rep Reg 2008;16:460-5のFig. 7を許可を得て転載)

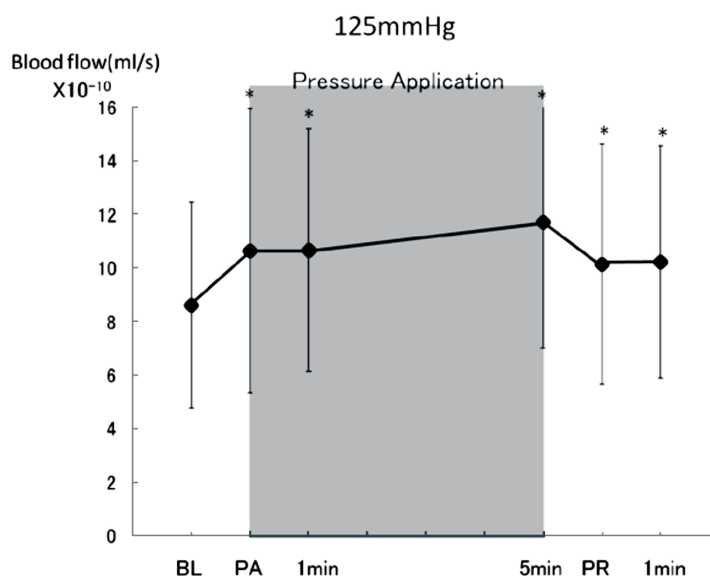


図8. 陰圧負荷群 I (−125 mmHg) における血流変化。陰圧をかけた直後から血流が増大し、陰圧終了後1分まで有意な増加が続いた。*陰圧負荷前のベースラインに対して有意差あり ($P < 0.05$)。 (Shigeru I, et al. Wound Rep Reg 2008;16:460-5のFig. 8を許可を得て転載)

によって創傷に陰圧を負荷し、有害な滲出液を除去するNPWTが報告された¹⁸⁾。その後の研究で、NPWTは細菌数の減少効果、過度の組織間液の除去作用、機械的刺激負荷などによる血流の改善効果があるとされている^{14, 19-21)}。

過去の研究で局所陰圧負荷により創縁周囲の血流が増加することは報告されているが¹⁴⁻¹⁷⁾、創傷底の血流変化に関する研究はない。一般に肉芽組織では垂直方

向に走る血管構築が多く観察され、創傷底から進展する血管新生が治癒に重要な役割を果たすと認識されている²⁴⁾。したがって陰圧によって創縁周囲のみでなく創傷底の血流がいかに変化するかは創傷治癒促進メカニズムに関わる重要なポイントとなる。

創傷底は何らかの侵襲を受けているので、その微小循環応答は直接侵襲を受けていない創縁周囲の微小循環とは異なると考えられる。Wackensforsら¹⁵⁾が示した

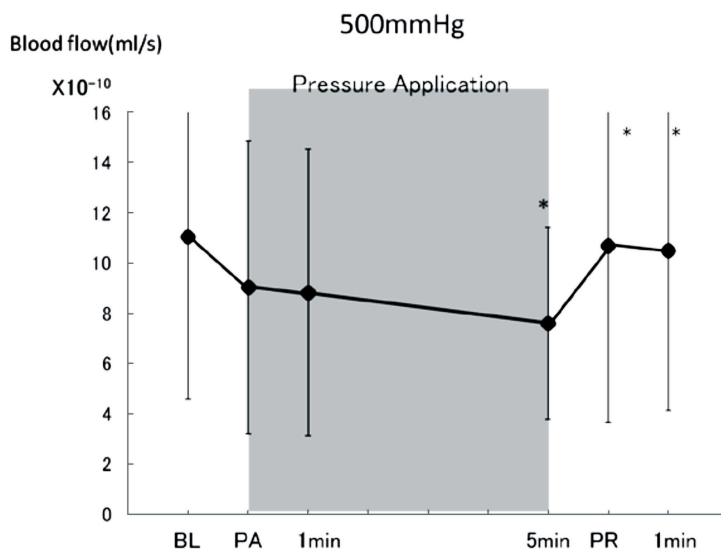


図9. 陰圧負荷群II (−500 mmHg) における血流変化. 陰圧負荷後徐々に血流が低下し、5分で減少は有意となった。陰圧解除後1分まで有意な減少が続いた。*陰圧負荷前のベースラインに対して有意差あり ($P < 0.05$)。 (Shigeru I, et al. Wound Rep Reg 2008;16:460-5のFig. 9を許可を得て転載)

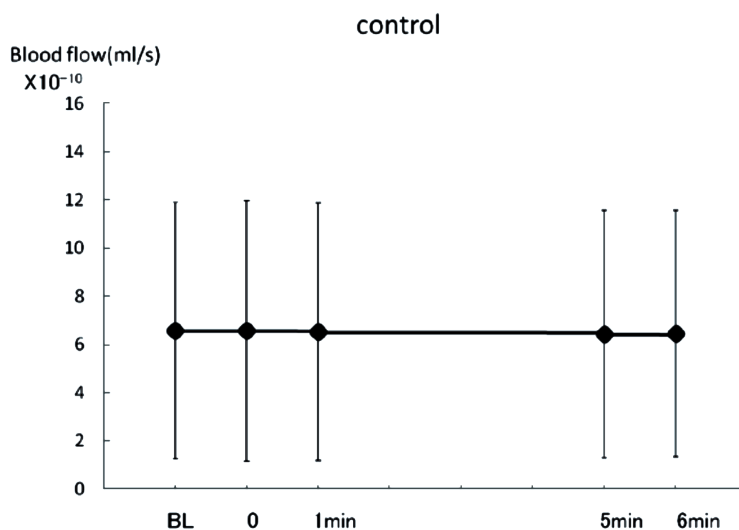


図10. コントロール群. コントロール群ではすべての観察期間中で有意な血流変化はなかった。 (Shigeru I, et al. Wound Rep Reg 2008;16:460-5のFig. 10を許可を得て転載)

創傷周辺における血行動態の異所性は、創傷底の血流量が創縁周囲の循環量と必ずしも正の相関を示すとは限らないことを示唆している。それゆえ創傷底の微小循環を直接解析することが望まれる。

既存の研究のほとんどはレーザードップラー血流計を用いているが、この血流計は赤血球のドップラーシフトを感知して組織血流量の相対値を間接的に求めるもので、血流量の絶対値を計測することはできない²⁷⁻²⁹⁾。また通常の機器のセンサー部分は創傷底の微小循環血流を計測するのに適した形状・性能を有していない。一方、生体顕微鏡による循環を直接可視化する技術は微小循環研究の領域に大きな貢献をしてきた^{30, 31)}。われわれは生体顕微鏡-ビデオコンピューターシステムを用いて創傷底微小循環を直接観察できる実験モデルを開発した。

皮膚の血管は表皮直下の真皮乳頭層の毛細血管網、乳頭下層(真皮上層)の後毛細管細静脈網、真皮下層の細動脈と細静脈網、浅筋膜の動静脈の大きな血管網からなり、すべての皮膚血管は階層的に構築され、各層において網状構造をなしている³²⁾。今回開発した実験モデルでは手術用顕微鏡下に真皮下微小循環上の組織を丁寧に削除し、蛍光顕微鏡システムを用いることでコントラストの良い微小血管造影画像を得られる。この創傷底微小循環可視化モデルに独自に組み立てた陰圧負荷装置を適用して陰圧下の創傷底微小循環の応答を解析することができた。

その結果-125 mmHgの陰圧負荷で創傷底微小循環血流が増加することが判明した。最も初期の研究でMorykwasら¹⁴⁾は-125 mmHgの陰圧で創縁周囲の血流量が最大に増加することを示し、その後今日に至るまで局所陰圧閉鎖療法の至適圧の標準となった。Chenら¹⁶⁾のウサギの創傷モデルを使った実験でも-15から-20 kPa(約-113から-150 mmHg)で創傷周辺の微小血管が拡張することが報告されている。Petzinaら¹⁷⁾のブタの胸部切開創においても-75から-125 mmHgの陰圧負荷直後に創縁の血流が増大することが計測されている。われわれの創傷底における微小循環解析はこれら創縁周囲における血流計測の結果と一致した。

逆に-500 mmHgの陰圧負荷では創傷底の微小循環血流量は減少した。初期の実験でも-400 mmHgの陰圧で創縁の血流量が陰圧負荷前より減少することが知られており¹⁴⁾、陰圧が過剰になると血流量が減少するという点で整合性が得られた。

これまで、局所血流量の増加については、組織間液を除去することで浮腫を軽減するためと説明されることが多かった¹⁴⁾。今回の実験では、急性創傷に対して陰圧を負荷して局所血流量を観察したところ、血流量は陰圧負荷直後から-125 mmHgで増加傾向を示し、-500 mmHgでは減少傾向を示した。今回の実験モデ

ルでは陰圧負荷による局所血流の変化についてまだ十分な説明はできず、また過去の文献からも明確な解答はえられていないが、急性創傷を用いた本実験の血流量の変化は組織間液の移動というよりむしろ機械的刺激に対する血管内皮細胞の反応の関与が疑われた。

血管内皮細胞のずり応力に対する感知・応答機構については血管障害の分子病態を解明する目的で様々な研究が行われている³³⁻³⁵⁾。内皮細胞はずり応力の修飾を受け、NO、プロスタサイクリン、ナトリウム利尿ペプチドなどの平滑筋弛緩物質の産生を増加させ、平滑筋収縮物質であるエンドセリンやアンギオテンシン変換酵素の発現を減少させる。本実験では-125 mmHg群において、陰圧負荷後血流量が増加し、負荷5分後で血流量が最大となった。陰圧負荷による物理的刺激に対し、血管内皮細胞が反応した結果なのかも知れない。

今回、創傷底微小循環として真皮直下の細動脈・細静脈の血管網を観察した。細動脈は平滑筋を持ちながら、内弾性板は網目状の構造となるため、内腔を大きく変化させることができ、末梢血管抵抗を大きく変化させる。今回使用したCapi-Scopeでは1/60秒間隔での相互相関から流速を計算するため、観察したのは細静脈であるが、細動脈の血流量の変化を反映しての今回の実験の結果であったと考える。-125 mmHgの陰圧負荷は組織に適度なストレスを与えることで種々の反応を介して血流増加を導き、一方、-500 mmHgの陰圧負荷は組織に過剰なストレスを与えて血流減少をまねいた可能性が考えられる。

本実験モデルのような機械的刺激に対する組織の反応の解明については今後さらなる研究を要する。今回開発した微小循環可視化モデルでは創傷の深部や慢性創傷における分析はできないが、本研究結果から陰圧負荷による創傷治癒メカニズムにはこれまで確認された創縁の血流促進のみでなく、創傷底の微小循環血流増大も関与することが示唆された。

結 論

以前当科で独自に行っていた難治性皮膚潰瘍に対する陰圧閉鎖療法の臨床的有效性を確認した。その奏効機序を解明するために、マウス臀部の皮膚を手術用顕微鏡下に真皮下血管網を温存して切除した創底部の微小循環を、生体顕微鏡-ビデオコンピューターシステムを利用して可視化する方法を開発し、陰圧負荷による創底部の急性期の変化を観察・測定した。-125 mmHg群では陰圧負荷直後から、陰圧負荷解除後1分にかけて有意に創傷底の血流を増加させたが、-500 mmHg群では創傷底の血流は時間とともに減少して陰圧負荷5分後に有意に減少した。本研究結果から陰圧負荷による創傷治癒メカニズムにはこれまで確認された創縁の血流促進のみではなく創傷底の微小

循環血流増大も関与することが示唆された。

本論文は、渡辺裕美，市岡滋．創傷底微小循環可視化技術の開発と陰圧負荷の急性効果．日本形成外科学会会誌 2013;33の一部，Ichioka S, Watanabe H, Sekiya N, Shibata M, Nakatsuka T. A technique to visualize wound bed microcirculation and the acute effect of negative pressure. *Wound Repair and Regeneration* 2008;16:460-5の一部，および渡辺裕美，大浦紀彦，市岡滋，中塚貴志．難治性潰瘍に対する局所陰圧療法の臨床経験．日本形成外科学会会誌 2005;25:509-16の一部を含む。

謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究のご指導を賜りました中塚貴志教授，市岡滋教授，（現杏林大学医学部形成外科准教授）大浦紀彦先生，血管診療技師 関谷直美様，ご助力いただきました埼玉医科大学形成外科医局スタッフの皆さまに深謝致します。

文 献

- 1) Argenta LC, Morykwas MJ. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience. *Ann Plast Surg* 1997;38:563-76.
- 2) Harlan JW. Treatment of open sternal wounds with the Vacuum Assisted Closure system: A safe, reliable method. *Prast Reconstr Surg* 2001;109:710-12.
- 3) Hersh RE, Jack JM, Dahman MI, Morgan RF, Drake DB. The vacuum-assisted closure device as a bridge to sternal wound closure. *Ann Plast Surg* 2001;46:250-4.
- 4) DeFranzo AJ, Argenta LC, Marks MW, Molnar JA, David LR, Webb LX, et al. The use of Vacuum assisted closure therapy for the treatment of lower extremity wounds with exposed bone. *Plast Reconstr Surg* 2001;108:1184-91.
- 5) Armstrong DG, Lavery LA, Abu-Rumman P, Espensen EH, Vazquez JR, Nixon BP, et al. Outcomes of subatmospheric pressure dressing therapy on wounds of the diabetic foot. *Ostomy Wound Mnage* 2002;48:64-8.
- 6) Domokowski PW, Smith ML, Gonyon DL, Drye C, Wooten MK, Levin LS, et al. Evaluation of vacuum-assisted closure in the treatment of poststernotomy mediastinitis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:386-90.
- 7) Ford CN, Reinhard ER, Yeh D, Syrek D, De Las Morenas A, Bergman SB, et al. Interim analysis of a prospective, randomized trial of vacuum-assisted closure versus the healthpoint system in the management of pressure ulcers. *Ann Plast Surg* 2002;49:55-61.
- 8) 井砂司，下田勝巳，森田尚樹，高橋祐司，友保洋三．皮膚潰瘍に対する陰圧閉鎖療法の治療評価．薬理と治療 2002;30:311-7.
- 9) 柳英之，寺師浩人，田原真也．Vacuum-Assisted Closureによる開胸術後縦隔炎2症例の治療経験．日形会誌 2003;23:246-9.
- 10) 野村正，寺師浩人，辻依子，野々村秀明，一瀬晃洋，田原真也．巨大皮膚欠損症例に対するVacuum-Assisted Closureによる治療経験．日形会誌 2003;23:45-50.
- 11) 守永圭吾，清川兼輔，力丸英明，山内俊彦，井上 要二郎．Vacuum-Assisted Closure (VAC) による重度仙骨部褥瘡 (IV度) の治療経験．日形会誌 2004;24:804-8.
- 12) Tachi M, Hirabayashi S, Yonehara Y, Uchida G, Tohyama T, Ishii H. Topical negative pressure using a drainage pouch without foam dressing for the treatment of undermined pressure ulcers. *Ann Plast Surg* 2004;53:338-42.
- 13) 本田耕一，小山明彦，鈴木裕一，森田昌宏，林利彦，竹野巨一．深い褥瘡に対するNegative-Pressure Dressing－在宅療養を視野に入れて－．褥瘡会誌 2000;2:1-6.
- 14) Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, McGuirt W. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation. *Ann Plast Surg* 1997;38:553-62.
- 15) Wackenfors A, Sjogren J, Gustafsson R, Algotsson L, Ingemansson R, Malmsjö M. Effects of vacuum-assisted closure therapy on inguinal wound edge microvascular blood flow. *Wound Repair Regen* 2004;12:600-6.
- 16) Chen SZ, Li J, Li XY, Xu LS. Effects of vacuum-assisted closure on wound microcirculation: an experimental study. *Asian J Surg* 2005;28:211-7.
- 17) Petzina R, Gustafsson L, Mokhtari A, Ingemansson R, Malmsjö M. Effect of vacuum-assisted closure on blood flow in the peristernal thoracic wall after internal mammary artery harvesting. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;30:85-9.
- 18) Fleischmann W, Becker U, Bischoff M, Hoekstra H. Vacuum sealing: indication, technique, and results. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 1995;5:37-40.
- 19) Morykwas MJ, Simpson J, Pungert K, Argenta A, Kremers L, Argenta J. Vacuum-assisted closure: state of basic research and physiologic foundation. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:121S-6S.

- 20) Hunter JE, Teot L, Horch R, Banwell PE. Evidence-based medicine: vacuum-assisted closure in wound care management. *Int Wound J* 2007;4:256-69.
- 21) Plikaitis CM, Molnar JA. Subatmospheric pressure wound therapy and the vacuum-assisted closure device: basic science and current clinical successes. *Expert Rev Med Devices* 2006;3:175-84.
- 22) Morykwas MJ, Faler BJ, Pearce DJ, Argenta LC. Effects of varying levels of subatmospheric pressure on the rate of granulation tissue formation in experimental wounds in swine. *Ann Plast Surg* 2005;28:211-7.
- 23) Argenta LC, Morykwas MJ, Marks MW, DeFranzo AJ, Molnar JA, David LR. Vacuum-assisted closure: state of clinic art. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:127S-42S.
- 24) Shai A, Maibach H. Natural course of wound repair versus impaired healing in chronic skin ulcers. In: Shai A, Maibach H, editors. *Wound healing and ulcers of the skin*. Berlin : Springer ; 2005. p. 7-17.
- 25) Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen* 2003;11(Suppl 1):S1-28.
- 26) Maggi CA, Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part C: cardiovascular system. *Experientia* 1986;42:292-7.
- 27) Mack GW. Assessment of cutaneous blood flow by using topographical perfusion mapping techniques. *J Appl Physiol* 1998;85:353-9.
- 28) Wardell K, Jakobsson A, Nilsson GE. Laser Doppler perfusion imaging by dynamic light scattering. *IEEE Trans Biomed Eng* 1993;40:309-16.
- 29) Fullerton A, Stucker M, Wilhelm KP, Wårdell K, Anderson C, Fischer T, et al. Guidelines for visualization of cutaneous blood flow by laser doppler perfusion imaging. A report from the standardization group of the european society of contact dermatitis based upon the HIRELADO european community project. *Contact Dermatitis* 2002;46:129-40.
- 30) Barker JH, Frank J, Bidiwala SB, Stengel CK, Carroll SM, Carroll CM, et al. An animal model to study microcirculatory changes associated with vascular delay. *Br J Plast Surg* 1999;52:133-42.
- 31) Ichioka S. Techniques in visualization and evaluation of the in vivo microcirculation. In: Leondes CT, editor. *Biomechanical systems technology: cardiovascular systems*. Vol. 2. Singapore: World Scientific Publishing; 2007. p. 29-48.
- 32) 今山修平. 皮膚血管の解剖学. *日皮会誌* 1999;109:1-10.
- 33) Cooke JP, Rossitch E Jr, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin invest* 1991;88:1663-71.
- 34) Korenaga R, Ando J, Tsuboi H, Yang W, Sakuma I, Toyo-oka T, Kamiya A. Laminar flow stimulates ATP- and shear stress-dependent nitric oxide production in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:213-9.
- 35) Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N, et al. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med* 2006 ;12:133-7.