

露出腸管を伴う開放創に対する被覆材としてのハイパードライヒト
乾燥羊膜の応用に関するマウスを用いた研究

Application of Hyperdry Human Amniotic Membrane as a visceral protective
dressing for the open wound with exposed bowel : a study in mice

2018

富山大学大学院 医学薬学教育部 (博士課程)

生命・臨床医学専攻 危機管理医学講座

天野 浩司

目次

Abstract	3
Introduction	4
Materials and methods	7
1. Ethics Statement	
2. HD-AM preparation	
3. Animals	
4. Creation of an experimental mouse model	
5. Confirmation of EAF development	
6. Application of HD-AM for the experiment	
7. Histological and immunohistochemical staining	
8. Measurement of granulation tissue on the exposed bowel	
9. Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)	
10. Blood figure analysis	
11. ELISA	
12. Statistical analysis	
Results	12
1. EAF occurring in the experimental mouse model.	
2. Evaluating granulation tissue thickness on the exposed bowel	
3. Cell infiltration into the HD-AM	
4. Quantitative RT-PCR	
4.1 Assessment of POD 0-based expression compared with the HD-AM(-) on POD 7	
4.2 Growth factors and cell migration chemokines	
4.3 Anti-inflammatory markers	
4.4 Inflammatory markers	
5. Immunohistochemical staining	
6. Blood tests	
Discussion	20
Conclusion	22
Conflict of interest	23
Acknowledgments	23
References	24

Abstract

露出腸管を伴う開放創は重症外傷における **Open abdominal management** の長期化や腹膜炎術後の創哆開などによって起こる合併症で非常に管理が難しい。露出腸管が穿孔した場合、**enteroatmospheric fistula (EAF)** と呼ばれる慢性瘻孔を形成する。これまでのところ、**EAF** を予防するための確立された方法は無いが、露出腸管上に早期に肉芽が成長するように管理することが最も妥当な治療であると考えられる。羊膜はこれまで難治性創傷に対する有用な被覆材として知られてきた。我々はハイパードライヒト乾燥羊膜 (**HD-AM**) を開発し、羊膜を滅菌・保存可能にすることで、このような緊急性の高い臨床例にも応用できる道を拓いた。我々は露出腸管を伴う開放創の動物実験モデルをマウスで作成し、**HD-AM** を用いて実験した。結果、**HD-AM** を使用した場合は有意に露出腸管上に肉芽が成長した。加えて、このような治癒促進の因子として、羊膜の **scaffold** としての機能や **TGFβ-1**、**CXCL-5** などの成長因子の調節、**M2** マクロファージ分化の促進などが関与していることを明らかにした。**HD-AM** は腸管露出を伴う開放創の被覆材として非常に有用である。

Introduction

救急外科の領域において、重症腹部外傷や敗血症を伴う腹膜炎などにより **Open abdomen** での管理の長期化や、創哆開などで腹壁を閉鎖することができない状況がしばしば生じる。これらには感染や筋膜壊死、腹壁の側方退縮、腸管浮腫、腹圧上昇などが関与している¹。この間に露出腸管は周囲組織や腸管、腹壁などと癒着を互いに形成し腸管露出を伴う開放創を形成する (**photo1, left**)。このような症例は露出腸管に穿孔が生じないように注意深い管理が必要で、創部の湿潤環境を保ち、創への不必要な刺激を避けて露出腸管が肉芽に覆われるのを待つしかない¹。次第に肉芽が露出腸管上に増生し、腸管の外壁のような役割になる²(**photo1, middle**)。そして創部が肉芽で覆われた頃に植皮や閉創を試みることが多い (**photo1, right**)。増生した肉芽ははじめ脆弱であり、乾燥や接触刺激、感染、腸管壁への張力や圧などを避けて管理する必要がある。腸管に穿孔が生じた場合は、たとえ穿孔部を縫合しても閉鎖することは困難で、慢性瘻孔を形成する。このような露出腸管上に生じた慢性瘻孔を *enteroatmospheric fistula (EAF)* と呼ぶ (**photo2**)。EAF の発生機序は今のところ明らかにはなっていないが、EAF は外傷や腹膜炎後の腹壁開放創や哆開創などに起こる重篤な合併症の一つである³。EAF は創の管理を困難にし、死亡率を明らかに上昇させる⁴。

Photo1

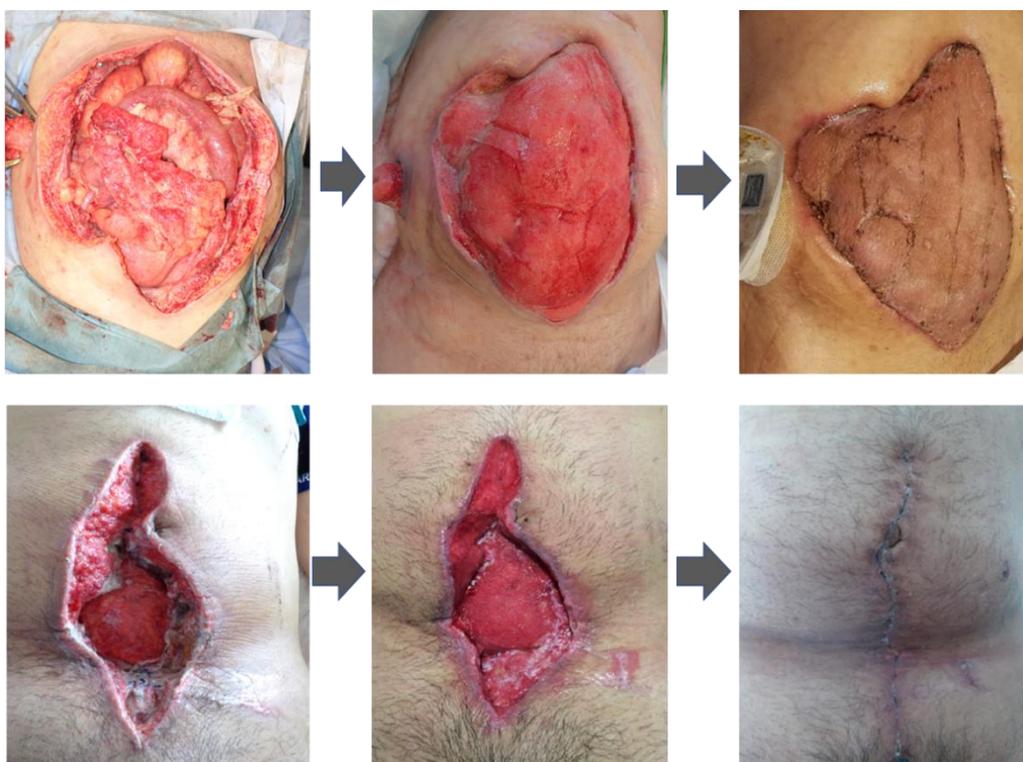


Photo1: Upper row: a clinical case of open abdomen management with abdominal wall necrosis due to severe peritonitis. After the exposed viscera was covered with granulation, it was transplanted split thickness skin grafts. Bottom row: a case of wound dehiscence due to

postoperative infection of abdominal trauma. The fascia suture is visible in the photograph on the left. Re-wound closure at the point the granulation grows around after the infection was settled. Both cases were my clinical case.

Photo2

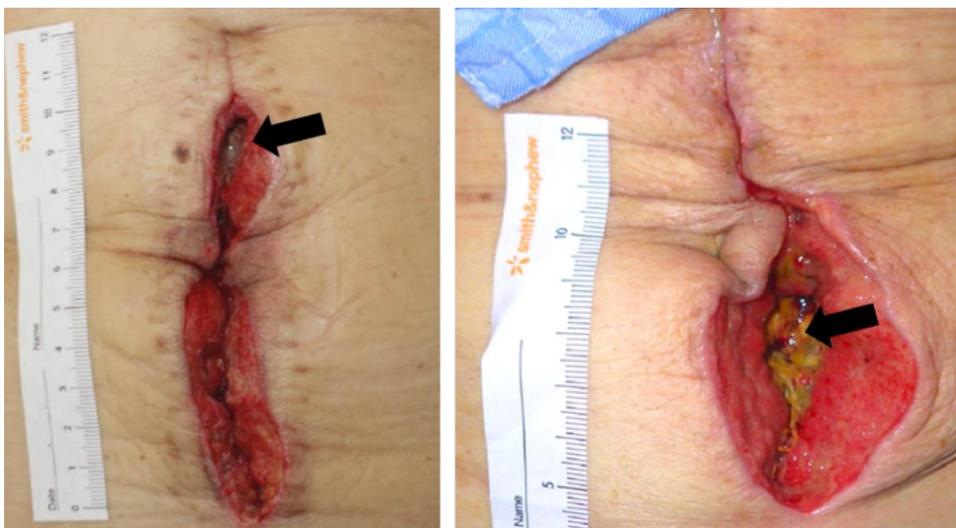


Photo2: Two clinical cases of wound dehiscence after peritonitis surgery. EAF was formed on the exposed bowel (arrow). Intestinal fluid leaks out so that control of infection and wound closure were difficult. Both cases were my clinical case.

閉鎖陰圧療法 (Negative-pressure wound therapy : NPWT) は開放創の管理において創の湿潤環境を保ち、肉芽増生を刺激する有用な治療である。腹壁開放創に対しては腹壁の側方収縮を予防し、露出腸管にかかる張力を軽減するとも言われている²⁵⁶⁷。しかしながら、NPWTを使用しても、EAFの発生を完全に予防することは容易ではない⁸。今のところEAF発生予防の確立された方法はないが、いずれにせよ露出腸管上に早期に肉芽を盛らせることがEAF発生予防に有効に働くと考えられる。

ここで、我々は露出腸管の保護と肉芽増生を促進するための生体材料として羊膜に着目した。羊膜は細胞の足場 (scaffold) としての創傷治癒機能⁹¹⁰¹¹¹²や抗炎症作用¹³、抗菌活性¹⁴¹⁵¹⁶、水分保持機能¹⁷、および低抗原性¹⁸、低コスト¹⁹などの特徴を持つ優れた生体材料である。生羊膜 (fresh AM : fAM)は外傷や熱傷に対する有用な被覆材料として以前から報告されてきた²⁰²¹が、必要なときにすぐに手に入らないこと、保存や取り扱いが煩雑であったことから実際の臨床では限定的な使用にとどまっていた。これらの問題を解決するために、我々は以前にハイパードライヒト乾燥羊膜 (Hyperdry human amniotic membrane : HD-AM)を開発し、報告した²²。HD-AMはfAMの持つさまざまな特徴を保持しており、帝王切開時に得られ、さらに遠赤外線、減圧、マイクロ波で乾燥させた後、γ線照射により滅菌している。保管や取り扱いが容易で必要時にいつでも使用できる。すでにさまざまな分野で臨床

研究がなされており、人体使用に対する安全性も確保されている²³²⁴²⁵²⁶²⁷²⁸。

我々はマウスで動物実験モデルを作成し、**HD-AM** が露出腸管上で肉芽増生を促進していることを組織学的、免疫化学的、分子生物学的に確かめた。**HD-AM** の細胞の足場 (**scaffold**) としての機能、成長因子や細胞遊走系ケモカインの誘導、さらに **M2** マクロファージへの分化調整による局所での抗炎症や組織再生の促進などが組織再生に関与していることが示された。**HD-AM** は救急外科分野において、露出腸管を伴う開放創に対する新たな創傷被覆材として寄与する可能性がある。

Materials and methods

1. Ethics Statement

ヒトおよび動物サンプルの使用を含むすべての実験手順は、富山大学倫理審査委員会の審査を経て承認されたプロトコールに基づき、ヘルシンキ宣言のガイドラインを遵守して実施した。

2. HD-AM preparation

HD-AM の作成についてはすでに以前報告しているとおりである²⁹。要約すると、fAM は富山大学付属病院と高岡市民病院において、事前に説明し同意の得られた帝王切開のドナーから得た。採取した fAM は乾燥装置（サクラ精機株式会社、東京、日本）を用いて連続遠赤外線照射、減圧、間欠マイクロ波照射により乾燥させ、適当な大きさに切断し、真空包装した後、 γ 線照射により滅菌した（25kGy）。

3. Animals

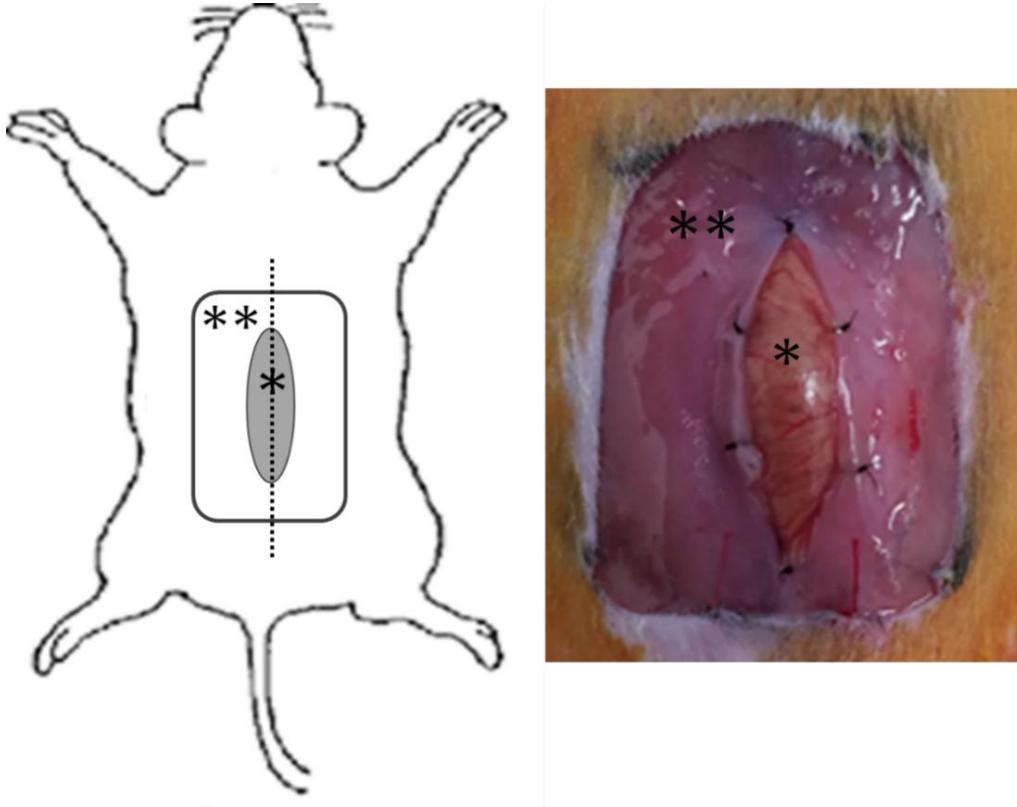
8週齢雄の ICR マウス(体重 32-37g)を日本 SLC 株式会社（浜松、日本）から購入した。全てのマウスは富山大学生命科学研究センターで、特定の病原体のない条件下かつ標準的な実験条件下で標準的な飼料および水を自由に与えて飼育した。研究プロトコールは、富山大学動物実験倫理委員会の承認を受けている(A2017MED-44)。

4. Creation of experiment mouse model

マウスを体重 1g 当たり 7 μ L の用量で 6.48mg / mL に調整したペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射により全身麻酔して脊柱位に固定した。皮膚を剃毛してヨウ素で消毒した後、腹部の中心に 15mm \times 20mm の大きさに全層皮膚欠損を作製した。白線を 15mm で切開して開腹した。盲腸をそのままの自然な位置で腹部から持ち上げ、7-0 ナイロン糸で腹壁筋膜と 6 点縫合固定した (Figure 1a, b)。

Figure 1

(a)



(b)

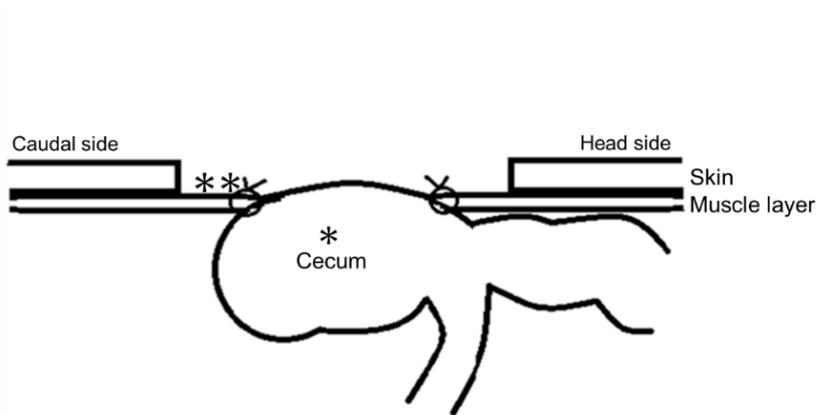


Figure 1.

An experiment mouse model and the application of HD-AM. (*lifted cecum, **abdominal muscle layer) (a) Left: Schematic diagram of an experimental mouse. Full-thickness skin defects were made at the center of the abdomen with a wound size of 15 mm × 20 mm. An incision of 15 mm was made on the white line. Right: A photograph of the wound site in the mouse model. The cecum was lifted and fixed to the abdominal muscle layer with 6-point suturing. (b) Cross-sectional view of the dotted line of Fig. 1a.

5. Confirmation of EAF development

作成したマウスモデルに EAF が発生するかどうかを事前に確認した。3 匹の実験モデルマウスの露出腸管を伴う開放創を 14 日間ガーゼのみで覆った。

6. Application of HD-AM for experiment

ヒト羊膜は単層上皮層、薄い基底膜、無血管の間質層の 3 層で主に構成されている (Figure 2, left)。実験では HD-AM を 15×20 mm の大きさにカットし、上皮層を上になるようにおいた群 (HD-AM group と名づけた) と、間質層を上にして置いた群 (裏返しの意味で upside down: HD-AM UD group と名づけた) というように羊膜の裏表を分けて、対照として HD-AM を置かない群 (HD-AM (-) group と名づけた) の 3 群を作成した (Figure 2, right)。創部はすべてポリウレタンフォームの被覆材である Hydrosite plus® (Smith & Nephew Wound Management KK, Tokyo, Japan) で被覆した。各群 (HD-AM(-), HD-AM, HD-AM UD) はそれぞれ 5 匹のマウスで、それぞれ術後 7 日 (POD7) と術後 14 日 (POD14) で評価したため、合計 30 匹を用いた。創部は HD-AM や創傷被覆材がマウスの行動によって逸脱しないように、ステンレスメッシュ (0.06 mm Φ, 150m/s) でカバーした。

Figure 2

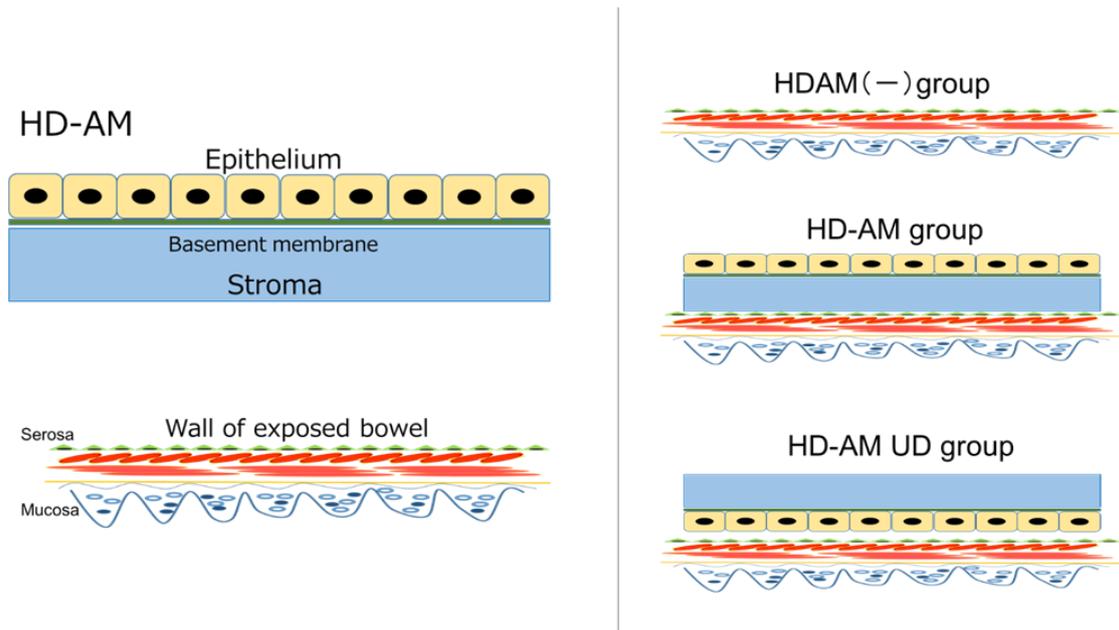


Figure 2.

Left: Schematic diagram of HD-AM and the exposed bowel wall. Right: HD-AM was placed over the wound area with the epithelial side facing upwards (HD-AM group), or with the stromal side facing upwards (upside down, HD-AM UD group). HD-AM was not used in the control group (HD-AM(-) group).

7. Histological and immunohistochemical staining

組織学的な観察のため、POD7 および 14 に露出腸管ごと各マウスから腹壁を採取した。パラフィンワックスに浸漬するために、エタノール系列および、Hemo-De で脱水した。次に、サンプルをパラフィンモールドに包埋し、厚さ 4 μ m の切片にスライスしてガラススライド上に載せて、ヘマトキシリン - エオジン (H&E) およびアザンで染色した。また、免疫組織化学的染色を、7 日目および 14 日目に検体についてそれぞれ実施した。組織切片は CD163 (1 : 500, 10 μ g/ml, Abcam, Cambridge, UK) 、TGF β -1 (transforming growth factor beta-1 ; 20 μ g/ml, Abcam, Cambridge, UK) 、VEGF (vascular endothelial growth factor ; 1 : 500, Abcam, Cambridge, UK) に対する一次抗体とともに翌朝までインキュベートし、ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体 (Nichirei biosciences Inc., Tokyo, Japan) で処理した。発色現像試薬は DAB キット (Nichirei biosciences Inc., Tokyo, Japan) で処理することにより得た。染色された組織を、Leica DMRBE 顕微鏡 (Leica, Wetzlar, Germany) および DP73 system (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

8. Measurement of the granulation tissue on the exposed bowel

肉芽組織の観察のため、アザン染色でコラーゲン繊維とフィブリンとの区別を容易にした。コラーゲン繊維を含有する肉芽組織の厚さは、Olympus CellSens イメージングプログラム (バージョン 1.7; Olympus Co., Tokyo, Japan) を用いて測定した。測定部位は、露出腸管が左右の筋層に固定された位置から中心および、中心から両側 5mm とし、測定された 3 点の平均値を計算した (Figure 4a)。

9. Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain reaction (q RT-PCR)

露出腸管上の肉芽組織中の mRNA を抽出するために、各試料から標的部位を選択的に採取した。採取する際には、露出した腸管の中央部分でどの検体も同様に肉芽組織を切離し、それらが採取部位や範囲の差異に影響されないように解剖学的に可能な限り一定にするようにした。Isogen II (Nippon Gene Co. LTD., Tokyo, Japan) を使用して、製造元の指示に従って全 mRNA を組織から抽出した。その mRNA の一部 3 μ g を室温で 15 分間、デオキシリボヌクレアーゼ I (DNase I, Sigma-Aldrich, Inc., Tokyo, Japan) で処理した。

Rever Tra Ace qPCR RT Kit (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて 500ng の DNase I 処理 RNA を用いて cDNA を合成した。遺伝子発現は、Mx3000P 定量ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) システム (Stratagene; Agilent Technologies Japan Ltd, Japan) を用いて、Brilliant SYBR Green QRT-PCR Mix (Stratagene; Agilent Technologies Japan Ltd, Japan) を用いてリアルタイム RT-PCR 分析により定量した。POD7 および POD14 において 5 匹のマウス/群ごとに mRNA を抽出し、成長因子である TGF β 1³⁰, VEGFA³¹, α -SMA³², bFGF³³, PDGF³⁴, 細胞遊走系ケモカインの CXCL-5³⁵, SDF-1³⁵, 抗炎症性 M2 マクロファージのマーカーである CD163,³⁶ 抗炎症サイトカインの IL-10³⁷, 炎症系サイトカインの IL-6³⁷, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)³⁸, inducible nitric oxide synthase (iNOS)³⁸

について triplicate で測定した。サイトカインの変動が術後変化であることを明確にするために、モデルマウス 5 匹を作成した直後に組織を採取し、POD0 として手術直後における各プライマーの mRNA 発現量を調べた。各 mRNA の発現量は GAPDH を内部コントロールとして補正し、POD7 の HD-AM(-)群の平均値を基準として相対比較した。今回用いたプライマーは以下のとおりで、配列は Table1 に示す。

Table1

Mouse primer	Forward	Reverse	Annealing Temp(°C)
TGF- β 1	CAACAATTCCTGGCGTTACCTTGG	GAAAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT	60
VEGFA	CACAGCAGATGTGAATGCAG	TTTACACGTCTGCGGATCTT	60
α -SMA	CCCCTGAAGAGCATCGGACA	TGGCGGGGACATTGAAGGT	60
b FGF	CAACCGGTACCTTGCTATGA	TCCGTGACCGGTAAGTATTG	60
PDGF	TGTGCCCATTCGCAGGAAG	GAGGTATCTCGTAAATGACCGTC	56
CXCL-5	TTCATGAGAAGGCAATGCTG	CCCAGGCTCAGACGTAAGAA	56
SDF-1	GAGAGCCACATCGCCAGAG	TTTCGGGTCAATGCACACTTG	54
CD163	GGACAGATCTGGGGTGAAGA	ATCCCTGCTGTGGGTACAAG	56
IL-10	ATAACTGCACCCACTTCCCA	GGGCATCACTTCTACCAGGT	55
IL-6	CCTCTGGTCTTCTGGAGTACC	ACTCCTTCTGTGACTCCAGC	55
TNF α	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG	60
iNOS	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA	GTGGACGGGTCGATGTCAC	60
GAPDH	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	57

10. Blood figure analysis

血液検体は各群 5 匹のマウスから POD7、および POD14 にそれぞれ採取し、Fuchs-Rosenthal cell counter plate を用いて目視で計測した。

11. ELISA

採取した血液検体を 2500rpm・8 分間で遠心分離し血漿を分離後、直ちに-80°Cで保存した。マウスに特異的な炎症マーカーである Serum Amyloid P (SAP) の血中濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (HELICA BIOSYSTEMS, INC.USA) を使用し duplicate で測定した。

12. Statistical analysis

全ての値は標準誤差を表示している。統計ソフトウェア(SPSS Statistics ver. 25 for Windows; IBM, Tokyo, Japan)を使用し、Student's t-test および Fisher's exact test で検定した。

Results

1. EAF occurred in experimental mouse model.

我々が作成した実験モデルで露出腸管をガーゼだけ被覆したところ、POD14で3匹中1匹にEAFが発生した。瘻孔は挙上した腸管の頭側に位置し、直径0.5mmであった。瘻孔の周囲は唇のように盛り上がり、臨床で見られるEAFと肉眼上は同様の形態であった（Figure 3、左）。組織学的には、皮下の盲腸壁の構造は正常に保たれているようであるが、露出部分の腸壁は破裂していた（Figure 3右、矢印）。

Figure3

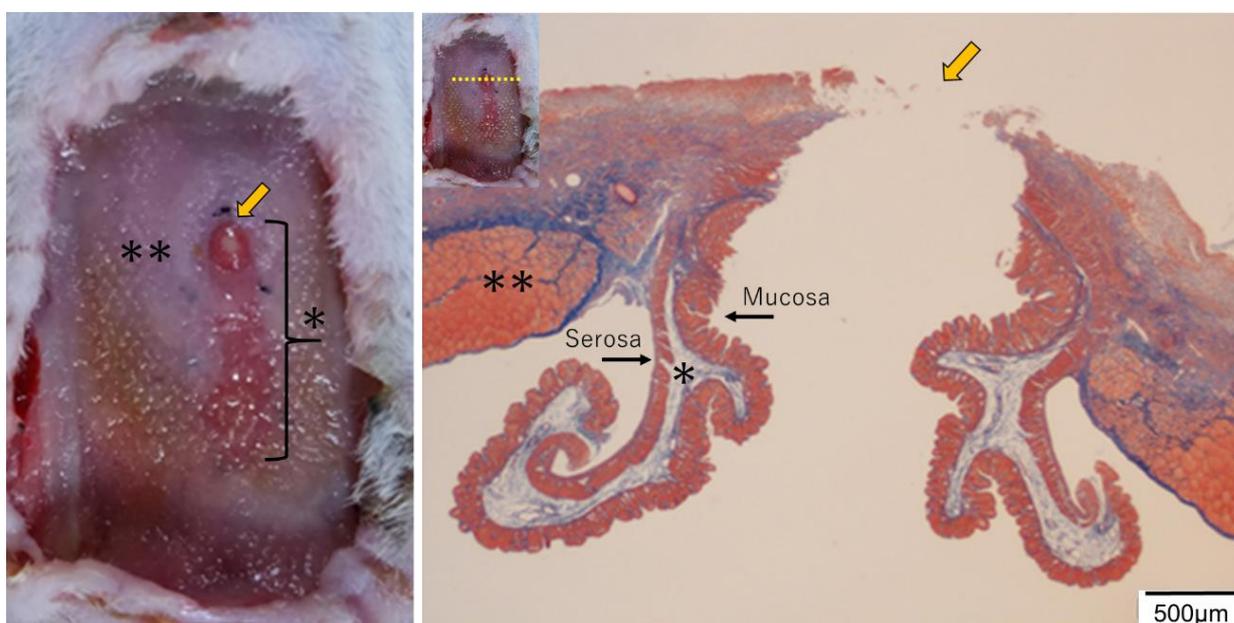


Figure 3.

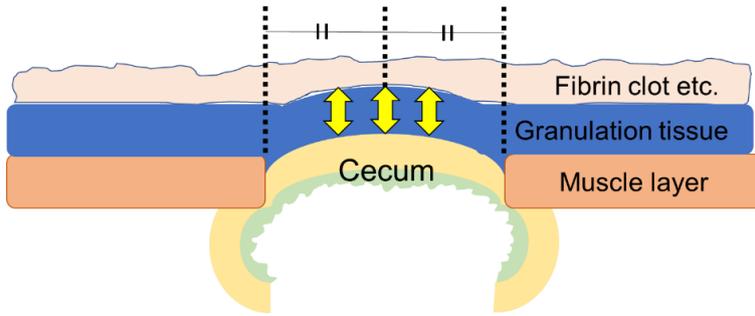
Macro- and microscopic photographs of the EAF (*lifted cecum, **abdominal muscle layer). Left: The fistula located on the cranial side of the exposed bowel (yellow arrow). Right: A section of the white dotted line was observed histologically using an azan stain (x25), granulation tissue and a fibrin clot observed on the wound site, and the wall of the lifted cecum was irregular in presentation (yellow arrow).

2. Evaluation the thickness of granulation tissue on the exposed bowel

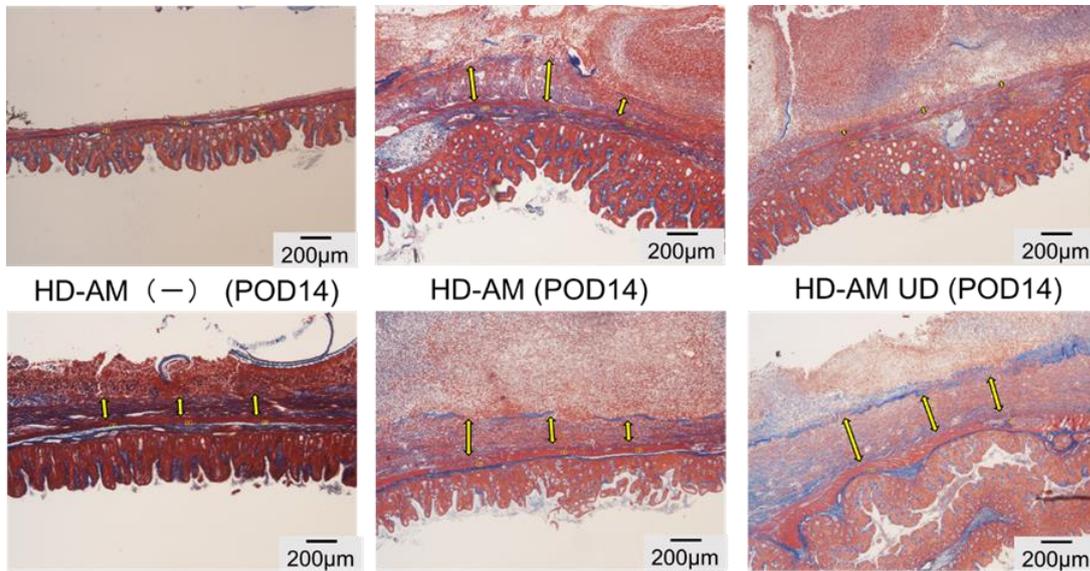
各群で露出腸管上の肉芽組織の厚さを測定し、POD7および14において比較した。HD-AM群およびHD-AM UD群は、HD-AM(-)群よりもPOD7および14の両方で肉芽組織が有意に厚かった ($p < 0.05$ および $p < 0.01$)。一方、POD7上においてはHD-AM群はHD-AM UD群と比較して有意に肉芽組織が厚かった ($p < 0.05$) が、POD14では同程度となった (Figure 4a-c)。

Figure 4

(a)



(b)



(c)

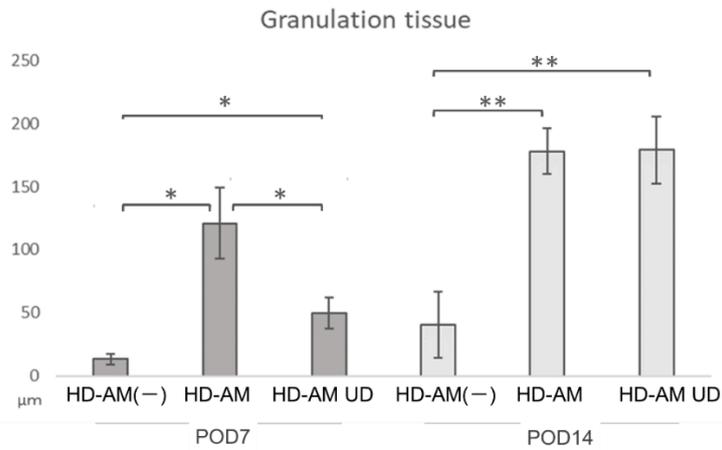


Figure 4.

(a) Schematic diagram of a method for measuring the thickness of granulation tissue.

Granulation tissue increases on the exposed bowel, with a fibrin clot. The yellow arrow indicates the thickness of the granulation tissue. A total of 3 points involving a central part and a point 5 mm either side of the central part were measured and averaged. (b) Representative microscopic photos of each group (x50). The thickness of the granulation tissue is indicated with a yellow arrow. The control group (on POD 7) does not have an arrow because the granulation tissue was too thin. (c) A graph comparing the measured average thickness of the granulation tissue. The HD-AM group showed significantly thicker granulation tissue on both POD 7 and POD 14 than the control group. The thickness of the granulation tissue in the HD-AM UD group on POD 7 was significantly poorer than in the HD-AM group (n = 5, *p < 0.05, **p < 0.01).

3. Cell infiltration into HD-AM

HD-AM 群で HD-AM 内への細胞浸潤の所見をしばしば認めた。この所見は HD-AM UD 群には認めなかった。細胞浸潤は、HD-AM 5/10、HD-AM UD 0/10 の割合で観察され、HD-AM 群で有意に多かった(p < 0.05)。 (Figure 5a, b).

Figure5

(a)

Infiltration(+)	POD7	POD14
HD-AM	2/5	3/5
HD-AM UD	0/5	0/5

(b)

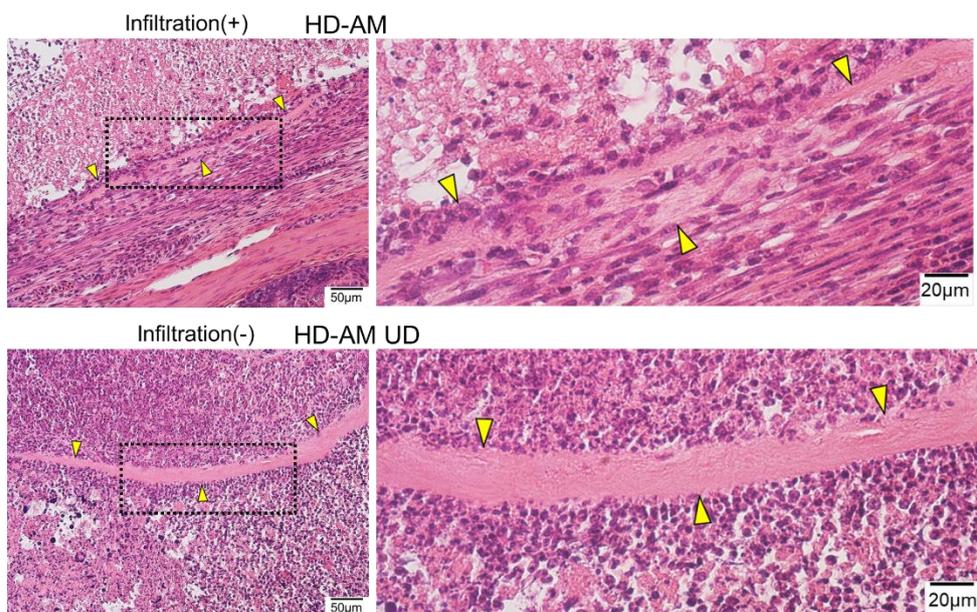


Figure 5.

Observation of cell infiltration into the HD-AM using H-E stain ($\times 200$). Yellow allows indicate HD-AM. (a) The results of cell infiltration are shown in the table. Infiltration was observed in 2 of 5 mice on POD 7 and 3 of 5 mice on POD 14 in the HD-AM group, but no infiltration in the HD-AM UD group. (b) Photographs above: cell infiltration was observed into HD-AM. Photographs below: cell infiltration was not observed.

4. Quantitative RT-PCR

4.1 Assessment of POD0 based expression compared with HD-AM(-) group at POD 7.

VEGFA、 α -SMA、PDGF 以外のサイトカインは、手術直後 (POD0) にはほとんど発現していなかった (図 6a)。

4.2 Growth factor and cell migration chemokine (Fig 6b)

TGF β -1 の発現は、POD 7 において HD-AM および HD-AM UD 群が HD-AM(-)群よりも有意に高かったが、POD 14 ではいずれも逆転した。TGF β 1 と同様に、CXCL-5 は POD7 において HD-AM(-)群よりも HD-AM 群のほうが有意に高かったが、POD14 ではやはり逆転した。VEGF は POD 7 での HD-AM UD 群のみ HD-AM(-)群より優位に高く、SDF-1 の発現は POD14 で HD-AM(-)群より、HD-AM 群および HD-AM UD 群が有意に低かった。その他の成長因子については特に有意差は認めなかった。

4.3 Anti-inflammatory marker (Figure 6c)

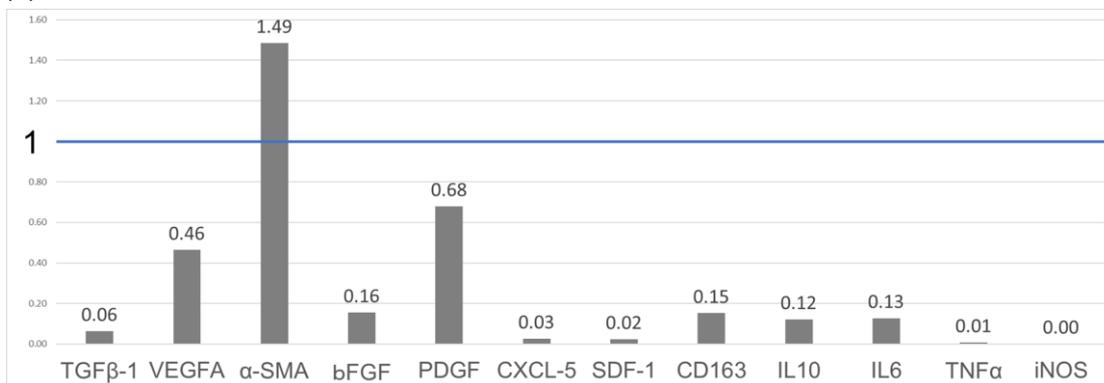
CD163 は POD7 において HD-AM(-)群と比較して HD-AM 群で有意に高く発現していた。IL-10 については、POD 7 において HD-AM UD 群は HD-AM(-)群よりも有意に高く発現していた。また有意差はないものの、POD7 において HD-AM 群は HD-AM(-)群より高い傾向があった ($p = 0.057$)

4.4 Inflammatory marker (Figure 6d)

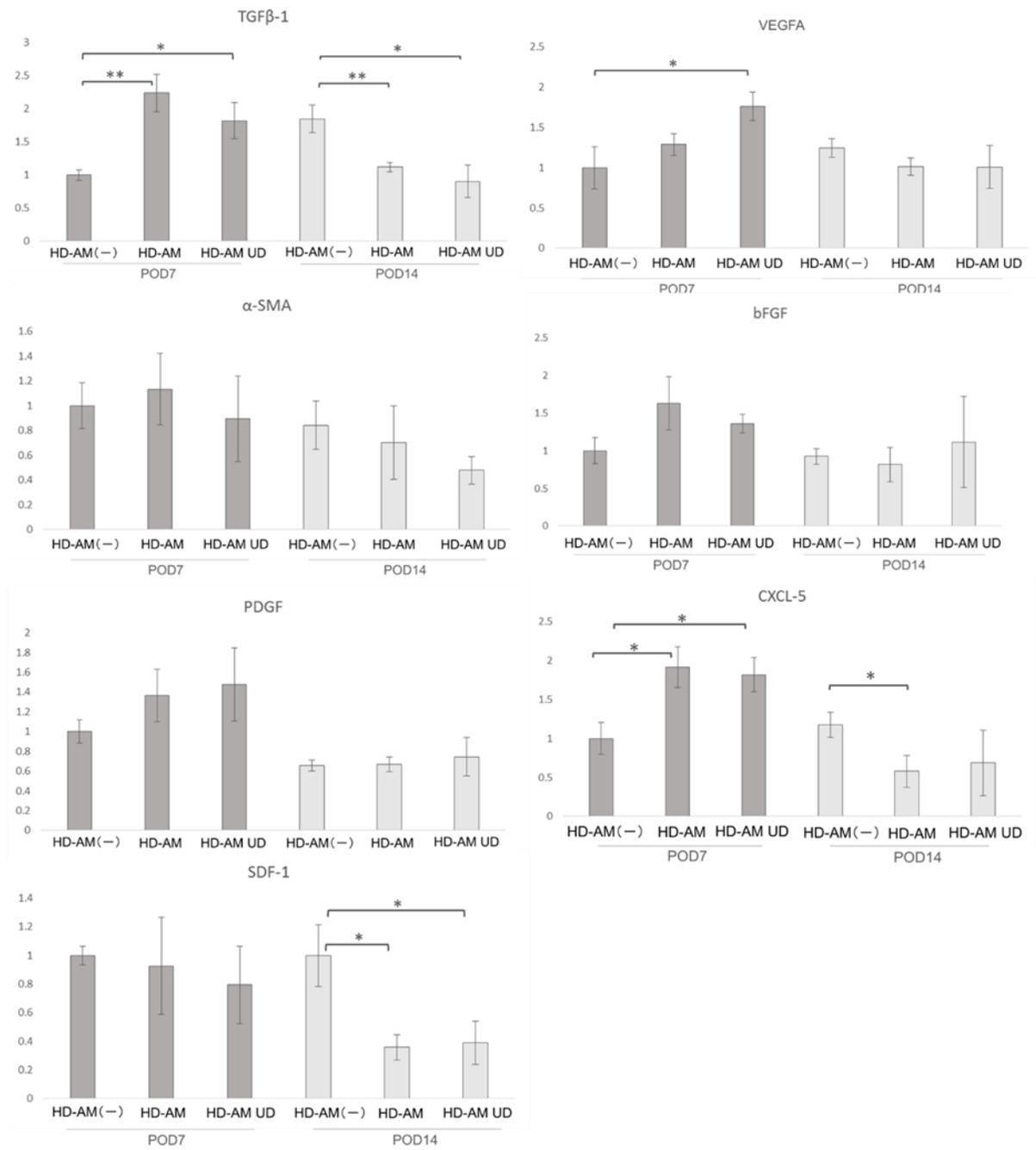
IL-6、TNF- α 、iNOS の発現に各群との比較で有意差は認めなかった。

Figure6

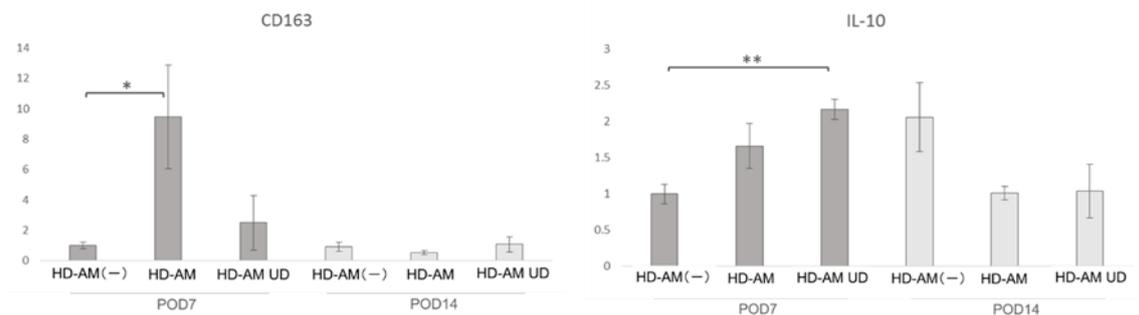
(a)



(b)



(c)



(d)

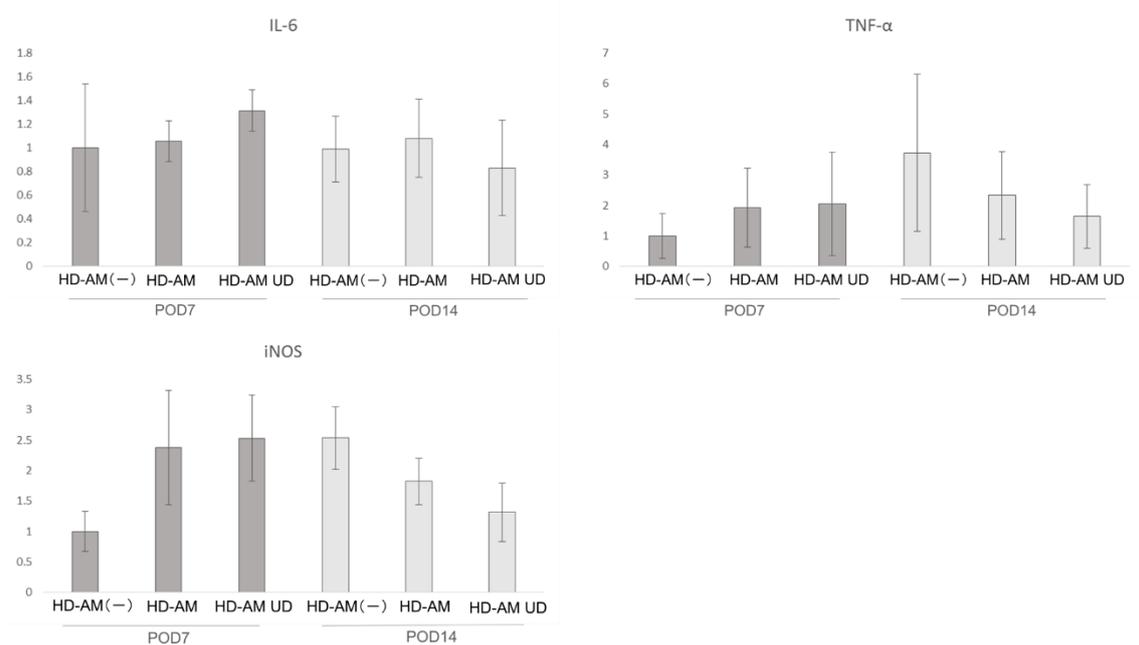


Figure 6.

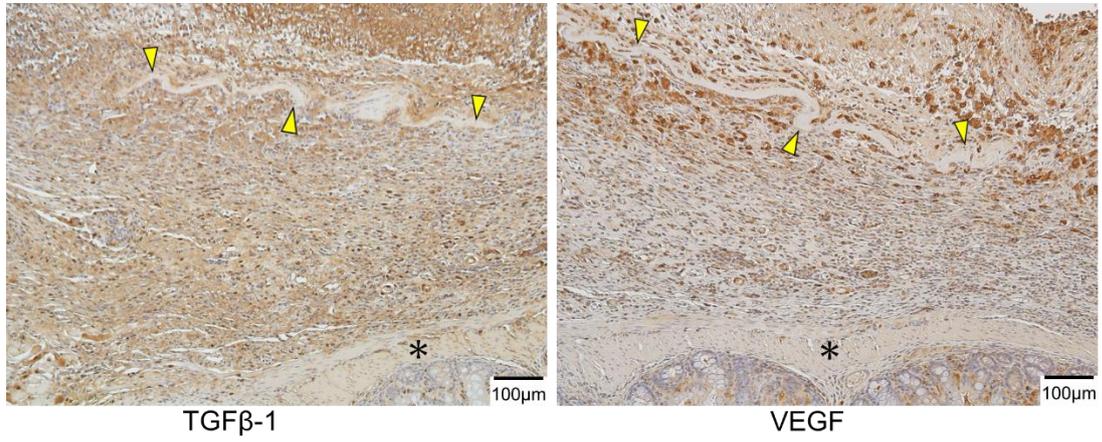
A graph showing the average of RNA relative values of each group based on the control group on POD 7 ($n = 5$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$). (a) The relative value on POD 0 was represented with a graph, assuming that the RNA value in each primer in the HD-AM(-) group on POD 7 was 1 (blue line), (b) growth factors and cell migration chemokines, (c) anti-inflammatory markers and, (d) inflammatory markers.

5. Immunohistochemical staining

TGF β -1、VEGF および CD163 について、免疫組織化学染色により局在を調べた。TGF β -1 および VEGF は、創傷の滲出液中および羊膜周辺で高度に発現した (Figure 7a)。注目すべきことに、POD7 において CD163 は HD-AM の上皮側に集簇するように発現していた (Figure 7b、矢印)。

Figure7

(a)



(b)

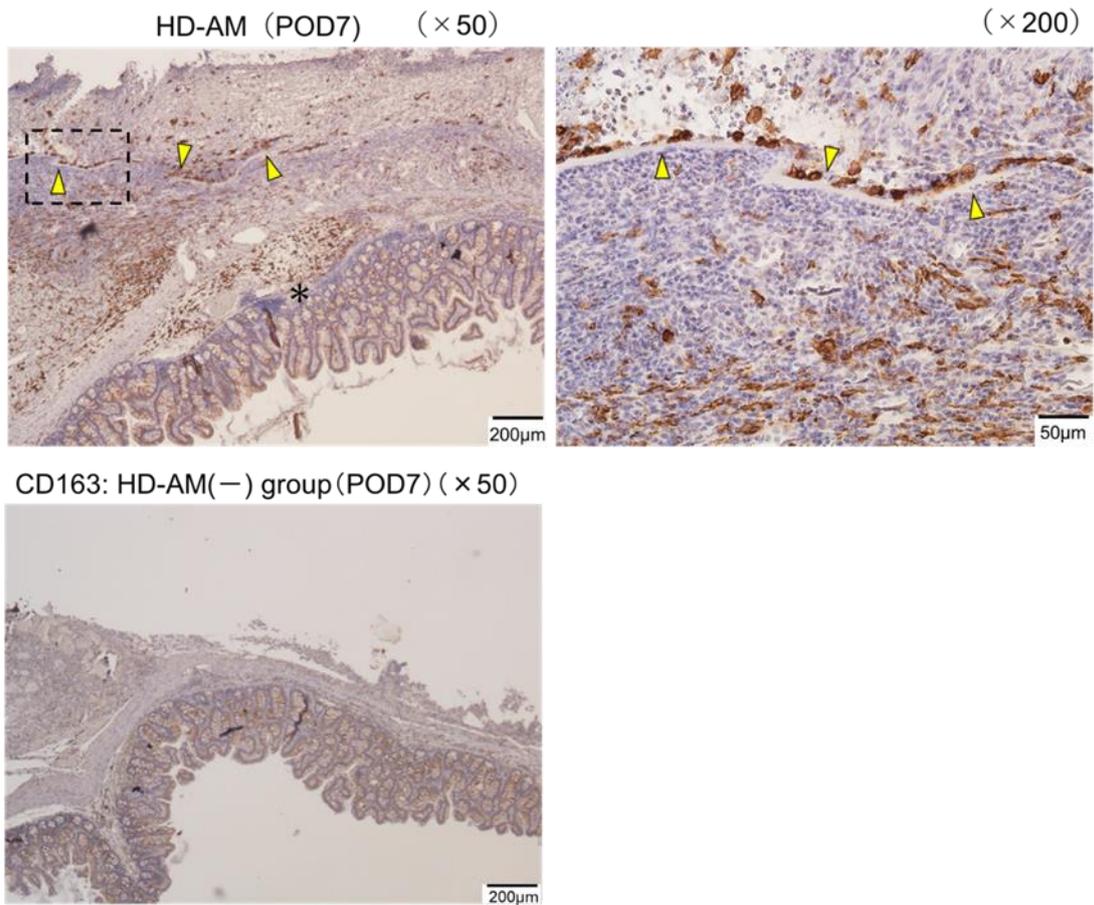


Figure 7.

Immunohistochemical staining. Yellow arrows indicate HD-AM, *exposed bowel

(a) Left: TGFβ-1 staining (x 100), right: VEGF staining (x 100), (b) Above: CD163 staining, a

focused part of the dotted frame on the left photograph (x 50) has been enlarged and is shown in the right photograph (x 200). The epithelial side of the HD-AM is the upper-side, and the stroma side is the under-side. Below: CD163 staining of the control group (x 50).

6 Blood test

POD7においてWBCの数はHD-AM群で5020/μl、HD-AM(-)群では5610/μlであり、SAP値はそれぞれ27.3ng/mlおよび36.6ng/mlであった。POD14においては、WBCの数はHD-AM群で10710/μl、HD-AM(-)群では9590/μl、SAP値はそれぞれ14.4ng/mlおよび12.1ng/mlであった。POD7のSAP値はHD-AM(-)群よりもHD-AM群で低い傾向(p = 0.077)があったが、いずれも有意差はなかった。HD-AM群とHD-AM UD群との間にも有意差はなかった (Figure 8)

Figure8

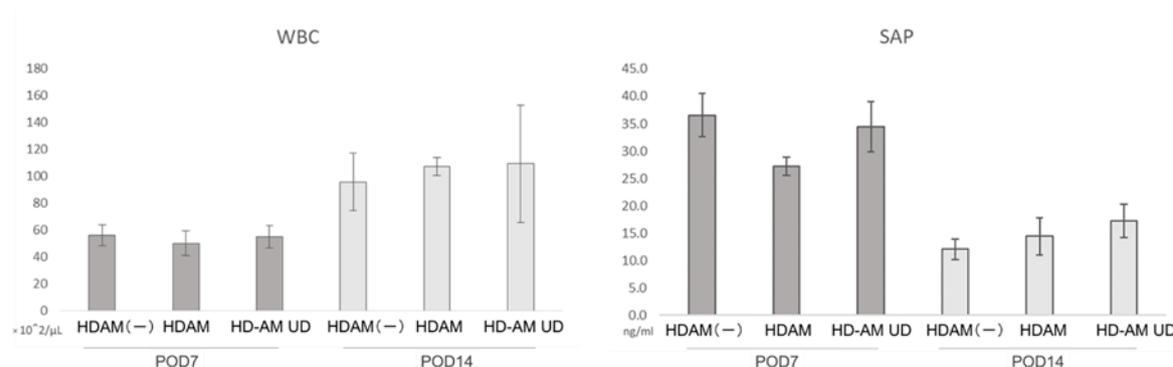


Figure 8.

The average number of WBC and SAP values were compared between the HD-AM group and the control group (n = 5).

Discussion

我々が作成したマウスの実験モデルは、肉眼的に臨床現場で見られるものと同様の EAF を再現した。これにより、このモデルが組織学的および免疫組織化学的、分子生物学的に露出腸管上における創傷治癒を評価するモデルとして適切であると考えられた。

露出腸管上に置いた HD-AM は肉芽組織の厚さを明らかに増加させた。興味深いことに、AM の表裏を逆にすると (HD-AM UD)、POD7 において肉芽の厚さは表側に置いた時よりも有意に劣っていた。組織学的には、肉芽に AM の間質側が接していると間質側から AM 内へ細胞が入り込んでいくが、上皮側が接している AM 内への細胞浸潤が阻害されている。これは AM の上皮側は間質側に比べて細胞の足場としての機能が劣っていることを示していると考えられる³⁹。過去の研究で言及されているとおり、AM の scaffold 機能は肉芽組織の再生に重要な役割を果たすと考えられている。眼科の分野においては“inlay”および“onlay”テクニックは、損傷した結膜の上皮細胞が移動して上皮欠損を閉鎖させることを意図する場合、もしくは一時的な抗炎症効果を狙った場合など治療の目的に応じて、羊膜の表裏を選択的に使用することが報告されている¹³。同じような効果は露出腸管に対する臨床使用におけるテクニックとしても期待できるかもしれない。

今回測定した各種増殖因子、細胞遊走性ケモカインおよび抗炎症性サイトカインは肉芽組織の増殖を促進するための関連因子であると考えられている。TGFβ-1 は、細胞増殖、遊走、分化などの機能を有し、創傷治癒の初期段階において重要な成長因子であると言われている⁴⁰。さらには VEGF の発現を誘導し、他の増殖因子と協力して創傷治癒に作用するが、過剰な発現および増殖の遷延は瘢痕形成および線維症を引き起こすと言われている⁴¹。本実験において、TGFβ-1 は POD7 において HD-AM 群、HD-AM UD 群で有意に増加したが、逆に POD14 では HD-AM(-)群と比較して他 2 群が有意に低値となっている。この結果は、過去に報告されている羊膜の創傷治癒および瘢痕抑制効果の促進を示していると考えられる^{13,46,47}。AM は創傷治癒の早期に成長因子を有意に増加させるが、後期には抑制するように働く⁴¹。CXCL-5 は、強力な好中球移動および活性化能を有するケモカインである。この実験では TGFβ-1 と同様に、POD 7 において HD-AM 群で HD-AM(-)群より有意に高かったが、POD 14 では、HD-AM(-)群より有意に低下した。好中球は創傷部位に集まり、創傷治癒および感染予防において重要な役割を果たす^{48,49}。一方、好中球から分泌されるプロテアーゼは、重大な組織損傷を引き起こすことが知られており⁵⁰、過剰な好中球活性が慢性創傷に関連することも報告されている^{51,52,53,54}。HD-AM は、CXCL5 に関しても創傷治癒早期に増加させて、その後急速に減少させることによって早期には感染を予防し創傷治癒を促進するよう働きながらも、後期には過剰な組織損傷を予防するために好中球の移動を抑制するよう働いている可能性がある。

なお、免疫化学的染色により観察された TGFβ-1 や VEGF のような増殖因子の局在については、フィブリンのような創傷部位の滲出液中や HD-AM の周囲に発現していた。これ

は、足場としての HDAM または浸出液中を移動した各種細胞によって増殖因子が分泌されるためと考えられる。

興味深いことに、CD163 についても POD7 で HD-AM(-)群と比較して HD-AM 群は有意に高い。マクロファージは、主に 2 つのサブタイプに分類することができ、M1 マクロファージは創傷治癒の炎症期に働くが、M2 マクロファージは修復期に働き、炎症を抑制し、組織を再構築する働きがある⁵⁵⁵⁶⁵⁷。免疫組織化学的染色では、CD163 は AM の上皮側に集簇している。マクロファージは羊膜を足場として移動するだけでなく、AM の上皮側で M2 サブタイプへの変換を受けているのではないかと考えられる。最近の研究で、羊膜が M2 マクロファージへの分化を調節することが明らかにされた³⁸ が、同様の反応が HD-AM においても認められている。HD-AM による早期の M2 マクロファージへの分化は、抗炎症および組織修復のための重要な因子と考えられる。また、抗炎症マーカーである IL-10 についても、POD7 において HD-AM UD 群で有意に高く、HD-AM 群 (P = 0.057) でも高い傾向を示した。

一方、羊膜の抗炎症効果の特性から炎症系サイトカインについては HD-AM 群や HD-AM UD 群で減少すると予想したが、予想に反して HD-AM (-) 群と比較して有意差は観察されなかった。これらの結果は、HD-AM が抗炎症サイトカインの発現を促進するものの、炎症性サイトカインについては阻害しないことを示唆している。一般的に炎症の存在が創傷治癒に必須であることを考慮すると、合理的な結果であると考えられる。

血清 SAP 値については POD7 において HD-AM 群で HD-AM(-)群より低い傾向 (p = 0.77) を認めたが、白血球数については有意差を認めなかった。HD-AM の影響は局所的であり、全身的な影響は少ないことを示していると考えられる。

我々の研究の limitation としては、実験対象がマウスであり、サンプルサイズが小さいことが挙げられる。さらに、この実験では、感染の有無に関する検討は行われなかった。また、創部を覆うドレッシング材による効果の違いについても検討していない。ヒトへの実際的な臨床応用に際しては、さらなる研究が必要である。

Conclusion

HD-AM は、露出腸管上の肉芽増生を促進した。そのメカニズムは、HD-AM の足場機能、成長因子および遊走ケモカインの誘導、および M2 マクロファージへの分化の調節、抗炎症効果が関与していた。HD-AM は、腸管露出を伴う開放創に対する有用かつ実現可能な生体材料であると考えられる。

Conflict of interest

本研究に関して開示すべき利益相反は無い。

Acknowledgement

本研究の機会を与え、4年間に渡るご指導およびご支援を下さいました危機管理医学講座の奥寺敬教授、並びに再生医学教室の二階堂敏雄教授、吉田淑子准教授、岡部素典助教、相古千加助教、および専門的な技術指導で実験を支えて頂きました古市恵津子さんに深く感謝いたします。

References

1. van Ramshorst, G. H. *et al.* Therapeutic alternatives for burst abdomen. *Surg. Technol. Int.* **19**, 111–119 (2010).
2. Pereboom, I. T. A. & Hofker, H. S. A Mechanical Explanation for the Development of Enteroatmospheric Fistulas in Open Abdomen. *Dis. Colon Rectum* **59**, 471–475 (2016).
3. Terzi, C., Egeli, T., Canda, A. E. & Arslan, N. C. Management of enteroatmospheric fistulae. *Int. Wound J.* **11**, 17–21 (2014).
4. Mastboom, W. J., Kuypers, H. H., Schoots, F. J. & Wobbes, T. Small-bowel perforation complicating the open treatment of generalized peritonitis. *Arch. Surg.* **124**, 689–92 (1989).
5. Trzeciak, P. W., Porzezynska, J., Ptasinska, K. & Walczak, D. A. Abdominal Cavity Evisceration Treated by Means of the ‘Open Abdomen’ Technique Using the Negative Pressure Therapy System - Case Report and Literature Review. *Pol. Przegl. Chir.* **87**, 592–597 (2015).
6. Gisore, J. O. & Khainga, S. O. NEGATIVE PRESSURE WOUND THERAPY (NPWT) FOR THE MANAGEMENT OF LAPAROSTOMY WOUNDS: CASE SERIES. *East Afr. Med. J.* **90**, 409–412 (2013).
7. Argenta, L. C. & Morykwas, M. J. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience. *Ann. Plast. Surg.* **38**, 563–76; discussion 577 (1997).
8. Kaplan, M. *et al.* *Guidelines for the management of the open abdomen. Wounds* (2005).
9. Francisco, J. C. *et al.* Decellularized Amniotic Membrane Scaffold as a Pericardial Substitute: An In Vivo Study. *Transplant. Proc.* **48**, 2845–2849 (2016).
10. Jerman, U. D., Veranič, P. & Kreft, M. E. Amniotic membrane scaffolds enable the development of tissue-engineered urothelium with molecular and ultrastructural properties comparable to that of native urothelium. *Tissue Eng. Part C. Methods* **20**, 317–27 (2014).
11. Zheng, Y. *et al.* Topical administration of cryopreserved living micronized amnion accelerates wound healing in diabetic mice by modulating local microenvironment. *Biomaterials* **113**, 56–67 (2017).
12. Ahn, J. I. *et al.* Reconstruction of rabbit corneal epithelium on lyophilized amniotic membrane using the tilting dynamic culture method. *Artif. Organs* **31**, 711–721 (2007).
13. Meller, D., Pauklin, M., Thomasen, H., Westekemper, H. & Steuhl, K.-P. Amniotic Membrane Transplantation in the Human Eye. *Dtsch Arztebl Int* **108**, 243–248 (2011).
14. Gholipourmalekabadi, M. *et al.* Decellularized human amniotic membrane: more is needed for an efficient dressing for protection of burns against antibiotic-resistant

- bacteria isolated from burn patients. *Burns* **41**, 1488–1497 (2015).
15. Talmi, Y. P., Sigler, L., Inge, E., Finkelstein, Y. & Zohar, Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* **12**, 285–288 (1991).
 16. Tehrani, F. A., Ahmadiani, A. & Niknejad, H. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane. *Cryobiology* **67**, 293–298 (2013).
 17. Arai, N. *et al.* Clinical application of a hyperdry amniotic membrane on surgical defects of the oral mucosa. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **70**, 2221–2228 (2012).
 18. Kubo, M., Sonoda, Y., Muramatsu, R. & Usui, M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 1539–1546 (2001).
 19. Tauzin, H. *et al.* A skin substitute based on human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank.* **15**, 257–265 (2014).
 20. Gruss, J. S. & Jirsch, D. W. Human amniotic membrane: A versatile wound dressing. *Can. Med. Assoc. J.* **118**, 1237–1246 (1978).
 21. Fairbairn, N. G., Randolph, M. A. & Redmond, R. W. The clinical applications of human amnion in plastic surgery. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* **67**, 662–675 (2014).
 22. Okabe, M. *et al.* Hyperdry human amniotic membrane is useful material for tissue engineering: Physical, morphological properties, and safety as the new biological material. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **102**, 862–870 (2014).
 23. Toda, A., Okabe, M., Yoshida, T. & Nikaido, T. The Potential of Amniotic Membrane/Amnion-Derived Cells for Regeneration of Various Tissues. *J. Pharmacol. Sci.* **105**, 215 – 228 (2007).
 24. Arai, N. *et al.* Clinical application of a hyperdry amniotic membrane on surgical defects of the oral mucosa. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **70**, 2221–8 (2012).
 25. Tsuno, H. *et al.* Intraoral application of hyperdry amniotic membrane to surgically exposed bone surface. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **117**, e83-87 (2014).
 26. Okabe, M. *et al.* Application of 2-octyl-cyanoacrylate for corneal perforation and glaucoma filtering bleb leak. *Clin. Ophthalmol.* **7**, 649–653 (2013).
 27. Tomita, T. *et al.* New dried human amniotic membrane is useful as a substitute for dural repair after skull base surgery. *J. Neurol. Surgery, Part B Skull Base* **73**, 302–307 (2012).
 28. Qi, F. *et al.* Construction and characterization of human oral mucosa equivalent using hyper-dry amniotic membrane as a matrix. **65**, 26–34 (2016).
 29. Okabe, M. *et al.* Hyperdry human amniotic membrane is useful material for tissue engineering: Physical, morphological properties, and safety as the new biological

- material. *J Biomed Mater Res A* 862–870 (2013). doi:10.1002/jbm.a.34753
30. Li, S. W. *et al.* SARS coronavirus papain-like protease induces Egr-1-dependent up-regulation of TGF- β 1 via ROS/p38 MAPK/STAT3 pathway. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
 31. He, C. *et al.* Vasoprotective effect of PDGF-CC mediated by HMOX1 rescues retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 14806–14811 (2014).
 32. Veres-Székely, A. *et al.* Selective measurement of α smooth muscle actin: Why β -actin can not be used as a housekeeping gene when tissue fibrosis occurs. *BMC Mol. Biol.* **18**, (2017).
 33. Tahiri, H. *et al.* Lymphocytic Microparticles Modulate Angiogenic Properties of Macrophages in Laser-induced Choroidal Neovascularization. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
 34. Johnston, A. P. W. *et al.* Dedifferentiated Schwann Cell Precursors Secreting Paracrine Factors Are Required for Regeneration of the Mammalian Digit Tip. *Cell Stem Cell* **19**, 433–448 (2016).
 35. Mishra, P. J. Cell-free derivatives from mesenchymal stem cells are effective in wound therapy. *World J. Stem Cells* **4**, 35 (2012).
 36. Charania, M. A. *et al.* Intestinal epithelial CD98 synthesis specifically modulates expression of colonic microRNAs during colitis. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* **302**, G1282–G1291 (2012).
 37. Liu, T. *et al.* Vitamin D treatment attenuates 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis but not oxazolone-induced colitis. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
 38. Magatti, M. *et al.* Human amnion favours tissue repair by inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2 macrophage features. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **11**, 2895–2911 (2017).
 39. Perepelkin, N. M. J. *et al.* Cryopreserved amniotic membrane as transplant allograft: viability and post-transplant outcome. *Cell Tissue Bank.* **17**, 39–50 (2016).
 40. Leydon, C., Imaizumi, M., Bartlett, R. S., Wang, S. F. & Thibeault, S. L. Epithelial cells are active participants in vocal fold wound healing: An in vivo animal model of injury. *PLoS One* **9**, (2014).
 41. Song, M. *et al.* The repairing of full-thickness skin deficiency and its biological mechanism using decellularized human amniotic membrane as the wound dressing. *Mater. Sci. Eng. C* **77**, 739–747 (2017).
 42. Gilbert, R., Vickaryous, M. & Vilorio-Petit, A. Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Wound Healing and Tissue Regeneration. *J. Dev. Biol.* **4**, 21 (2016).
 43. Lu, S. W. *et al.* Clodronate liposomes reduce excessive scar formation in a mouse model of burn injury by reducing collagen deposition and TGF- β 1 expression. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 2143–2149 (2014).

44. Palumbo-Zerr, K. *et al.* Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor- β signaling and fibrosis. *Nat. Med.* **21**, 150–158 (2015).
45. Lin, R. Y. *et al.* Exogenous transforming growth factor-beta amplifies its own expression and induces scar formation in a model of human fetal skin repair. *Ann. Surg.* **222**, 146–154 (1995).
46. Zhao, B. *et al.* Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation. *J. Mol. Histol.* **48**, 121–132 (2017).
47. Mohammadi, A., Eskandari, S., Johari, H. & Rajabnejad, A. Using amniotic membrane as a novel method to reduce post-burn hypertrophic scar formation: a prospective follow-up study. *J. Cutan. Aesthet. Surg.* **10**, 13–17 (2017).
48. Theilgaard-Monch, K., Knudsen, S., Follin, P. & Borregaard, N. The Transcriptional Activation Program of Human Neutrophils in Skin Lesions Supports Their Important Role in Wound Healing. *J. Immunol.* **172**, 7684–7693 (2004).
49. Nathan, C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology* **6**, 173–182 (2006).
50. Faurschou, M. & Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* **5**, 1317–1327 (2003).
51. Dovi, J. V. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J. Leukoc. Biol.* **73**, 448–455 (2003).
52. Martin, P. *et al.* Wound healing in the PU.1 null mouse - Tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr. Biol.* **13**, 1122–1128 (2003).
53. Moor, A. N., Vachon, D. J. & Gould, L. J. Proteolytic activity in wound fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* **17**, 832–839 (2009).
54. Grinnell, F. & Zhu, M. Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, α 1-proteinase inhibitor, and α 2-macroglobulin. *J. Invest. Dermatol.* **106**, 335–341 (1996).
55. Bowdish, D. M. E. in *Encyclopedia of Immunobiology* **1**, 289–292 (2016).
56. Leoni, G., Neumann, P. A., Sumagin, R., Denning, T. L. & Nusrat, A. Wound repair: Role of immune-epithelial interactions. *Mucosal Immunology* **8**, 959–968 (2015).
57. Shi, J., Wu, Z., Li, Z. & Ji, J. Roles of Macrophage Subtypes in Bowel Anastomotic Healing and Anastomotic Leakage. *J. Immunol. Res.* **2018**, 1–8 (2018).