

氏名 あまの こうじ
天野 浩司

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 285 号

学位授与年月日 平成 31 年 3 月 26 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 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

学位論文題目

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

(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)

論文審査委員

(主査)	教授	野口	誠
(副査)	教授	笹原	正清
(副査)	教授	西田	尚樹
(副査)	教授	安田	一朗
(指導教員)	教授	奥寺	敬

論文内容の要旨

(目的)

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。もし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。ハイパードライヒト乾燥羊膜 (**HD-AM**) を開発し、羊膜を滅菌・保存可能にしたことにより、このような緊急性の高い臨床例にも応用できる道が拓けた。本研究では露出腸管を伴う開放創に対して **HD-AM** が有効かどうか、肉芽増生促進効果について調べ、その機序について明らかにすることを目的とした。

(方法ならびに成績)

まずは、マウスに手術操作を加えて露出腸管を伴う開放創のモデルを独自に作成した。このモデルで **EAF** が自然発生することを確認した。羊膜は上皮層、基底層、間質層の3層から成るが、この創部に上皮側を上にしたもの：**HD-AM** 群、裏返して間質側を上にしたもの：**HD-AM UD** 群、対照として羊膜を置かないもの：**HD-AM (-)** 群、の3群を作成して術後1週間 (**POD7**)、術後2週間 (**POD14**) で露出腸管上を覆った肉芽の厚さを比較したところ、羊膜を置いた群は表裏にかかわらず、いずれの時期でも有意に肉芽が厚かった。なお、**POD7** の時点では有意に **HD-AM** 群の肉芽が **HD-AM UD** 群よりも厚かった。創部に置かれた羊膜を組織学的に観察すると **HD-AM** 群は羊膜内に細胞浸潤が認められるのに対して、**HD-AM UD** 群では全く認められなかった。これは羊膜の **scaffold** としての機能が上皮側で弱いことを示していると考えられた。さらに、各種成長因子や細胞遊走ケモカイン、抗炎症および炎症系サイトカインを **quantitative RT-PCR** を用いて測定した。**POD7** において羊膜を置いた2群が **HD-AM (-)** 群よりも **TGF β -1** や **CXCL-5** が有意に高値となった。一方で **POD14** になるとその差はむしろ逆転した。これらのサイトカインは創傷治癒早期には有用であるが、発現高値が遷延した場合は瘢痕形成や慢性創傷化などの要因になると考えられており、**HD-AM** により瘢痕化や炎症遷延による組織障害が抑制できる可能性が示された。なお、組織再構築に働く抗炎症 **M2** マクロファージのマーカーである **CD163** については **POD7** での **HD-AM** 群で有意に高値を示した。免疫化学染色で局在を見ると羊膜の上皮側に集積しており、ここでマクロファージの分化に何らかの誘導がなされていることを思わせる興味深い結果であった。抗炎症サイトカインについては **IL-10** についても羊膜を置いたほうが低い傾向があったが、**IL-6**、**TNF- α** 、**iNOS** については有意差が無く、炎症系サイトカインの抑制に働いてはいないことが考えられた。白血球数、血清 **SAP** 値 (炎症マーカー) については有意差を認めなかった。

(総括)

HD-AM は腸管が露出した開放創に対して **Scaffold** としての機能、および成長因子の調節、抗炎症作用などにより肉芽増生促進に働く有用な被覆材となり得る。

学位論文審査の要旨

目的：

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。ハイパードライヒト乾燥羊膜 (HD-AM) を開発し、羊膜を滅菌・保存可能にしたことにより、このような緊急性の高い臨床例にも応用できる道が拓けた。本研究では露出腸管を伴う開放創に対する被覆材として HD-AM が有効かどうか、肉芽増生促進効果について調べ、その機序について明らかにすることを目的とした。

方法：

マウスに手術操作を加えて露出腸管を伴う開放創のモデルを独自に作成した。このモデルで EAF が自然発生することを確認した。羊膜は上皮層、基底層、間質層の 3 層から成るが、この創部に上皮側を上にしたもの:HD-AM 群、裏返して間質側を上にしたもの:HD-AM UD 群、対照として羊膜を置かないもの:HD-AM (-) 群、の 3 群を作成して術後 1 週間 (POD7)、術後 2 週間 (POD14) の時点でサンプルを得た。

結果と考察：

露出腸管上を覆った肉芽の厚さを比較したところ、羊膜を置いた群は表裏にかかわらず、いずれの時期でも有意に肉芽が厚かった。なお、POD7 の時点では有意に HD-AM 群の肉芽が HD-AM UD 群よりも厚かった。創部に置かれた羊膜を組織学的に観察すると HD-AM 群は羊膜内に細胞浸潤が認められるのに対して、HD-AM UD 群では全く認められなかった。これは羊膜の scaffold としての機能が上皮側で弱いことを示していると考えられた。さらに、各種成長因子や細胞遊走ケモカイン、抗炎症および炎症系サイトカイン mRNA の発現を quantitative RT-PCR を用いて測定した。POD7 において羊膜を置いた 2 群において HD-AM (-) 群よりも TGF β -1 や CXCL-5 が有意に高値となった。一方で POD14 になるとその差はむしろ逆転した。これらのサイトカインは創傷後の炎症反応を抑制し、血管新生や線維増生によりなる肉芽の形成を促して修復を誘導する因子である。HD-AM により炎症遷延が抑制され良好な肉芽が形成された機序が推定された。この結論は、POD7 において組織修復反応に働く抗炎症 M2 マクロファージのマーカーである CD163 が HD-AM 群で有意に高値を示したことや、炎症性サイトカインである IL-10 が羊膜を置いた方が高値を示した事実などに

よって支持された。免疫組織化学染色では CD163 陽性 M2 マクロファージは羊膜の上皮側に集積しており、ここでマクロファージの分化に何らかの誘導がなされていることを思わせる興味深い結果であった。IL-6、TNF- α 、iNOS については POD14 では減少傾向がみられるものの有意差が無く、炎症系サイトカインの抑制には有意に働いていないと考えられた。白血球数、血清 SAP 値（炎症マーカー）については有意差を認めなかった。

総括：

本研究で天野浩司君は、新規に開発した腸管露出マウスモデルを用い、HD-AM の創傷治癒に果たす役割を形態学的、分子生物学的に検討した。HD-AM 群は対照と比較して、創傷のいずれの時期においても、有意に肉芽が厚いことが観察された。サイトカインなどの発現をみると HD-AM 群は POD7 では成長因子 (TGF- β 1) , 細胞炎症ケモカイン (CXCL5) , 抗炎症系サイトカイン (IL-10) および CD163 の発現が HD-AM(-)群よりも高値を示したが、POD14 ではいずれも低値を示した。これらのことより、HD-AM は肉芽形成のための足場としての役割とともに、創傷部位でケモカインや抗炎症サイトカインの分泌量の制御を介して、創傷治癒過程を炎症相から修復起点への移行を促して EAF を保護する良好な肉芽形成を促進することが明らかとなった。

以上のことから、HD-AM は重症外傷における露出腸管をともなう開放創の管理において、肉芽形成促進的に働く有用な被覆材となり得ることが示唆された。本研究は、腸管露出開放創に対するマウスモデルを新たに開発応用した点に新規性があり、さらに臨床的発展性が大きいと期待できると考えられた。

以上より本審査会は本論文を博士(医学)の学位に十分値すると判断した。