

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19909

研究課題名(和文) 生体適合性接着剤を用いた膵瘻予防法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel biocompatible bond for the prevention of pancreatic fistulas

研究代表者

渡邊 幸博 (Watanabe, Yukihiro)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：70747584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵瘻モデル、膵消化管吻合モデルにおいて、2週間では、BCB群はNVによる被覆効果を認め周囲臓器との癒着が軽度であったのに対し、FG群では被覆が不十分で、周囲臓器との癒着が高度であった。8週間では、BCB群で膵瘻部、吻合部が線維性の被膜に覆われて、周囲との癒着はほとんどないのに対し、FG群では感染を伴う仮性嚢胞を形成し、周囲臓器との癒着が高度であった。組織学的には、BCB群では被覆部も本来の膵組織が持つ組織学所見を保っているのに対し、FG群では炎症細胞浸潤と線維芽細胞の極度の集中が目立ち、臓器の組織所見は保たれてなかった。BCBは従来のFGよりも効果的に膵瘻を予防できる可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：At 2 weeks after the operation, in the BCB group, the defect and stump were coated with NV and membranous tissue, while in the FG group, the defect and stump showed severe adhesion with the surrounding bowel. At 8 weeks after the operation, in the BCB group, the defect and stump were covered with thin connective tissue without adhesion, while in the FG group, the stump became infected pseudocyst and the defect showed severe adhesion with the surrounding bowel. These findings indicate that PFs occurred in the FG group but not in the BCB group. Histologically, in the BCB group, the coated area also retained histological findings of the original pancreatic tissue, whereas inflammatory cell infiltration and extreme concentration of fibroblasts were conspicuous in the FG group, and histological findings of organs was not kept. The BCB coated on an NV can be safe and effective for the prevention of PFs resulting from pancreatic injury and may be used in the clinical setting.

研究分野：膵臓外科

キーワード：生体親和性接着剤(BCB) フィブリン糊(FG) 膵瘻 生体糊 生体吸収性材料 大動物 膵臓外科

1. 研究開始当初の背景

膵臓外科において、膵瘻(pancreas fistula PF)は、一定の割合で発症する合併症であり、しばしば重篤化する。PFの予防策は様々なものが報告されているが、理想的で確実な予防法ははまだ確立されていない。現在、実臨床で行われている膵切除後の再建術もしくは断端閉鎖術では、膵実質に糸針もしくはチタン製ステープルをかける手技が必要である。この膵実質に針をかけることは、針穴からの膵液の漏出が起こる可能性、糸、針による縫合により膵が挫滅される可能性があり、重篤な合併症を誘発するPFの発生の要因の一つである。しかし、この手技は現行の膵外科の手術においては不可欠、不可避の手技である。このようなマイナーな膵瘻をシーリングするには、縫合によって起こる膵の微細な損傷部を何らかの素材でシーリングする方法が理想的である。このようなコンセプトから、膵消化管縫合部を生体適合性素材とフィブリン糊で補強する方法は報告されているが、その効果は一定ではない。

我々は、独立行政法人物質材料科学研究所生体機能材料ユニットの田口哲志博士と共同開発している生体親和性接着剤(Biocompatible Bond; BCB)を消化管や胆管の損傷部修復へ利用することを実験中であり、BCBと生体吸収性ポリマーシート(BAPS)を組み合わせたものによって膵断端のシーリングが可能であることを報告した。このBCBは現在一般的に使用されている生体糊(フィブリン糊 FG)に比べ、物理的なシーリング力が強いが、現在臨床にて使用不可能であり、生体での効果や安全性を検討することが必要である。本研究では、大動物を用い、膵損傷部(人為的膵瘻部)を作製し、この損傷部修復におけるBCBの臨床使用の可能性を従来法と比較する研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、我々の検討は新規開発接着剤BCBのシーリング効果、組織に及ぼす影響を従来から使用されているFGと比較することにより、実用性や安全性を検討する研究である。検討群はBCB群とFG群の2群を設定する。2群とも、シーリングする接着剤の周囲への漏出や多臓器との癒着を防ぐために、接着剤を生体吸収性シートのNEOVEIL(NV)でシールするように貼付する。

(1) BCBの膵瘻部シーリング効果をFGと比較する

大動物に膵欠損部(膵瘻モデル)を作製し、BCB、もしくはFGによるシーリング効果を経時的に観察する。観察期間はシーリング後、1週間、4週間、8週間とする。

(2) BCBシーリング効果の組織学的検討を行い、BCBの組織への影響を検討する

各群でシーリングした膵損傷部を摘出し組

織学的所見を検討する。ヘマトキシリンエオジン染色(HE)に加え、結合組織の増生を判断するためエラスチカ・ファン・ギーソン(EVG)染色も行う。この検討も観察期間はシーリング後、1週間、4週間、8週間とする。

(3) 膵消化管吻合部を作成し、BCBシーリング効果をFGと比較検討する

ブタの膵体部で膵を離断し、頭側膵断端は閉鎖、尾側膵断端と小腸を端側吻合する。この吻合部を各群によりシーリングし膵瘻予防効果を検討する。観察期間は吻合術後、1週間、4週間、8週間、24週間とする。

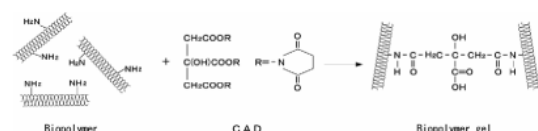
(4)膵消化管吻合部におけるBCBシーリング効果の組織学的検討を行い、BCBの組織への影響を検討する

各群でシーリングした膵消化管吻合部を摘出し組織学的所見を検討する。ヘマトキシリンエオジン染色(HE)に加え、結合組織の増生を判断するためエラスチカ・ファン・ギーソン(EVG)染色も行う。この検討も観察期間はシーリング後、1週間、4週間、8週間、24週間とする。

生体高分子(A)と有機酸から合成した架橋剤(B)で構成され、生体内において高強度、低毒性の接着剤である。使用直前に架橋剤と高分子溶液を混合し使用する。接着強度は20秒程度で最高値に達する。

本製剤は、独立行政法人 物質・材料研究機構 生体機能材料ユニットの田口哲志博士と共同開発し、作製を依頼している。

有機酸(クエン酸)から合成した架橋剤(CAD)による接着メカニズム



3. 研究の方法

本研究は生体親和性接着剤(Biocompatible Bond; BCB)の膵瘻予防効果が、従来法であるフィブリン糊(FG)と比較して有効であり、かつ生体内で安全に用いることができるかを検討する実験である。生体内での安全性や組織反応を検討するために、膵損傷モデルへの接着剤の処置後、1週間から48週間を観察期間とし、短期的なシーリング効果だけでなく、長期的な生体への影響の有無を観察する。本研究でBCBの優位性、安全性を確認できれば、今後の腹腔内における臨床応用への基盤となり得る。

このBCBは独立行政法人 物質・材料研究機構 生体機能材料ユニットの田口哲志博士より使用方法を指導いただき、無償で提供されている。

本実験は雑種ブタを用いた実験であり、すべての実験において、NIHガイドラインを遵守し、埼玉医科大学の動物実験倫理委員会 (Saitama medical university Animal Research Protocol) で承認された方法で行う。20頭の20 - 30Kg、雑種ブタを使用する。すべてのブタは術前12時間の禁食とする。すべての処置は、Ketamine hydrochloride (10mg/Kg) 筋注により前処置を行い、気管内挿管後、Sevoflurane (2%) 吸入で維持、人工呼吸器による全身麻酔下に仰臥位に固定する。

(1) BCB の腓損傷部シーリング効果を FG と比較

一般的に腓切除を伴う消化器手術は腸管の切除などコンタミネーションがありうる環境での手術であり、腓損傷部を作成する際に同視野に腸管切除吻合を行うことは合理的と考える。ブタ(n=12)の腓を露出、腓体部腹側に10X10X1mmの欠損(以下欠損)(Fig 1a)と尾部を離断し腓断端(以下断端)(Fig 1b)を作成する(外科的腓損傷モデル)。BCB群(n=6);作成した断端部、欠損部には、BCBを1cc塗布後、10X10mmネオパールを圧着させ腓損傷部を被覆する(Fig 1c)。

FG群(n=3);作成した断端部、欠損部にはFGを1cc塗布後、10X10mmネオパールを圧着させ腓損傷部を被覆する。

処置後は開腹層を2層に閉鎖し、セファメジン1gを点滴静注する。麻酔覚醒後12時間で水分を与え、24時間後に通常食を与える。術後経過が不良、とくに経口摂取不可能の場合は、安楽死後剖検し原因を観察する。

各実験群を、術後1週間、4週間後、8週間後に再度全身麻酔を行い再開腹し、腓損傷部を観察する。観察項目は、腹水の有無、腹水pH測定、癒着、膿瘍の有無である。その後、ブタは実験動物ガイドラインに従い過剰のケタミン静注により安楽死させる。安楽死後、処置部を含めた腓を摘出し、速やかに10%ホルマリンに固定する。



Fig. 1a
腓体部欠損部



Fig. 2b
腓尾部断端



Fig. 1c
BCB + NV を貼付

(2) BCB シーリング効果の組織学的検討を行い、BCB の組織への影響を検討

(1)のホルマリン固定72時間後、損傷修復部をパラフィン包埋切片として切り出す。これらは、6μmの切片としてプレパラートへ固定し、HE染色、Elastica van Gieson染色(EVG染色)を行い、欠損部の結合組織の増生、炎症細胞浸潤、感染の有無を観察する。

(3) 腓消化管吻合部を作成し、BCB シーリング効果を FG と比較検討

ブタ(n=8)の腓体部を露出し、門脈直上で腓をメスにより離断する。頭側腓断端は4 - 0 PDSにより連続縫合で閉鎖(閉鎖部)、尾側腓断端と小腸を端側吻合(吻合部)する。これら閉鎖部・吻合部をBCB+ネオパール、FG+ネオパールによりシーリングする。処置後は開腹層を2層に閉鎖し、セファメジン1gを点滴静注する。麻酔覚醒後12時間で水分を与え、24時間後に通常食を与える。術後経過が不良、とくに経口摂取不可能の場合は、安楽死後剖検し原因を観察する。

各実験群を、術後1週間、4週間、8週間、24週後に再度全身麻酔を行い再開腹し、閉鎖部・吻合部を観察する。観察項目は、腹水の有無、腹水pH測定、癒着、膿瘍の有無である。その後、ブタは実験動物ガイドラインに従い過剰のケタミン静注により安楽死させる。安楽死後、処置部を含めた小腸、腓を摘出し、速やかに10%ホルマリンに固定する。

(4) 閉鎖部・吻合部における BCB シーリング効果の組織学的検討を行い、BCB の組織への影響を検討する

各群でシーリングした閉鎖部・吻合部を摘出し組織学的所見を検討する。HE染色に加え、EVG染色も行う。この検討も観察期間はシーリング後、1週間、4週間、8週間、24週間とする。

(1)-(4)の実験における観察期間の根拠は、腓瘻による急性の障害(腓液瘻による腹腔内感染、出血)が出現しやすい術後1週間、仮性腓嚢胞など慢性の感染性疾患の出現が予想される4週間後、ネオパールがほぼ吸収される期間である12週間、そして、吻合部などに異物反応による狭窄や変形をきたす時期と思われる24週後に設定した。

4. 研究成果

腓瘻モデル、腓消化管吻合モデルにおいて、

2 週間では、BCB 群は NV による被覆効果を認め周囲臓器との癒着が軽度であったに対し、FG 群では被覆が不十分で、周囲臓器との癒着が高度であった。8 週間では、BCB 群で膵瘻部、吻合部が線維性の被膜に覆われて周囲との癒着はほとんどないのに対し、FG 群では感染を伴う仮性嚢胞を形成し、周囲臓器との癒着が高度であった。組織学的には、BCB 群では被覆部も本来の膵組織が持つ組織学所見を保っているのに対し、FG 群では炎症細胞浸潤と線維芽細胞の極度の集中が目立ち、臓器の組織所見は保たれていなかった。BCB は従来の FG よりも効果的に膵瘻を予防できる可能性が高いと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 渡邊幸博、合川公康、高瀬健一郎、岡田克也、岡本光順、桜本信一、山口茂樹、小山勇
ポリグルコール酸フェルトと生体糊による膵腸吻合部膵瘻の予防効果
第 49 回日本膵臓学会大会 2018.6.29-30 (和歌山)

2. M.Aikawa, M.Miyazawa, S.Ishida, K.Okada, Y.Watanabe, K.Okamoto, I.Koyama
A novel biocompatible bond for the prevention of pancreatic fistulas
第 47 回日本膵臓学会大会 2016.8.4-7(5)(仙台)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 幸博 (Watanabe Yukihiro)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：70747584

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()