

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 20 日現在

機関番号：34310	
研究種目：基盤研究（C）	
研究期間：2009～2011	
課題番号：21591737	
研究課題名（和文）	羊膜を用いた柔軟な壁を持ち蠕動運動を行う全周性腸管の再生： イヌを用いた研究
研究課題名（英文）	Regeneration of fully circular and soft walled intestine with peristalsis using amniotic membrane---in dog experiment
研究代表者	
	萩原 明郎 (HAGIWARA AKEO)
	同志社大学・生命医科学部・教授
	研究者番号：90198648

## 研究成果の概要（和文）：

蠕動運動を行う全周性の腸管の再生には、腹膜を含む腸管壁再生と再生腸管の癒着防止が重要である。そのためには羊膜の利用が一つの選択肢である。しかし羊膜の臨床応用の困難性を考慮し、代替材料として熱架橋ゼラチンフィルムを開発し、その癒着防止機能と腹膜を含む腸管壁再生機能を検討した。ラットとイヌを用いた実験で、熱架橋ゼラチンが良好な組織再生足場を提供して腹膜を含む小腸外壁を再生することを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Amniotic membrane is one of an useful material for regeneration of fully circular walled intestine with peristalsis. Considering its difficulty in clinical application, however, we have devised another material of thermally cross-linked gelatin membrane instead of amniotic membrane. The examinations using rats and dogs have revealed that the thermally cross-linked gelatin membrane effectively prevents adhesions and regenerates the intestinal wall including peritoneum by providing with high performing scaffolds for tissue-regeneration.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：小腸大腸肛門外科学、再生医学、腸管再生、羊膜

## 1. 研究開始当初の背景

従来、全周性消化管の再生は不可能であった。その理由は、癒着形成と平滑筋再生の不良の2点に要約される。応募者らはこれまでの科学研究費助成研究で上記の2点を克服し、

腸管ではないが全周性食道の再生に成功した。本研究では、この研究を更に発展させ、より困難で未だ成功報告のない腸管の再生を行う。陽圧のかかる腹腔内の腸管の再生には、陰圧と陽圧が交互にかかる胸部食道とは

別の要点、すなわち腹膜を含む腸管壁の再生と癒着防止を同時に実現する事が重要である。つまり腸管の再生は、食道より一層厚い平滑筋層と癒着の無い腹膜に覆われた消化管の再生であるから、すでに成功している食道再生が食道再生チューブ（自己細胞を植えた羊膜と体内分解性メッシュを複合したチューブ）の最外層を一層の大網で包むだけでは不十分で、本研究では食道再生の技術を発展させて腹膜を含む腸管壁の再生と癒着防止を同時に実現する組織再生技術を開発する必要がある。

## 2. 研究の目的

消化管再生における癒着防止と腹膜再生は、蠕動運動を行う消化管の再生における重要課題である。この癒着防止と腹膜再生を実現する目的で、腹膜再生と癒着防止を同時に実現する事が出来る再生の足場材料である熱架橋ゼラチン（以下 TCG）フィルムを新規に開発作成した。昨年度までは、その基本的な癒着防止効果と腹膜再生機能を報告してきた。最終年度である今年度を含めた全研究期間においては、より優れた性能を達成するために、腸管壁再生の詳細な病理学的検討と TCG フィルムの物理的・生物学的特性を検討し、その機序を部分的に明らかにした。

## 3. 研究の方法

本実験で使用した熱架橋ゼラチンフィルムの作成は次のように行った。

豚皮由来のアルカリ処理ゼラチン（メディゼラチン、(株) ニッピ）を蒸留水で溶かし、2.65%のゼラチン水溶液とした。このゼラチン水溶液をシャーレに流し入れ、風乾させた後、ゼラチンを熱架橋するべく 140°C真空オーブン（4V0-250N, As One, Osaka, Japan）の中で 0h, 1h, 3h, 8h あるいは 14h と、様々

な時間で加熱・架橋した。この操作によって厚さ約 30 $\mu$ m の各 TCG フィルムを作成した。

### (1) IN VITRO の細胞増殖実験

本実験で使用した細胞はすべて FBS10%, L-glutamine1%, ABAM 1% の D-MEM を用いて、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下にて培養を行った。

培養用 24 ウェルプレートのウェルの大きさに TCG フィルム、あるいは市販の癒着防止材 SP film を切り抜いたものをウェルの底に敷き、その上からラット線維芽細胞を培養液中に 1.33 $\times$ 10<sup>3</sup>cells/ $\mu$ l に調整した細胞浮遊液を 1 ウェルあたり 750 $\mu$ l、すなわち 1 ウェル 10<sup>3</sup> 個のラット線維芽細胞を入れ、1, 3, 5, 7 日後に ATP Lite Kit (PerkinElmer, Waltham, USA) を用いて 1 ウェルあたりの細胞数を計測した。

### (2) ラットにおけるフィルム溶解試験

イソフルラン吸入による基礎麻酔を行った後、ペントバルビタール腹腔内投与による全身麻酔の後開腹（正中 3 cm 長の開腹創）した。予め 2 cm $\times$ 2 cm の大きさに切り取り、重量を測定した各フィルム（1h, 3h, 8h, 14h TCG フィルム、SP film）を腹腔内に挿入し、閉腹した。ラットは、一匹につき挿入するフィルムの枚数は三枚とした。また、各群一時点（それぞれ術後 1 日、3 日、5 日、7 日）につき n=6 とし、フィルムが完全に消失した時点以降のフィルム回収は行わないとした。

術後 1 日、3 日、5 日、7 日に、ペントバルビタール過剰量の腹腔内投与によりラットを安楽死せしめ、開腹し、残存するフィルムを取り出した。取り出したフィルムは蒸留水で軽く洗浄した後、風乾させ、乾燥重量を測定して、フィルムの溶解・吸収度を比較検討した。

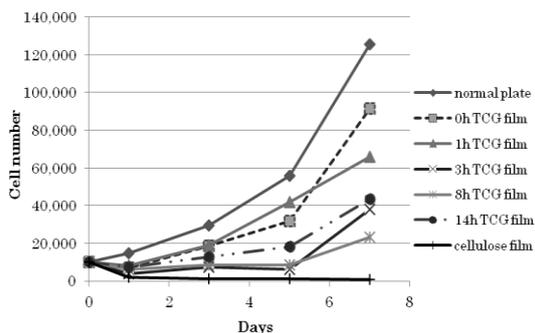
### (3) ビーグル犬における検討

体重約 10kg のビーグル犬をペントバルビタール静脈内注射による全身麻酔下に開腹し、回腸末端に腹膜と腸管筋層外層の欠損部分を作成した。①同部に TCG フィルムで被覆した群、②市販の癒着防止材 SP フィルムで被覆した群、③被覆なしの群の合計 3 群を作成した。手術後 1, 3, 6 週後に実験動物を犠牲死せしめ、開腹して同部の癒着程度を肉眼的にスコア化して定量的に評価した。同時に創部を切除してホルマリン固定標本とし、免疫染色を含む病理組織検査で臓側腹膜を含む腸管壁再生と癒着やその原因となる炎症の継続状態を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) IN VITRO の細胞増殖実験

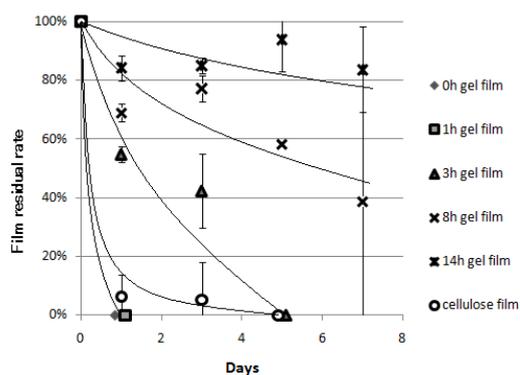
IN VIVO でのフィルム上の細胞増殖試験の結果を次の図に示した。TCG フィルム上の細胞増殖は全観察期間に渡り継続的に細胞の増加がみられた。しかし細胞増殖の程度は、その架橋時間によって差異を認め、これらの中で特に中程度から長時間の熱架橋を行った 3h, 8h, 14h TCG フィルム上では、細胞増殖がやや低くなる傾向を認めた。一方、SP film 上では、全観察期間に渡って細胞増殖は殆ど認められなかった。



##### (2) ラットにおけるフィルム溶解試験

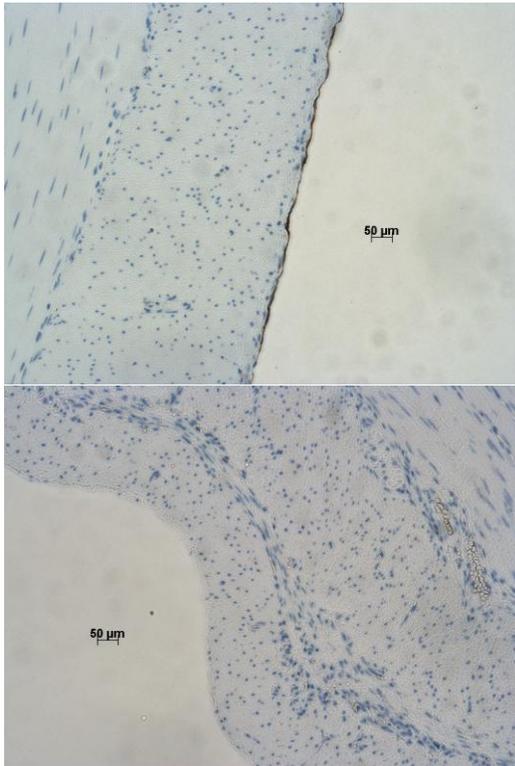
ラット腹腔内のフィルム溶解試験の結果を次の図に示した。熱架橋時間が 0h 及び 1h の TCG フィルムは 1 日目ではほぼ消失していた

が、それに対して、熱架橋時間が 3h, 8h, 14h の TCG フィルムは架橋時間が長くなるに従い溶解率が低くなった。熱架橋時間が長い 8h, 14h の TCG フィルムは、7 日目においても生体内に残存していた。一方、SP film は 1 日後には 90% 程度が消失し、5 日目には完全に消失していた。



##### (3) ビーグル犬における検討結果

1 週後では TCG フィルム群は SP 群、被覆無し群に比べ炎症性変化は軽度で、材料の残存も SP 群より軽度であった。3 週後、TCG フィルム群には良好な腹膜再生が認められ（次図の上）、炎症性線維化は他群に比べ軽度であった。他方 SP 群では、腹膜の再生を認めず炎症持続を認めた（次図の下）。6 週目には各群とも腹膜再生像を認めたが、炎症性線維化は SP 群、被覆無し群ではより高度であった。次に各架橋度の TCG フィルム及び SP の溶解度曲線を求めると、我々の架橋度の TCG フィルムは SP と類似した溶解性を示し、7 日間で約 80% 程度溶解していた。さらに各材料上で培養線維芽細胞の増殖曲線は、TCG フィルム上では細胞の経時的増殖を認め良好な再生の足場の性質を示した。一方 SP 上では細胞の増殖を殆ど認めず再生の足場の性質を示さなかった。



以上の検討から、次のことが明らかになった。

①TCG フィルムは再生の足場として作用し、その結果、TCG フィルムは良好な腹膜再生を行いつつ癒着防止を実現する。②一方、現在臨床で使用されている SP は細胞増殖や損傷組織の再生修復に対し抑制的に働くので癒着防止効果はあるが腹膜や腸管壁再生の機能は示さない。③TCG フィルムも SP も腹膜損欠損部に対し約1週間程度介在して癒着防止効果を示すが、被覆無しでは強固な癒着を生ずる。

## 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3件)

- ① Tetsuji Yoshikawa, Shinichi Hamada, Eigo Otsuji, Tsujimoto Hiroyuki, Akeo Hagiwara Endocrine differentiation of rat enterocytes in long-term three-dimensional co-culture with intestinal myofibroblasts. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal (査読あり) .47, 2011, 707-715
- ② Yoshinori Hirasaki, Masaki Fukunaga,

Akio Kidokoro, Ayumi Hashimoto, Tstuo Nakamura, Hiroyuki Tujimoto, Akeo Hagiwara. Development of a novel anti-adhesive material, alginate flakes, *ex Vivo* and *in Vivo*. Surgery Today (査読あり) .41, 2011, 970-977

③ 丹澤あゆみ、辻本洋行、的場麻里、橋本歩、鈴木周子、森田真一郎、筏義人、萩原明郎. 新規癒着防止材熱架橋ゼラチンフィルムの物理的・生物化学的特性-癒着防止効果の機序及び腸管吻合部への影響に対する基礎的検討 理工学研究報告 (査読あり) .52, 2011, 149-155

[学会発表] (計1件) .

①□辻本洋行、丹澤あゆみ、橋本歩、的場麻理、竹本洋一、石橋治昭、鈴木周子、森田真一郎、筏義人、萩原明郎. 熱架橋 gelatin film を用いた癒着防止と消化管吻合部への影響---その腹膜再生効果と物理的・生物学的特性について---DDWJ 2011.10.14 (横浜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

萩原 明郎 (HAGIWARA AKEO)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：90198648