

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11372

研究課題名(和文)細菌感染による吻合部血栓形成：機序の解明と対策

研究課題名(英文) Microvascular anastomotic thrombosis by bacterial infection: Elucidation of mechanism and counterplan

研究代表者

鳥山 和宏 (Toriyama, Kazuhiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：40314017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：SDラットの大腿動静脈を切断して10-0ナイロンで血管吻合を行い、吻合部に直接ブドウ球菌を術直後、24時間で播種した。結果は播種翌日肉眼的に静脈吻合部のみ血栓を認め、動脈吻合には血栓を認めなかった。組織学的には、術直後に細菌播種した静脈で白色血栓を、24時間後に播種した静脈で赤色血栓を認めた。動脈では観察時に明らかな血栓を認めなかったが、組織学的には血管内膜にフィブリンの細かい沈着を認める例も散見された。血栓ができる機序の解明のために、抗生剤の腹腔内投与、ヘパリンの皮下注射、アルプロスタジル注射液の腹腔内投与により血栓形成が抑制できないか検討を行った。いずれの方法でも血栓の予防はできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小さな血管を顕微鏡の下でつなげる微小血管吻合という手術は、骨や筋肉などの組織を移植する再建手術に必須である。血管吻合の成功率は未だ98パーセント程で、不成功に終わる例がある。その原因の1つが感染であり、今回ラット大腿動静脈を使用して感染による血栓形成を再現して観察できた。機序解明までに及ばなかったが、静脈が感染に弱いこと、吻合直後の感染は100パーセント静脈血栓を作ることが確認できた。さらに、これらの科学的なデータから、吻合部周囲の洗浄、吻合部の周囲へのドレーン挿入などの必要性を周知啓蒙できる。

研究成果の概要(英文)：We performed femoral vessels anastomoses by 10-0 nylon after transection using SD rats under general anesthesia. Abscesses on the anastomosis site were formed with Staphylococcus aureus suspension (SAS) at 0 h, 24 h after anastomoses. The patency rate of anastomoses performed on the arteries was 100 % and that on the veins was 0% from the next day after anastomoses. Histological findings showed veins with SAS at 0 h after anastomoses had "white thrombosis", veins with SAS at 24 h had "red thrombosis". On the other hand, arteries had adhesions of fibrin on the surface of vascular intima. We investigated the inhibitory effects of thrombin by administration of antibiotic agents, the subcutaneous injection of heparin, the administration of prostaglandin E1 to elucidate the mechanism of venous occlusion. However, thesis agents had no inhibitory effects of thrombin in our conditions.

研究分野：形成外科

キーワード：微小血管吻合 細菌感染 黄色ブドウ球菌 血栓 抗凝固剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微小血管吻合は、95%を超える開存率を示すようになったが、一部の症例では術後血栓が生じる。Yoshimoto ら¹⁾は、遊離皮弁による頭頸部再建 1031 例中 59 例で術後血栓を認め、そのうち 6 例は**感染が原因**であったと述べている。微小血管吻合の更なる成績向上には、感染による吻合部血栓の機序の解明と対策が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、ラットの大腿動静脈に血管吻合を行い、同時に細菌を吻合部周囲に播種すると血栓ができるかどうか検討する。さらに、血栓形成に大きく関与する機序を明らかにし、その対策を検証する。

3. 研究の方法

名古屋市立大学医学部細菌学教室に保管してある、ピペラシリン感受性緑膿菌株およびメチシリン感受性黄色ブドウ球菌株を使用した。

McLean ら²⁾の方法に準じて実験を行った。実験動物は Sprague-Dawley ラット雌 12 週齢を使用した。黄色ブドウ球菌は、マンニト食塩寒天培地 (栄研 E-ME21) で 37℃、一晚培養したものを使用した。本実験に使用した黄色ブドウ菌は感受性試験 (微量液体希釈法) でセファゾリンナトリウム通常量で感受性があることを確認した。

(1) 大腿動静脈モデルを用いた、黄色ブドウ球菌による吻合部細菌投与群、対照群における吻合部血栓

吸入ガスによる全身麻酔下に、鼠径部に切開を加えて大腿動静脈を露出した。同血管を切断後に顕微鏡下で血管吻合を行った。

吻合部感染群：黄色ブドウ球菌を吻合部に投与して創閉鎖した。

対照群：生理食塩水を吻合部に投与して創閉鎖した。

黄色ブドウ球菌を播種 1 日、2 日、3 日後の鼠径部を開創して観察した。吻合部に血栓がみられる場合には検体を採取して H E 染色・エラスチカ ワンギーソン染色 (EVG 染色) を行い、病理組織学的に検討した。さらに、対照群では血管吻合 7 日後、14 日後にも鼠径部を開創して観察した。

(2) 大腿動静脈モデルを用いた、黄色ブドウ球菌による吻合部細菌投与

細菌播種時期による検討

吸入ガスによる全身麻酔下に、鼠径部に切開を加えて大腿静脈を露出した。同血管を切断後に顕微鏡下で血管吻合を行った。

血管吻合 0 時間後、12 時間後、24 時間後、48 時間後に黄色ブドウ球菌を播種して 24 時間後に鼠径部を開創し観察した。吻合部に血栓がみられる場合には検体を採取して H E 染色・EVG 染色を行い、病理組織学的に検討した。

(3)大腿動静脈モデルを用いた、黄色ブドウ球菌による吻合部細菌投与

抗生剤投与による血栓抑制効果の検討

吸入ガスによる全身麻酔下に、鼠径部に切開を加えて大腿静脈を露出した。同血管を切断後に顕微鏡下で血管吻合を行った。血管吻合 0 時間後、24 時間後に黄色ブドウ球菌を播種した。

細菌播種と同時に、以下の 3 群に分けて抗生剤を投与した。セファゾリンナトリウムを体重 kg 当り 30mg を腹腔内に投与する群（通常量群）、体重 kg 当り 60mg を腹腔内に投与する群（2 倍量群）、生理食塩水のみを投与する無投与群で比較を行った。

細菌播種・抗生剤投与の 24 時間後に鼠径部を開創し観察した。吻合部に血栓がみられる場合には検体を採取して H E 染色・EVG 染色を行い、病理組織学的に検討した。

(4) 大腿動静脈モデルを用いた、黄色ブドウ球菌による吻合部細菌投与

ヘパリンによる血栓抑制効果の検討

吸入ガスによる全身麻酔下に、鼠径部に切開を加えて大腿静脈を露出した。同血管を切断後に顕微鏡下で血管吻合を行った。血管吻合直後に黄色ブドウ球菌を播種した。

細菌播種と同時に、以下の 2 群に分けて抗凝固剤を投与した。ヘパリンナトリウム 20 単位/匹皮下注射を行った群と 40 単位/匹皮下注射を行った群を比較した。

細菌播種・抗凝固剤の 24 時間後に鼠径部を開創し観察した。吻合部に血栓がみられる場合には検体を採取して H E 染色・EVG 染色を行い、病理組織学的に検討した。

(5)大腿動静脈モデルを用いた、黄色ブドウ球菌による吻合部細菌投与

プロスタジン製剤による血栓抑制効果の検討

吸入ガスによる全身麻酔下に、鼠径部に切開を加えて大腿静脈を露出した。同血管を切断後に顕微鏡下で血管吻合を行った。血管吻合直後に黄色ブドウ球菌を播種した。

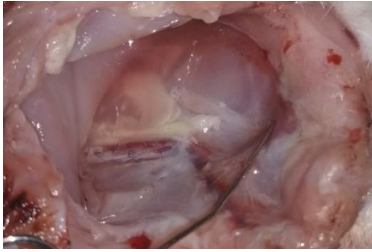
アルプロスタジル注射液を PGE₁ 量として体重 kg 当り 0.5 μg を腹腔内投与した群と体重 kg 当り 0.2 μg を腹腔内投与した群で比較を行った。

細菌播種・抗凝固剤の 24 時間後に鼠径部を開創し観察した。吻合部に血栓がみられる場合には検体を採取して H E 染色・EVG 染色を行い、病理組織学的に検討した。

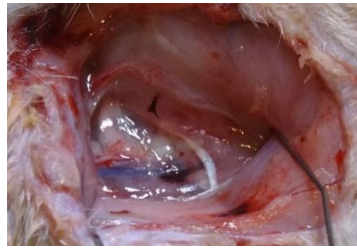
4. 研究成果

(1)大腿動静脈モデルを用いた、黄色ブドウ球菌による吻合部細菌投与群、対照群における吻合部血栓

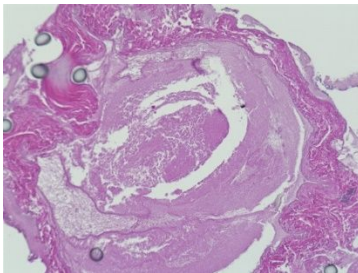
吻合部感染群のみで、播種 1 日、2 日、3 日後に創感染とともに、大腿静脈吻合部のみに血栓形成を認めた。大腿動脈の周囲組織は黄色ブドウ球菌の影響で白色から黄色に変色して壊死に陥っていたが、大腿動脈は開通していた。対照群では血管吻合 1 日から 14 日で血栓形成を認めなかった。



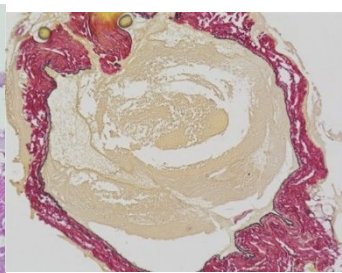
吻合直後に細菌播種
動脈（上）は開通
静脈（下）白色血栓



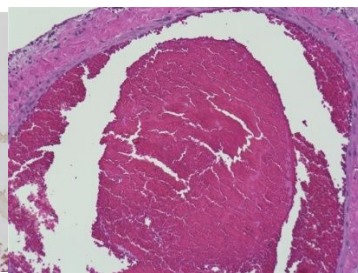
吻合 24 時後に細菌播種
動脈（上）は開通
静脈（下）は白色血栓



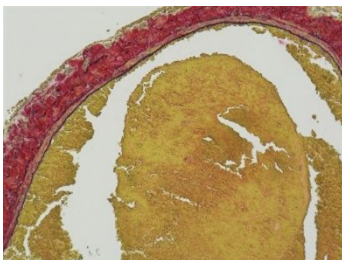
吻合直後に細菌播種
静脈白色血栓（HE 染色）



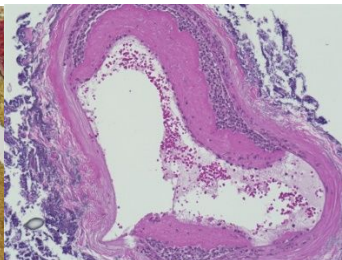
吻合直後に細菌播種
（EVG 染色）



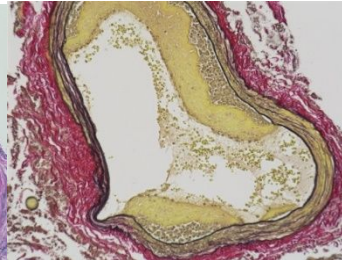
吻合 24 時間後に細菌播種
静脈赤色血栓（HE 染色）



吻合 24 時間後に細菌播種）
（EVG 染色）



吻合 24 時間後に細菌播種
動脈内膜にフィブリン（HE 染色）



吻合 24 時間後に細菌播種
（EVG 染色）

(2) 大腿動静脈モデルを用いた、黄色ブドウ球菌による吻合部細菌投与 細菌播種時期による検討

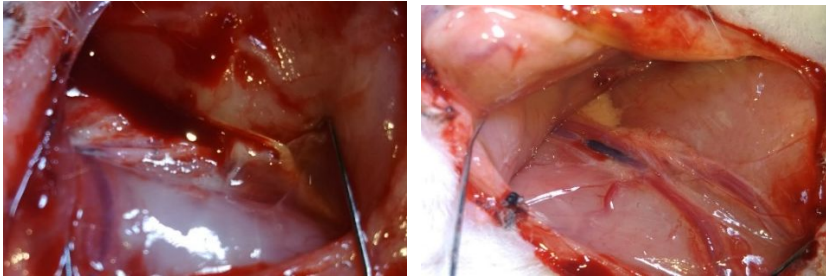
血管吻合 0 時間後、12 時間後、24 時間後に黄色ブドウ球菌を播種した全例で大腿静脈吻合部の血栓を認めた。また、48 時間後に半数で血栓を認めた。

(3) 大腿動静脈モデルを用いた、黄色ブドウ球菌による吻合部細菌投与 抗生剤投与による血栓抑制効果の検討

血管吻合後 0 時間投与および 24 時間投与とも、かつ、3 群ともに大腿静脈の吻合部に血栓を認めた。無処置の大腿動脈には血栓を認めなかった。

(4) 大腿動静脈モデルを用いた、黄色ブドウ球菌による吻合部細菌投与 ヘパリンによる血栓抑制効果の検討

2 群ともに大腿静脈の吻合部に血栓を認めた。無処置の大腿動脈には血栓を認めなかった。

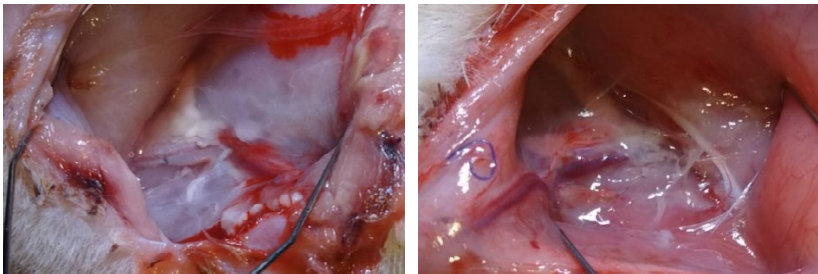


吻合直後細菌播種 白色血栓

吻合 24 時後 赤色血栓

**(5) 大腿動静脈モデルを用いた、黄色ブドウ球菌による吻合部細菌投与
プロスタンディン製剤による血栓抑制効果の検討**

2 群ともに大腿静脈の吻合部に血栓を認めた。無処置の大腿動脈には血栓を認めなかった。



吻合直後細菌播種 白色血栓

吻合 24 時後 赤色血栓

(6) 今後の展望

細菌播種の時期で血栓形成の様式が異なることを明らかにしたが、その機序解明のために、播種後 6 時間、12 時間、18 時間などのように詳細に経過を観察する必要がある。また、動脈吻合における経過が十分に観察できていないので追加する必要がある。さらに、血栓の機序解明、血栓の予防には抗凝固剤が重要となるが、現在利用可能な抗凝固剤を使用しての検討が必要となる³⁾。

参考文献

1. Yoshimoto et al. Analysis of 59 cases with free flap thrombosis after reconstructive surgery for head and neck cancer. *Auris Nasus Larynx* 37: 205-211, 2010
2. McLean NR et al. How does sepsis promote thrombosis in microvascular anastomoses? *Br. J. Plast. Surg.* 42: 314-317, 1989
3. Dimitrios P et al. Antithrombotic efficacy of direct oral anticoagulants on patency rate following microsurgical anastomosis in cruched rat arteries. *J Orthpaedic Science*, 24: 552-557, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	内堀 貴文 (Uchibori Takafumi) (30625760)	名古屋大学・医学部附属病院・助教 (13901)	
研究分担者	立野 一郎 (Tatsuno Ichiro) (50311642)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師 (23903)	
研究分担者	佐藤 秀吉 (Sato Hideyoshi) (70528968)	名古屋市立大学・医学部附属病院・助教 (23903)	