

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790918  
 研究課題名（和文）多核白血球機能評価から検討した腹腔内癒着防止材の腹腔内感染への影響に関する研究  
 研究課題名（英文）Effects of a hyaluronate-carboxymethylcellulose membrane on human polymorphonuclear neutrophil functions.  
 研究代表者 井上 幹大 (Mikihiro Inoue)  
 三重大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：30422835

## 研究成果の概要：

セプラフィルムの有無による多核白血球機能については E.coli, S.aureus と共培養後の貪食能、apoptosis、necrosis、サイトカイン産生、好中球エラスターゼの放出に差は見られなかった、また、TNF- $\alpha$ 、LPS 刺激による炎症モデル、感染モデルでのサイトカイン産生、同様に溶解したセプラフィルムでのサイトカイン産生も差は見られなかった。セプラフィルムはヒト多核白血球の機能に影響を与えず、腹腔内感染性合併症を引き起こす原因とならないことが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	180,000	3,180,000

研究分野：小児外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：術後腸閉塞、腹腔内癒着、腹膜炎、癒着防止材、セプラフィルム、多核白血球、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

腹膜炎術後は術後の腹腔内癒着は強い傾向があり、癒着による合併症も多く現れる。したがって、腹膜炎症例において癒着防止材は術後腸閉塞の予防や再開腹時の癒着剥離に伴う臓器損傷予防という観点から非常に重要な役割を果たす。しかし、癒着防止材と腹腔内感染に関し

てはまだまだ不明な点が多い。近年発売されたヒアルロン酸を主成分とする癒着防止材は、閉腹前に腹腔内に挿入することによりバリアとなって癒着を予防する製材であるが、術後に腹腔内膿瘍や腹腔内の炎症を惹起したとの報告が散見される。一方でラットの実験モデルにおいては膿瘍形成や腹

腔内感染、更に、それによる死亡率に癒着防止材は影響しなかったという報告が 2, 3 なされている。

## 2. 研究の目的

ヒアルロン酸を主成分とする癒着防止材が感染防御の first line である多核白血球の機能に及ぼす影響を、貪食能・アポトーシス・サイトカイン産生能等の面から検討。

## 3. 研究の方法

成人健常者の血液サンプルより多核白血球を単離。

### ① 貪食能評価

多核白血球と蛍光色素をラベルした大腸菌または黄色ブドウ球菌との共培養をヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロースを添加した培地としていない培地で行い、flow cytometry にて貪食好中球の割合を計測。

### ② 細菌感染後の多核白血球のアポトーシスとサイトカイン産生能の検討

局所感染モデルとして好中球と大腸菌または黄色ブドウ球菌およびヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロースを共培養し、flow cytometry にて好中球のアポトーシスの割合測定。また上清中のサイトカインおよび好中球エラスターゼを ELISA にて測定。

### ③ 炎症・感染モデルにおける多核白血球のサイトカイン測定能の検討

炎症・感染モデルとして好中球をヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロースを添加した培地としていない培地で TNF- $\alpha$  もしくは LPS を添加して培養を行い上清中のサイトカインおよび好中球エラスターゼを ELISA にて測定。

### ④ 癒着防止材溶解後の炎症・感染モデルにおける多核白血球のサイトカイン測定能の検討

⑤癒着防止材を溶解させた状態において③と同様の操作を行う。

## 4. 研究成果

①貪食能の検討では、E. coli との共培養ではヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは phagocytosis rate 97% $\pm$ 0.77%に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは 98% $\pm$ 0.38%(P=0.36)であり、S. aureus との共培養ではヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは phagocytosis rate 94% $\pm$

1.8%に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは 92% $\pm$ 2.8%(P=0.78)であり、ヒアルロン

酸・カルボキシメチルセルロース有無によって貪食能に有意差はなかった。

### ②apoptosis と necrosis の割合は

E. coli との共培養では、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは apoptosis rate 26% $\pm$ 3.5%に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは 25% $\pm$ 0.38%(P=0.78)に有意差はなく、necrosis rate もヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは 1.1% $\pm$ 0.29%に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは 0.71% $\pm$ 0.15%(P>0.99)と有意差はなかった。

一方、S. aureus との共培養ではヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは apoptosis rate 24% $\pm$ 3.3%に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは 23% $\pm$ 4.6%(P=0.46)であり、(E. coli : apoptosis P=0.78, necrosis P>0.99, S. aureus : apoptosis P=0.46, necrosis P=0.62)。necrosis rate もヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは 0.33% $\pm$ 0.009%に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは 0.23% $\pm$ 0.05%(P=0.62)と有意差はなかった。

③サイトカイン産生、好中球エラスターゼ放出に関しては、E. coli との共培養では IL-1 $\alpha$  は検出限界以下であり、IL-6 はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは 72 $\pm$ 30pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは 99 $\pm$ 42pg/ml (P=0.53), IL-8 はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは 96 $\pm$ 33pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは 143 $\pm$ 45pg/ml (P=0.31), IL-1Ra はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは 64 $\pm$ 13pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは 77 $\pm$ 13pg/ml (P=0.96), PMN-E はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは 3.2 $\pm$ 0.55pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは 3.3 $\pm$ 0.50pg/ml (P>0.99)と有意差は見られなかった。

一方、S. aureus との共培養では IL-1 $\alpha$  と IL-6 は検出限界以下であり、IL-8 は

ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $5.4 \pm 1.7$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $5.0 \pm 2.3$  pg/ml ( $P=0.31$ )、IL-1Ra はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $55 \pm 12$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $50 \pm 8.4$  pg/ml ( $P=0.53$ )、PMN-E はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $1.4 \pm 0.32$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $1.3 \pm 0.35$  pg/ml ( $P=0.73$ ) と有意差は見られなかった。

④炎症モデルにおけるサイトカイン産生はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $7.7 \pm 2.6$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $29 \pm 2.1$  pg/ml ( $P=0.31$ ) IL-1 $\alpha$  は検出限界以下であり、IL-6 はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $7.7 \pm 2.6$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $29 \pm 2.1$  pg/ml ( $P=0.59$ )、IL-8 はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $213 \pm 70$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $301 \pm 70$  pg/ml ( $P=0.24$ )、IL-1Ra はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $854 \pm 207$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $1693 \pm 490$  pg/ml ( $P=0.19$ ) でいずれも有意差は認められなかった。

一方、感染モデルにおけるサイトカイン産生は IL-1 $\alpha$  は検出限界以下であり、IL-6 はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $9.4 \pm 4.0$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $35.0 \pm 24.6$  pg/ml ( $P=0.35$ )、IL-8 はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $172 \pm 57$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $169 \pm 47$  pg/ml ( $P=0.76$ )、IL-1Ra はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $624 \pm 137$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $1045 \pm 287$  pg/ml ( $P=0.24$ ) とこちらも有意差は認められなかった。

⑤溶解させたヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロースを使用した状態での炎症モデルと感染モデルにおけるサイトカイン産生の結果、炎症モデルでは IL-1 $\alpha$  は検出限界以下であり、IL-6 はヒアルロン酸・カルボ

キシメチルセルロース有りでは  $7.1 \pm 0.85$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $7.5 \pm 1.3$  pg/ml ( $P=0.77$ )、IL-8 はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $122 \pm 49$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $164 \pm 82$  pg/ml ( $P=0.77$ )、IL-1Ra はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $315 \pm 90$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $332 \pm 64$  pg/ml ( $P=0.77$ ) でいずれも有意差は認められなかった。

一方、感染モデルでは IL-1 $\alpha$  は検出限界以下であり、IL-6 はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $6.6 \pm 0.34$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $5.7 \pm 0.38$  pg/ml ( $P=0.38$ )、IL-8 はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $80 \pm 30$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $74 \pm 29$  pg/ml ( $P>0.99$ )、IL-1Ra はヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース有りでは  $310 \pm 82$  pg/ml に対して、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース無しでは  $150 \pm 30$  pg/ml ( $P=0.14$ ) でこちらも有意差は認められなかった。

以上の結果から、ヒアルロン酸・カルボキシメチルセルロース製材はヒト多核白血球の機能に影響を与えず、腹腔内感染性合併症を引き起こす原因とならないことが示唆された。

これにより腹腔内感染合併例においてもセプラフィルムの使用が可能となることで、腸閉塞の減少や再開腹時の臓器損傷のリスク減少、手術時間の短縮に寄与することが期待される。

## 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 1 件)

(1) Otake K, Uchida K, Yoshiyama S, Inoue M, Okita Y, Watanabe H, Inoue Y, Mohri Y, Miki C, Kusunoki M.

Effects of a hyaluronate-carboxymethylcellulose membrane (Septrafilm) on human polymorphonuclear neutrophil functions.

Journal of Surgical Research

149:243-249, 2008

[学会発表] (計 1 件)

(1)

大竹耕平, 内田恵一, 吉山繁幸, 大北喜基, 井上幹大, 渡部秀樹, 三木誓雄, 楠正人

セプラフィルム使用による腹腔内感染性合併症への影響についての検討

日本外科学会総会 2007 年 4 月 12 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 幹大 (Mikihiro Inoue)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 30422835

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者