

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592097

研究課題名(和文)

感染創に対する細胞治療の可能性

研究課題名(英文)

Treatment of infected wound with omentum-derived cells

研究代表者

亀井 譲 (KAMEI YUZURU)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10257678

研究成果の概要(和文)：

形成外科領域では、筋弁や筋皮弁による感染創の治療が多く行われている。われわれの臨床経験と以前の基礎実験から、大網のほうが筋弁・筋皮弁よりも抗感染作用が強いと考えている。しかし、大網の抗感染効果を実験的に詳細に報告した例はない。そこで、まずマウスで感染創モデルを作成後に大網および筋弁の感染創に対する反応の差異を観察した。次いでマウス大網からリンパ球、血管内皮細胞や間葉系幹細胞が豊富な分画を抽出して、感染創に局所注射し抗感染作用を検討した。感染創モデルでは、液体培地に寒天を追加し半流動状にして黄色ブドウ球菌を混和することで、寒天が局所に残存して安定した感染創が得られた。感染創に大網と筋弁を移植する実験では、筋弁が局所で反応が乏しいのに対して、大網は周囲組織と癒着して大量の炎症性細胞を供給して明かな抗感染採用を示した。マウス大網由来の細胞の感染創への移植実験では、移植した細胞は血管新生を伴い生着しその周囲に炎症性細胞の豊富な層ができた。以上より、感染創に対して大網は筋弁により抗感染採用が強いことが示唆され、また大網由来の細胞による感染創の治療の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：

Muscle flaps and omental flaps are used for treatment of infected wound. We think omental flaps are more effective for infected wound than muscle flaps by our clinical experiences and previous experiments. However, there are few reports involving anti-infective effects of omental flaps. After we established a new infected wound model, we compared omental flaps to muscle flaps in this model. Furthermore, we investigated the anti-infective effects of omentum-derived cells. At first, we established a new stable infected wound model by the semi-fluid medium plus *Staphylococcus aureus*. When we compared omental flaps to muscle flaps in this model, a few muscle flaps responded to the infected wound. On the other hand, most omental flaps responded to the wound: omental flaps adhered the surrounding tissue and supplied a lot of inflammatory cells. When we injected the omentum-derived cells to the infected wound, these cells survived locally with neovascularization and were surrounded by a lot of inflammatory cells. Taken together, these findings indicate omental flaps are more effective for infected wound than muscle flap. There's a possibility that omentum-derived cells have the anti-infective effect for the infected wound.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：大網、筋弁、感染創モデル、細胞治療、抗感染作用

1. 研究開始当初の背景

形成外科領域では、筋弁や筋皮弁による感染創の治療が多く行われている。われわれの臨床経験から、胸骨骨髓炎で大胸筋弁・腹直筋皮弁で完治できず最終的に大網弁で治療できたケースを多く経験し、大網のほうが筋弁・筋皮弁よりも抗感染作用が強いと考えている。また、われわれの基礎的な研究から、大網にはリンパ組織を含む乳斑が多数存在し、血管増殖因子を多く含むことがわかっている。しかし、大網の抗感染効果を実験的に詳細に報告した例はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスで感染創モデルを作成し、大網および筋弁の感染創に対する反応の差異を観察することである。また、マウス大網からリンパ球、血管内皮細胞や間葉系幹細胞が豊富な分画を抽出して、感染創に局所注射することで感染創を浄化・鎮静化できるか検討する。

3. 研究の方法

(1) 感染創モデル

細菌は臨床分離したメチシリン感受性黄色ブドウ球菌を使用した。使用した実験動物はBALB / cマウス9週齢雄48匹であった。液体培地はLuria Broth (Sigma, USA)を使用し、この培地に粉末寒天 (Wako, Osaka)を追加して半流動培地 (最終寒天濃度：0.05%)とした。黄色ブドウ球菌の濃度を 5×10^8 colony formation unit (cfu) として半流動培地に混合してマウス腹部皮下に局所注射した。移植後1日、2日、3日、5日、7日、9日で検体を採取して経時的に検体を採取し組織学的に評価した。また黄色ブドウ球菌を混入しない半流動培地のみを局所注射した群を対照群として同様の評価を行った。

(2) 大網・筋弁の感染創への移植

細菌、マウス、半流動培地は実験①と同様に準備して、黄色ブドウ球菌は最終濃度を 5×10^8 cfu として混和した。大網群は腹部正中で開腹して右大網動静脈を茎とした大網弁を挙上し、腹部皮下ポケット (5 x 5 mm) を作成して大網を移植した。一方対照群は腹部正中で開腹後に閉腹し腹部皮下に同様の皮下ポケットを作成した。次いで、予め黄色ブドウ球菌を混和した半流動培地を皮下ポケット内に局所注射した。移植後1, 3, 6, 12, 24 時間後で検体を採取し組織学的に評価し

た。さらに、筋弁群として、腹部正中で開腹後に左腹筋を下方を茎として挙上し同様の処置を行い、大網群と比較した。

(3) 大網由来の細胞の感染創への局所注射
半流動培地に黄色ブドウ球菌を混合したものをマウス皮下に局所注射した。2日後に同種同系マウス大網を細切しコラゲナーゼ処理後に遠心して stromal vascular fraction (SVF) を抽出し、マトリゲル (再構築した基底膜成分) に混合して感染創に局所注射した。局注後1週間で検体を採取し組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 感染創モデル

術後1日目では、寒天の下面の筋肉および寒天の両側の皮下組織から好中球などの細胞浸潤を認めた。術後2日目では、好中球など細胞浸潤がさらに進行した。寒天は一部吸収された。術後3日から4日目 (図1A, 1B) では、寒天の吸収は進み、寒天中あるいは周囲に黄色ブドウ球菌のコロニー形成を認めた。寒天の直上の変性したコラーゲンは断裂して、一部皮膚欠損 (皮膚潰瘍) となった。術後5から7日目 (図1C) では、細菌を含んだ寒天と細胞浸潤を伴う変性コラーゲンが痂皮となり、健全組織から離解されていた。術後9日目 (図1D) では、壊死した皮膚組織が脱落して皮膚潰瘍を形成した。

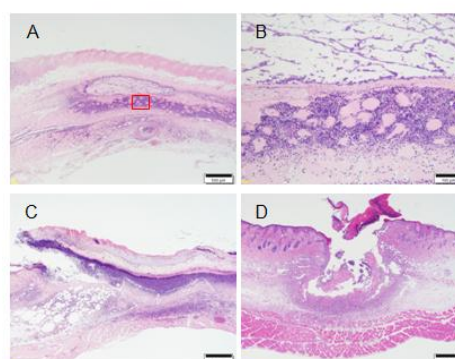


図1 細菌移植群の経時的变化

黄色ブドウ球菌を添加していない対照群では、術後3日目 (図2A, 2B) で、寒天の周囲に好中球を中心とした細胞浸潤がみられたが、寒天直上の皮膚は正常構造を保持していた。術後5日目 (図2C, 2D) でわずかな炎症細胞を残して寒天はほぼ吸収された。

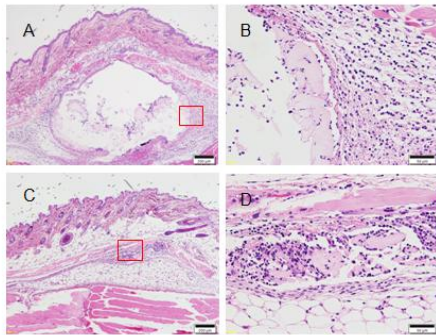


図2 対照群の経時的変化

(2) 大網・筋弁の感染創への移植

大網群の術後1時間(図3, 01h)と対照群の術後1時間(図3, C1h)では、明らかな血管拡張も炎症細胞はみられなかった。大網には乳斑が豊富にみられた。

大網群の6時間後には、血管拡張がみられた(図3, 06h)。大網と寒天が接する部位で寒天内への炎症性細胞浸潤が著明となった。対照群の6時間後では局所注入した寒天の周囲に軽度の炎症細胞の浸潤がみられた(図3, C6h)。

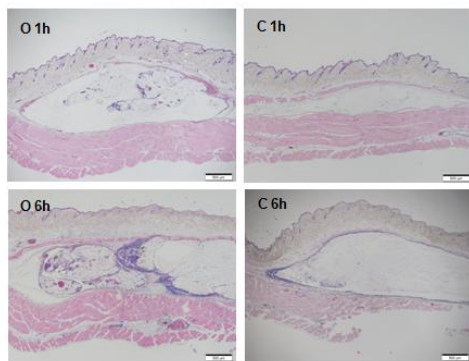


図3 大網群と対照群の1・6時間後

大網の術後12時間では、寒天への細胞浸潤が進み厚さ約800 μ mの層をなした(図4, 012h)。大網の術後24時間では大網に接しない部分の寒天内ではコロニー形成が進行して、下の筋層が壊死に陥るとともに一部寒天外のコロニー形成もみられた。しかし、大網に面した寒天部分は下床の筋層の壊死が予防され、筋層内に多数の炎症性細胞が供給された(図4, 024h)。対照群の術後12時間では、両サイドの皮下組織と筋層間のスペースに炎症細胞が浸潤し、下床の筋層内にも軽度細胞浸潤がみされた。寒天の吸収は進まず、周辺部に黄色ブドウ球菌のコロニー形成がみられた(図4, C12h)。対照群の術後24時間では、炎症性細胞の浸潤が進まない部分では寒天が残存して寒天の周囲に沿って黄色ブドウ球菌のコロニー形成がみられ、その周囲の筋組織は壊死となった。その外側に炎症性細胞の浸潤が取り巻いていた(図4, C24h)。

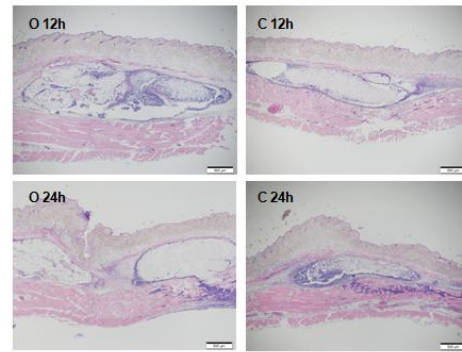


図4 大網群と対照群の12・24時間後

大網の術後24時間では、大網は下床の筋層と密着して寒天に著明な細胞浸潤を起こしていた。その厚さは約600 μ mに及んだ。(図5, 012h)。大網に隣接した筋層からも多数の炎症性細胞が供給されていた。一方、筋弁の術後24時間では、筋弁は周囲の組織と癒着がみられず、炎症性細胞浸潤は一部に留まりその厚みも約100 μ m程度であった。筋弁周囲の寒天内で細菌のコロニー形成をみとめた。

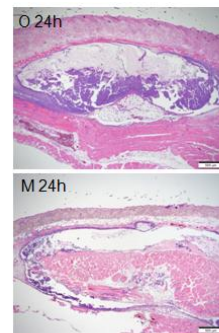


図5 大網群と筋弁群の24時間後

(3) 大網由来の細胞の感染創への局所注射

移植した細胞は血管新生を伴い生着していた。その周囲には炎症性細胞の豊富な層ができ、一部黄色ブドウ球菌を含む寒天に連続していた。

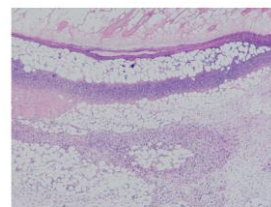


図6 大網群と筋弁群の24時間後

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)
(以下すべて査読あり)

1. Nakazato K, Toriyama K, Hishida M,

Takanari K, Yagi S, Yamashita Y, Akatsuka S, Hayakawa A, Kamei Y. Free Calvarial Periosteum Graft Vascularized by an Omental Flap in a Rat Model. *Ann Plast Surg.* 2011 Feb 4.

2. Kamei Y, Toriyama K, Takada T, Yagi S. Tissue-engineering bone from omentum. *Nagoya J Med Sci.* 2010 Aug;72(3-4):111-7.

3. Hishida M, Toriyama K, Yamashita Y, Akatsuka S, Hayakawa A, Torii S, Kamei Y. Omental flap closure of refractory wounds: rat model. *Nagoya J Med Sci.* 2010 Feb;72(1-2):91-9.

〔学会発表〕（計 6 件）

1. Toriyama K, Nakazato K, Kamei Y, Yagi S, Sato H, Ono M, Kanbe M. Osteogenic potential of free calvarial periosteum graft on the greater omentum in rat model. The 10th Korea-Japan Congress of Plastic and Reconstructive Surgery.

2. Toriyama K, Nakazato K, Kamei Y, Yagi S, Sato H, Ono M, Kanbe M. Expression of TGF-beta and VEGF of cell proliferation and cytodifferentiation in the calvarial periosteum on an omental flap. 20th Sino-Japan Joint Congress on Plastic Surgery

3. 佐藤秀吉、鳥山和宏、八木俊路朗、蛭沢克己、小野昌史、神戸未来、亀井謙. 感染創モデルを用いた大網弁の有用性の検討. 第 57 回日本形成外科学会中部支部東海地方会. 2011 年 2 月 19 日. 名古屋

4. 中里公亮, 亀井謙, 鳥山和宏, 八木俊路朗, 高成啓介, 神山圭史, 鳥居修平. ラット頭蓋骨骨膜を大網上に移植したときの骨誘

導の検討. 第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会. 2010 年 9 月 16 日 17 日, 横浜

5. 菱田雅之、鳥山和宏、山下依子、早川あけみ、八木俊路朗、亀井謙. 粘膜欠損に対する筋弁と大網弁の創傷治癒. 第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会. 2010 年 9 月 16 日 17 日, 横浜

6. 鳥山和宏、亀井謙、八木俊路朗、高成啓介、鳥居修平. 感染創皮膚潰瘍モデルの作成. 第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会. 2009 年 10 月 1 日 2 日. 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 謙 (KAMEI YUZURU)

名古屋大学大学院・医学系研究科・教授
研究者番号：10257678

(2) 研究分担者

鳥山 和宏 (TORIYAMA KAZUHIRO)

名古屋大学大学院・医学系研究科・准教授
研究者番号：40314017

八木 俊路朗 (YAGI SHUNJIROU)

名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00378192

佐藤 秀吉 (SATO HIDEYOSHI)

名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70528968

(3) 連携研究者

なし