

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791281

研究課題名（和文）クローン病術後感染制御における術後早期白血球除去療法の有用性

研究課題名（英文） Early Postoperative application of extracorporeal leukocyte apheresis in crohn disease patients to prevent postoperative septic complications

研究代表者

吉山 繁幸 (Shigeyuki Yoshiyama)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60444436

研究成果の概要（和文）：【目的】炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎(UC)、クローン病(CD)）患者は高率に術後の感染症を発症し、医療費高騰の一因となっている。われわれは術後の感染性合併症が頻発する UC 術直後に異常に活性化された顆粒球を除去する目的で白血球除去カラム(LCAP)を用い術後早期の異常炎症反応を制御し、術後感染性合併症 (SSI) の発生を低下させることに成功した。今回この結果をもとに LCAP を同じく難治性炎症性腸疾患である CD 患者にも適用させるため、術前後の免疫反応を明らかにし、術後合併症の発症及び入院医療費を抑制する新しい治療法を確立する。【方法】基礎実験として CD 患者周術期血液サンプルの収集、および術前、術直後の好中球を分離し、好中球機能を網羅的に調査する目的で培養を行った。培養後の上清中のサイトカイン等の蛋白の定量を ELISA 法にて行なった。また E. coli との共培養を行い、細胞死の検討を FACS にて行なった。また、貪食能の検討も FACS 解析を行った。【結果】CD 患者の好中球は、食食後 viable な状態が維持されるが、その細胞死においては apoptosis 優位の細胞死から necrosis 優位となり、炎症性サイトカイン産生能が亢進することが明らかとなった。CD 患者における細菌食食後の好中球は hyperactivation の状態にあり、高い SSI 発生率の機序の一因となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： **Purpose:** Inflammatory bowel disease (IBD) is an inflammatory disease of the intestine with unknown etiology. In patients with ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), the most of the recent studies deal mainly with immune responses. Empirically, there is a higher incidence of infectious complications in IBD patients. We have reported that early postoperative leukocyte apheresis therapy (LCAP) can control neutrophil hyper-activation, leading to an improved clinical outcome following operation in UC patients. This study aimed to assess functional profiles of neutrophils in CD patients in order to estimate the immunological changes under surgical stress. **Methods:** Neutrophils were extracted from peripheral blood of pre and post operative CD patients and healthy controls. Expression of neutrophil surface antigens was analyzed and neutrophil phagocytosis was evaluated. Patterns of cell death of neutrophils were evaluated by co-culturing with E.coli. Production of inflammatory mediators in cultured neutrophils was assessed. **Results:** There was no significant difference in neutrophil phagocytosis between CD patients and controls. The neutrophil necrosis rate in CD patients was higher than that in controls 3 h after exposure to E.coli. Neutrophils from CD patients released the highest levels of IL-8 following interleukin-1 $\beta$  or lipopolysaccharide stimulation. Neutrophils from CD patients also released the highest levels of proteolytic enzymes. **Conclusions:** CD patients may have a functional deficit in neutrophils, which may cause a post-surgical systemic storm of inflammatory mediators and lead to higher incidence of infectious complications in CD patients

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：小腸大腸肛門外科学

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：クローン病、surgical site infection、neutrophil

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）患者は併存症や慢性的な栄養障害などにより高率に術後の感染症を発症し、医療費高騰の一因となっている。米国では周術期における感染対策ガイドラインが提示され、手術部位感染（surgical site infection：SSI）対策の重要性が認識されている。これはSSIが発生すると在院日数が延長し、医療費が増大すること、SSIは入院患者の発病や死亡の重要な原因であり続けていること、SSIは手術患者における病院感染の38%を占めたことなどが指摘されているためである。米国では、1970年にNNIS（National Nosocomial Infections Surveillance）システムが構築されており、SSIを含めた病院感染サーベイランスが施行されている。一方本邦では1999年より、JNIS（Japanese Nosocomial Infections Surveillance）システムがNNISに沿った形で作成されている。JNISでは本邦におけるSSIの頻度は、消化器手術では約15%、全体で7.7%（1998.11～2004.12, 30, 436例）と報告されている。我々はこれまで消化器疾患手術患者における術後感染症の発生を予測する独立因子が、年齢、栄養状態、術前のCRP、顆粒球エラスターゼ値、出血量及び輸血であることを報告してきた。Cytokine. 2000 Sep;12(9):1331-6. Arch Surg. 2001 Nov;136(11):1274-9. Am J Surg. 2003 Mar;185(3):188-93. World J Surg. 2004 Feb;28(2):130-6. 2004 Jan 08. J Surg Oncol. 2004 May 1;86(2):91-8. Dig Dis Sci. 2004 Jun;49(6):970-6. Crit Care Med 2005 Jan;33(1):177-80 最近では術後の感染性合併症が頻発する潰瘍性大腸炎術直後に異常に活性化された顆粒球を除去する目的で白血球除去カラムを用い術後早期の異常炎症反応を制御し、術後感染性合併症の発生を50%から10%以下へと低下させることに成功し、抗生剤使用量を抑制し早期退院も可能にし医療費を大幅に低下させることに成功した。この結果は第59回日本消化器外科学会パネルディスカッション、第93回消化器病学会総会パネルディスカッション、第69回臨床外科学会パネルディスカッション等で発表し大きな反響を得た。

## 2. 研究の目的

今回この結果をもとに白血球除去カラムを同じく難治性炎症性腸疾患であるクローン病患者にも適用させ、術後の免疫反応がいかにかに制御されるか明らかにし、術後合併症の発症及び入院医療費を抑制する新しい治療法を確立することが本研究の目的である。細胞培養系を用いて白血球除去の有用性をin vitroで検証し、そのメカニズムを解明する。術後の侵襲反応制御方法として現在確立さ

れているものは皆無であり、唯一存在するのはエラスターゼ阻害剤であるがこれは発症した肺合併症の治療のみに適応され、さらに非常に高額な医療費を伴う。すなわち cost benefit は明らかにされておらず普遍化は困難であると考えられる。一方白血球除去療法は安全性が確立され、術後在院日数の短縮および抗生剤等の薬剤使用量を減量できれば十分な cost benefit が期待できる。また潰瘍性大腸炎患者に対する prospective trial ですでに成果もあげており十分な研究成果が期待できる。我々がこれまで明らかにした結果では以下の事実が判明した。i) 術直後の使用は輸血下においても安全で全例で完遂できた。ii) 術後の発熱、心拍数の増加を速やかに正常化させることができたため解熱剤等の使用量が抑制できた。iii) 術後の感染症の発生率が従来の五分の一となり、入院期間が短縮できた。iv) 合併症発生率低下に伴い術後長期的な消化管機能の低下が回避され、QOLが向上した。以上の事項は潰瘍性大腸炎と同様の炎症性腸疾患であるクローン病に於ても十分に期待でき、さらに長期的な予後の改善にも結びつくものと考えられる。またこれらの臨床結果を裏付けるデータとして現在のところ、周術期の好中球の細胞死をネクローシスから正常なアポトーシスへと誘導し、その結果血清顆粒球エラスターゼ値がほぼ完全に制御できたという基礎データが得られている。また、クローン病患者における最適な術後 LCAP の適応を検討する目的で、当科におけるクローン病手術症例の検討を行う。

## 3. 研究の方法

### 基礎研究

平成20年までの研究で得られた臨床研究結果を学問的に裏付けるため、vitroの実験にて、LCAP有効性のメカニズムを解明する。すなわち末梢血好中球のサイトカイン mRNA 発現の解析および末梢血好中球の培養上清の分析からこのメカニズムの解明を行なう。術前の患者より末梢血好中球を下記の方法で分離する。

患者より採取した末梢血をPBSにて1:1に希釈する。

希釈したサンプルをFicoll-Paque PLUS(stemcell社)上に重層し、600g、30分遠心分離する。

血清、単核球、Ficoll-Paque PLUSの層を除去し、残った赤血球、好中球の層にACK lysing buffer(stemcell社)を加え、溶血させる。溶血したサンプルを遠心後、PBSにて洗浄を行なう。

洗浄後のサンプルにStemSep Granulocyte Enrichment Cocktail(stemcell社)を加え、氷上にて30分incubateする。

incubateしたサンプルに磁気コロイドを加え、さらに氷上で30分incubateする。

サンプルを磁気カラムに通し(standard StemSep Protocol)好中球をネガティブセレクションにて分離する。

分離後の好中球は一部はmRNAを抽出し、RT-PCR法にてcDNAに変換後、サイトカイン、PMN-E等のmRNAの発現をPCR法にて定量する。

また、好中球機能を網羅的に調査する目的でRPMI1640medium(SIGMA社)+10%FCS+ペニシリンを加え、 $5 \times 10^5$ /mlの濃度に調整後、培養する。培養後の上清中のサイトカイン、PMN-E等の蛋白の定量をELISA法にて行なう。またE. coli(ATCC25922)との共培養を行い、細胞死の検討をFACSにて行なう。また、貪食能の検討もFACS解析を行う。

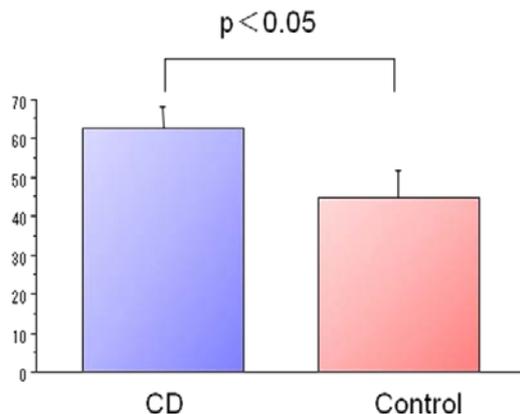
臨床データの解析

2000年10月から2010年10月まで当科にて手術を行ったクローン病患者80例、134手術例のうち狭窄症状を主訴に手術を行った腸管病変55症例、62手術例を対象とした。これらの症例について年齢、術前栄養状態、術前栄養摂取法、腸管病変、手術時間、出血量等患者背景と、術後合併症(surgical site infection: SSI)、残存小腸、術後在院日数との関連を検討した。

#### 4. 研究成果

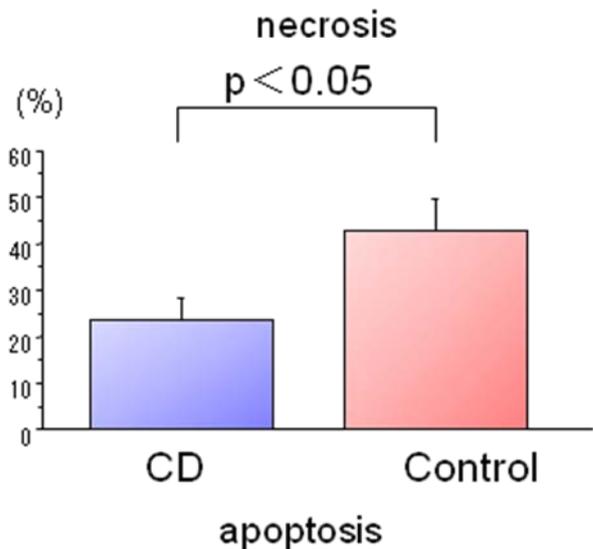
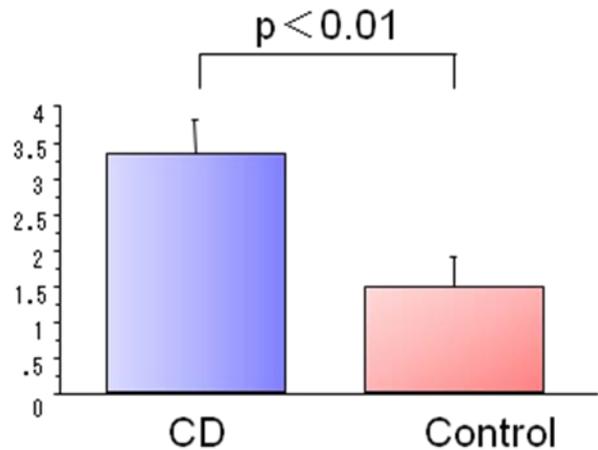
##### 基礎実験

E. coli 共培養後の好中球 viable cell の割合 CD群ではControl群に比べ viable cell の割合が増加していた。



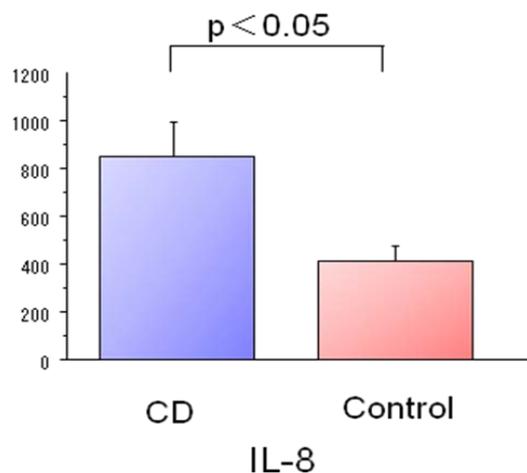
E. coli 共培養後の好中球の celldeath pattern

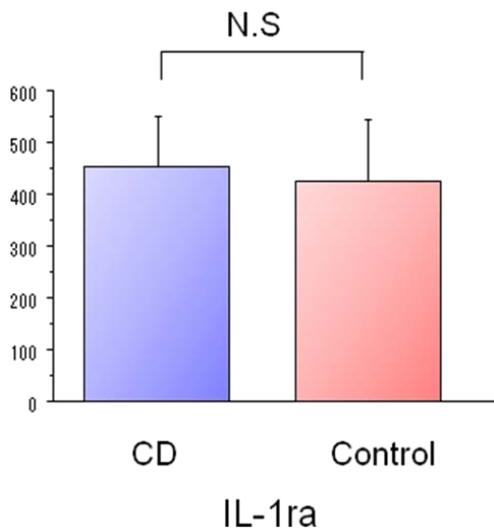
CD群ではControl群に比べ apoptosis の割合が減少し、necrosis の割合が増加していた。



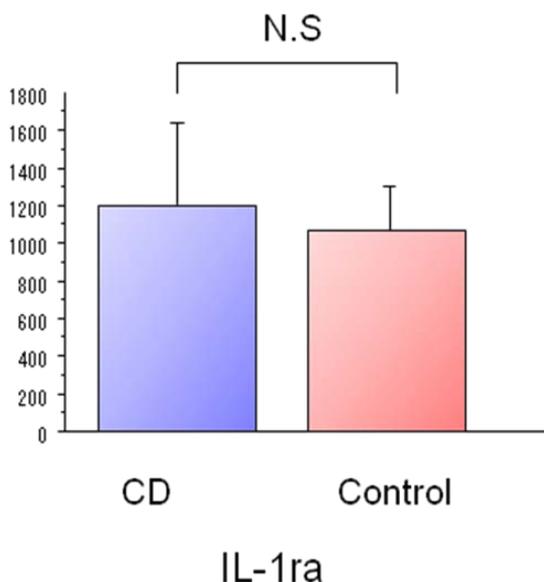
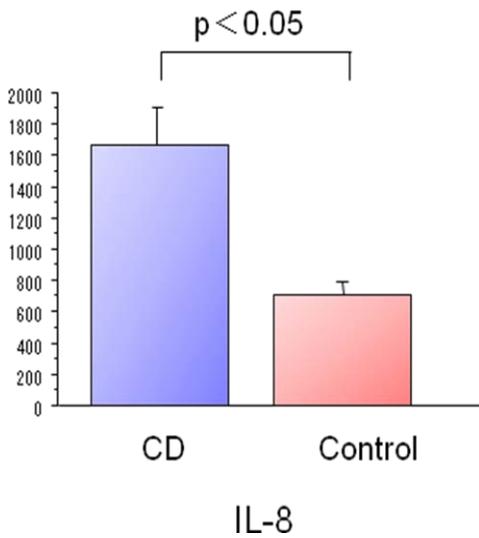
E. coli 共培養後の上清中炎症性、抗炎症性サイトカイン

共培養上清中の IL-8 は CD群で高値であったものの、IL-1ra では差はみられなかった。





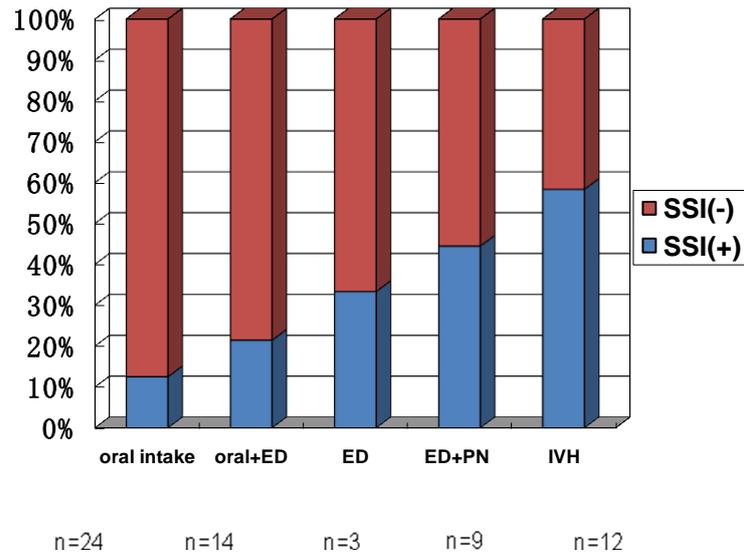
LPS 刺激後の好中球培養上清中の炎症性、抗炎症性サイトカイン  
LPS 刺激後上清中の IL-8 は CD 群で高値であったものの、IL-1ra では差はみられなかった。



クローン病患者の好中球は、食食後 viable な状態が維持されるが、その細胞死においては apoptosis 優位の細胞死から necrosis 優位となり、炎症性サイトカイン産生能が亢進することで局所で炎症が消退しにくい状態になると考えられる。

これまで報告してきた潰瘍性大腸炎患者と同様の profile を示し、クローン病患者における高い SSI 発生率と関連している可能性がある

臨床データの解析



栄養摂取に parental nutrition の追加を要する症例で SSI の発生が有意に多い

多変量解析において栄養管理に経静脈栄養を必要とするか否かが SSI の predictor であった。

これらの結果より病変が進行し、経口のみでの栄養管理が困難となった症例で SSI 発生率が高い可能性が示唆された。

経口摂取困難例に対する手術後に LCAP の適応がある可能性が示唆された。

#### 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)

[学会発表] (計 6 件)

① 吉山繁幸、三木誓雄、荒木俊光、大北喜基、楠正人

クローン病腸管病変における待機手術タイミングの検討 (続報)

第 8 回日本消化器外科学会大会

2010. 10. 15 横浜

② 吉山繁幸、安田裕美、大北喜基、荒木俊光、楠

正人  
当科における小児ダブルバルーン内視鏡の経験  
第 96 回日本消化器病学会総会  
2010.4.23 新潟

③大北喜基、三木誓雄、吉山繁幸、荒木俊光、楠  
正人  
クローン病患者の術後 high morbidity を裏付ける  
好中球機能異常の評価  
第 110 回日本外科学会総会  
2010.4.19 名古屋

④吉山繁幸、三木誓雄、荒木俊光  
クローン病痔瘻術後成績におけるインフリキシマ  
ブ投与の効果  
第 6 回日本消化管学会総会  
2010.2.10 福岡

⑤吉山繁幸、三木誓雄、荒木俊光  
クローン病腸管病変に対する手術タイミングの検  
討  
第 64 回日本大腸肛門病学会学  
2009.11.6 福岡

⑥吉山繁幸、三木誓雄、荒木俊光  
クローン病腸管病変に対する手術タイミングの検  
討  
第 95 回日本消化器病学会総会  
2009.5.9 札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉山 繁幸 (Shigeyuki Yoshiyama )  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60444436

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：