

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08681

研究課題名（和文）膵液活性を緩衝し膵液漏の重症化を回避する新規組織癒着材の開発

研究課題名（英文）Development of new surgical materials preventing tissue damages caused by pancreatic juice leakage

研究代表者

石沢 武彰（Ishizawa, Takeaki）

大阪公立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10422312

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：絹糸で両端を結紮したブタ内頸動脈をサンプルに含浸させ、組織障害を病理学的に評価するモデルを作成した。まず、患者の体液を動脈に作用させると、膵液と腸液との混合によって最も中膜が菲薄化し、平滑筋の核が変性した。次に膵酵素試薬を作用させると、中膜の菲薄化にはtrypsinとchymotrypsinが、核の変性にはtrypsinとelastaseが最も強く影響していた。そこで、膵液と腸液の混合液にtrypsinの阻害剤を添加して動脈に作用させると、中膜の菲薄化と核の変性は回避された。今後は、膵酵素阻害薬を徐放する高分子化合物を開発し、同様の実験系で膵液漏による組織変化の低減効果を評価する計画である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手術後に膵液漏が起きると、組織障害により血管が破綻し致命的な出血が起こる。本研究は、膵液が腸液と混合して活性化したtrypsinが、動脈の中膜を菲薄化させ、平滑筋の核を変性させるというメカニズムを解明した。Trypsinの阻害剤を添加すると血管障害が回避されるため、阻害剤を徐放する医療材料で手術中に血管壁を被覆すれば、膵液漏に伴う出血を予防でき、手術の安全性が大幅に向上する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：First, fluid samples obtained from patients after pancreatic resections were applied to the swine carotid artery. As a result, highest histological damages on the arterial wall were observed when patients' pancreatic juice was applied with intestinal fluid. Second, digestive enzyme solutions were applied onto the carotid artery. Then, trypsin and chymotrypsin were associated with thinning of the media, and trypsin and elastase affected on nuclear degeneration. Finally, mixture of patients' pancreatic juice and intestinal fluid was applied to the carotid artery after adding trypsin inhibitor, leading to prevention of tissue damages. In subsequent studies, we will create high polymer compound enabling sustained release of trypsin inhibitor to be placed on the vessel surfaces during pancreatic surgery.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：膵液漏 消化酵素 手術合併症 膵切除 医療材料

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

・膵切除の臨床導入から 100 年以上経過した現在でも、術後膵液漏が高率 (30-60%) に発生する。消化酵素を豊富に含む膵液の漏出は、血管断端の破綻による大出血や組織障害を伴う重症感染症などの致死的な合併症を惹起する。実際、膵頭十二指腸切除術の死亡率は 2.9% (本邦 NCD データ, 2014 年) であり、low-volume center では 15% に及ぶと報告されている。

・申請者は、3つのアプローチに基づく膵液漏対策を構想してきた：

I) 膵液漏を「見る」技術の開発：膵液は無色透明であるため、手術の際に膵液漏出の有無、さらには「どこから、どの程度の酵素活性を持つ膵液が漏れているか」を評価できない。申請者は、キモトリプシン活性に基づいて可視領域の蛍光を発する新規プローブ (Br J Surg 2013;100:1220-8) を開発し、膵断端における分枝膵管の断端や staple の小孔から膵液が漏出することを見出した (Gastroenterology 2015;149:1334-6)。また、膵を被膜の上から圧迫しただけで膵液漏が発生し、組織学的には同部の細胞に変性壊死が生じていることを明らかにした (J Gastric Cancer. 2018;18:134-41)。

II) 膵液漏を「防ぐ」技術の開発：膵液の漏出が単純な主膵管の閉鎖不全・縫合不全だけでなく、膵断端に開口する分枝膵管や、医療材料が通過した小孔から発生するのであれば、これらの開口部を充填・閉鎖する「組織癒着材」を塗布する方法が予防策として最も合理的である。また、組織癒着材からプロテアーゼ阻害剤を徐放させることで、膵断端の局所的な炎症を軽減し、遅延性の膵液漏の発生を予防できる可能性がある。

III) 膵液漏から「守る」技術の開発：膵液漏の「根絶」は困難であるため、膵液に暴露された組織の障害、特に血管断端の破綻や内腔の狭小化を予防する技術の開発も求められる。予備検討では、合成性縫合糸の脆弱化にアルカリ性の液性が、動脈の中膜障害に trypsin が重要な役割を持つことが示唆された。したがって、プロテアーゼ阻害とアルカリ性中和作用のある医療材料で血管を被覆することにより、高活性の膵液が漏出した場合でも、出血や肝不全などの重篤な合併症に進展することを回避できる可能性がある。

2. 研究の目的

・本研究では、上記のうち II) 膵液漏を「防ぐ」技術と、III) 膵液漏から「守る」技術、の開発に集中する。具体的には、まず腹腔内に漏出する膵液あるいは消化液成分の「何が」、血管の「どこに」作用して出血を誘発するのかを明らかにする。次に、組織障害の主因を阻害する機構を備えた医療材料で血管を被覆することで、組織学的な変化が低減するか検証する。

3. 研究の方法

(検討 1)

・絹糸で両端を結紮したブタの内頸動脈を患者膵液に含浸させ、血管中央部の平滑筋細胞の核の変化と中膜の厚さを病理学的にスコアリングするモデルを作成した。

・膵頭十二指腸切除術を受けた患者 4 例から、術後 3 日目に膵液、腸液、および膵液漏の影響が少ない腹水を採取、これらの排液およびその混合液を作成し、ブタ内頸動脈を 37 度で 48 時間含浸させた。その後、前述の評価系に従って組織障害の程度を病理学的に評価した。

・同様に、ヒトの消化液における活性あるいは濃度に調整した消化酵素試薬の溶液を作成し、ブタ内頸動脈を浸漬させて組織障害を評価した。

・ヒトの膵液と腸液の混合液中にある trypsin 活性を測定し、それを抑制する膵酵素阻害薬の濃度を求めた。これを 1 単位とし、ヒトの膵液と腸液の混合液に添加、ブタ内頸動脈を浸漬させた際の組織障害が緩和されるか病理学的に検討した。

(検討 2)

・消化器内視鏡における止血剤として本邦で薬事承認されている自己組織化ペプチド溶液を、消化酵素試薬あるいはヒトの消化液に暴露させ、容積の変化と組織接着性を評価した。

4. 研究成果

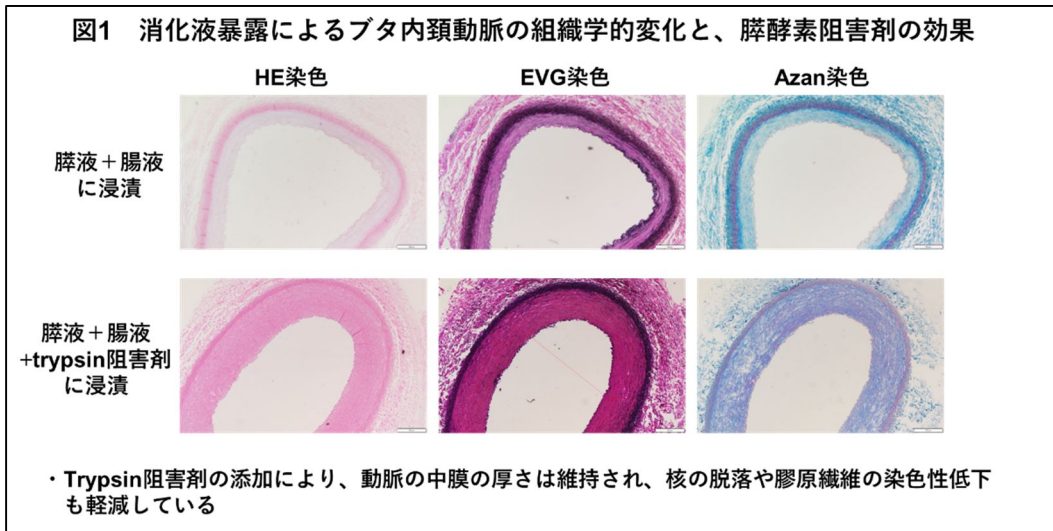
(検討 1)

・HE 染色と EVG 染色により、内頸動脈中央部の中膜の厚さを測定し、平滑筋の核の変化を 4 段階 (Grade 0, normal; 1, mild degeneration; 2, severe degeneration; 3, almost disappeared) に評価する系を構築した。Azan 染色では筋線維・膠原繊維の変化を評価し、膠原繊維の染色性の定価を 4 段階 (Grade 0, strong stain; 1, moderate stain; 2, weak stain; 3, no stain) で評価した。

・患者の消化液を用いた実験では、膵液単独および膵液に胆汁または腹水を添加した溶液では中膜の厚さは 0.52-0.57mm の範囲にあり、平滑筋細胞の核に変化を認めなかったが (Grade 0) 膵液に腸液を混合した溶液では中膜の厚さは平均で 0.32mm まで菲薄化しており、平滑筋の核も最高値 (Grade 3) まで変性していた。

・消化酵素試薬を用いた実験では、中膜の菲薄化には trypsin および chymotrypsin が、平滑筋の核の変性には trypsin と elastase が最も強く影響していた。試薬 amylase、lipase による血管の組織学的変化の程度は軽微であった。そこで、膵液漏による血管壁の組織障害を軽減させる治療標的を trypsin に設定した。

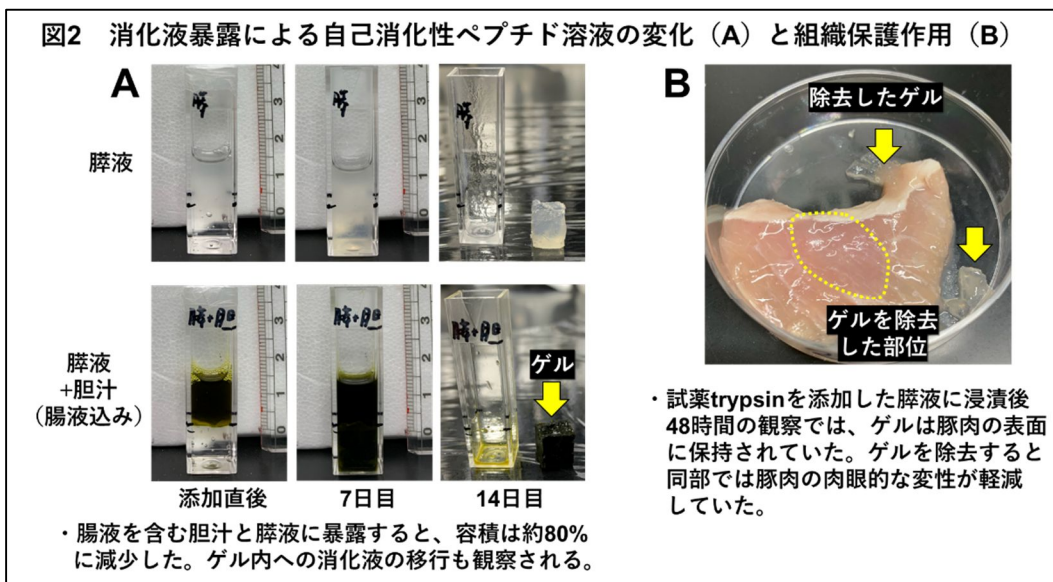
・患者膵液と腸液の混合液に、液中の trypsin 活性を十分に抑制し得る濃度の膵酵素阻害薬を添加し、これにブタ内頸動脈を含浸させると、中膜の厚さは平均値 0.55mm に維持され、半数のサンプルで核の変化が Grade 0 に保たれた（図 1）。



（検討 2）

・自己組織化ペプチド溶液を PBS、患者膵液単独、患者腹水に暴露すると、十分なゲル化が得られ、暴露後 14 日目の重量にもほぼ変化を認めなかった。一方、患者膵液と腸液の混合液あるいは膵液に試薬 trypsin を混合した溶液に自己組織化ペプチド溶液を暴露すると、十分なゲル化が得られたものの、14 日目の体積は約 80% に減少した。肉眼的には、消化液がゲルに浸透していく様子が観察され、ゲルに膵酵素阻害剤が内包されていた場合には十分に消化液と反応することが予想された。

・豚肉の中央部に自己組織化ペプチド溶液を塗布し、膵液に試薬 trypsin を混合した溶液に浸漬させ、48 時間後に溶液から取り出して観察した。ゲル化した自己組織化ペプチドは豚肉表面に留まっており、これを除去すると、同部では肉眼的に豚肉の変性が回避されていた（図 2）。



（考察）

・膵手術に伴う膵液漏により血管壁が組織障害をきたすトリガーは、腸液との混合や感染により活性化した膵液の trypsin であると推定された。従って、trypsin を徐放する自己消化性の医療材料で血管断端を被覆すれば、膵液や消化液に暴露されても、血管の破綻と大出血を惹起する重篤な組織障害が回避される可能性が示唆された。止血剤として臨床使用されている自己組織化ペプチド溶液に膵酵素阻害剤を内包させることにより、上記の機能が達成される可能性がある。同時に、組織接着性と膵酵素阻害作用を増強させたポリマーの開発も継続する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishizawa Takeaki, Akamatsu Nobuhisa, Kaneko Junichi, Arita Junichi, Hasegawa Kiyoshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Closure and anastomosis of the pancreas using a four-needle three-loop suture device	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Global Health & Medicine	6. 最初と最後の頁 225 ~ 229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35772/ghm.2022.01044	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kimura K, Ishizawa T
2. 発表標題 Clinical applications of intraoperative fluorescence imaging to hepatobiliary and pancreatic surgery
3. 学会等名 12TH AACR-JCA JOINT CONFERENCE（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ishizawa T
2. 発表標題 Expanding application of intraoperative fluorescence imaging in Asia-Pacific regions
3. 学会等名 Seoul International Symposium of Surgical Oncology 2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石沢武彰, 長谷川潔
2. 発表標題 蛍光イメージングを軸とした手術用デバイスの開発
3. 学会等名 第59回 日本癌治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔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	伊藤 大知 (Ito Taichi) (50447421)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授 (12601)	
研究分担者	長谷川 潔 (Hasegawa Kiyoshi) (20292906)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	
研究分担者	長田 梨比人 (Rihito Nagata) (00815706)	埼玉医科大学・医学部附属病院・助教 (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------