

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462072

研究課題名(和文)胆汁中サイトカイン網羅的解析による胆道ドレナージ後膵切術後合併症早期診断法の確立

研究課題名(英文) Model to predict the risk of intra-abdominal abscess after
pancreaticoduodenectomy by analysis of cytokine in bile

研究代表者

川井 学 (Kawai, Manabu)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40398459

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)：【目的】胆汁内サイトカインの網羅的探索による術後感染性合併症の指標となるサイトカインの同定。その結果、胆汁中サイトカインの網羅的探索による術後感染性合併症の新規早期診断となる新たなバイオマーカーの確立を目標とする。【方法】胆汁中のサイトカインはBio-Plexサスペンションアレイシステムによるサイトカイン網羅的解析によってIL-1、IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、MCP-1、IFN-、TNF-を測定。【成果】術後感染性合併症としての腹腔内膿瘍合併例では胆汁中サイトカイン網羅的解析によってIL-1、IL-1、IL-4、TNF-の有意な上昇を認めた。

研究成果の概要(英文)：The aim is to evaluate the impact of cytokine to predict intra-abdominal abscess after pancreaticoduodenectomy by analysis of cytokine in bile. Cytokine including IL-1、IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、MCP-1、IFN-、TNF- in bile which was collected intraoperatively were measured by global analysis. Levels of IL-1、IL-1、IL-4、and TNF- in bile of patients with intra-abdominal abscess after pancreaticoduodenectomy were significantly higher than those of patients without intra-abdominal abscess. Furthermore studies should be required to detect cut-off levels of IL-1、IL-1、IL-4、and TNF- in bile to predict the risk of intra-abdominal abscess after pancreaticoduodenectomy.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵頭十二指腸切除術 術後合併症 胆汁 サイトカイン 網羅的解析

1. 研究開始当初の背景

Jagannath らは、術前胆道ドレナージを伴う膵頭十二指腸切除術 (pancreaticoduodenectomy:PD) において、胆汁培養陽性症例では術後感染性合併症発生率 44% と陰性症例 15% に対して有意に高いと報告 (Br J Surgery. 92: 356-361, 2005.) している。術後感染性合併症は敗血症を惹起し、mortality に繋がる危険性が極めて高く、胆道ドレナージを伴う PD の術後感染性合併症の改善策は急務である。術前胆管ドレナージの意義に関して大規模な randomized controlled trial (RCT) がオランダで行われたが、術前胆道ドレナージ群では胆道ドレナージに関する合併症を含めた全合併症率は 74% であり、非ドレナージ群 39% と比較して有意に高く、術前胆道ドレナージはルーチンに行うべきではないと報告している (N Engl J Med. 362:129-137, 2010.) 閉塞性黄疸例において術前放射線化学療法を行う場合や手術待機時間が長い場合は、肝機能障害の悪化を防止するためには胆道ドレナージは必要である。しかし、胆道ドレナージが PD 術後感染性合併症にどのように影響を及ぼすかは明らかではなく、その解明は重要である。

我々は閉塞性黄疸を認め胆道ドレナージを施行した PD 症例 127 例を解析した結果、術前胆管炎をきたした症例は胆管炎を合併しなかった症例と比較して有意に術後重症合併症 (Clavien 分類 grade IIIa 以上) の頻度は高くなったことを明らかにした (胆管炎 (+); 62.5% vs. 胆管炎 (-); 28.8%、P=0.007)。そして重度術後合併症の危険因子解析では、単変量解析では術前胆管炎 (P=0.002)、内瘻ドレナージ (P=0.021)、膵癌以外の疾患 (P=0.001)、soft pancreas (P=0.001) に有意差を認め、多変量解析では術前胆道ドレナージ中の胆管炎の合併は PD 術後重症合併症を増加させるということを証明した (Am J Surg.;208:1-10,2014)。

	P value	オッズ比	95% confidence interval
内瘻ドレナージ	0.125	2.01	0.8-4.9
術前胆管炎	0.019	4.61	1.3-16.5
膵癌以外の疾患	0.141	4.22	0.6-28.8
Soft pancreas	0.846	1.79	0.1-5.1

表 1: 胆道ドレナージ患者における Clavien 分類 grade IIIa 以上の重度術後合併症の危険因子 (Am J Surg.;208:1-10,2014)

様々な研究において閉塞性黄疸における炎症性反応に対する指標として炎症性サイトカインとして Interleukin(IL) -1 β ,IL-6, IL-8, TNF α および抗炎症性サイトカインとして IL-10 が血清中において上昇していることが明らかになっている。しかし、これらの炎症性サイトカインの産生には胆汁中細菌によるエンドトキシンが関与しているが、閉塞性黄疸における胆汁中炎症性サイトカインの産生に関する詳細な報告はない。胆汁中サイトカインの測定; Decker らは胃切除や大腸切除において術後 1-2 日の TNF α および IL-6 濃度は血清よりもドレーン排液において有意に高い (J Surg Res 2005;126:12-18) と報告するように、自然免疫系細胞から産生される炎症性サイトカインは主に炎症局所で作用するため、血液内濃度よりも炎症部位の浸出液内濃度のほうが圧倒的に高くなる。

2. 研究の目的

胆汁感染による炎症反応の指標としてのサイトカインの測定は血清中サイトカイン測定では正確な炎症程度が反映されていない可能性が高く、炎症反応がおこっている局所である胆汁中のサイトカインの測定が重要である。さらに術後感染性合併症のバイオマーカーとしての胆汁中サイトカインの意義

を報告したものは無い。胆汁中サイトカイン測定は術後感染性合併症の指標として新たな炎症性バイオマーカーの発見に繋がる可能性は非常に高い。さらに炎症性サイトカインは多種多様であり、炎症性カスケードの中でのサイトカインの役割は複雑である。このため、胆汁中のいずれのサイトカインを測定ターゲットにするかが問題である。PD 術後重症合併症の診断に有効なサイトカイン決定のためには、同時に網羅的にサイトカインを定量的に測定し、サイトカインシグナルの全体像を把握し、術後感染性合併症と関連するサイトカインを同定することが重要である。現在まで閉塞性黄疸を伴う PD 症例の胆汁中サイトカインの網羅的探索の報告は皆無であると同時に胆汁中サイトカインと PD 術後合併症の重症度の関連性を検討した報告もない。

胆道ドレナージ症例における術前・術中胆汁中サイトカインの網羅的解析

同定されたサイトカインと PD 術後感染性合併症との関連性から、相関性のあるサイトカインによる新たな炎症性バイオマーカーを確立

新たな炎症性バイオマーカーによる術後感染性合併症早期診断モデルを確立し、PD 術後合併症治療の新たなアルゴリズムの提唱

3. 研究の方法

閉塞性黄疸を伴う膵頭十二指腸切除を施行した 10 症例の胆管ドレナージ施行時および術中胆汁の 20 検体中のサイトカインの網羅的解析を行う。さらに閉塞性黄疸を伴わない膵頭十二指腸切除を施行した 12 症例との胆汁中サイトカインを比較検討する。胆汁中のサイトカインは Bio-Plex サスペンションアレイシステムによるサイトカイン網羅的解析によって Bio-Plex Precision Pro™ ヒト サイトカインアッセイパネルを使用して IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、MCP-1、

IFN- γ 、TNF- α を測定した。

【サイトカインアッセイ手順】

- (1) ビーズは 2 色の蛍光色素の比率を変えて染め分けられ、それぞれのサイトカインに特異的な抗体を結合
 - (2) 検体と抗体付きビーズを振とうさせながら 30 分インキュベーション
 - (3) ビオチンラベルした検出抗体がそれぞれのサイトカインの異なったエピトープを特異的に認識→アビジンラベルした蛍光色素で検出抗体をラベル
 - (4) 検体を Bio-Plex サスペンションアレイシステムを用いて測定→ビーズを蛍光色素で識別し、レポーターシグナル強度でビーズ上に補足されたサイトカインを網羅的に定量
- 統計：胆汁中サイトカインは平均±標準偏差にて表した。2 群間の解析は T 検定あるいは Mann-Whitney *U* test にて行った。統計学的有意差は $P < 0.05$ とした。統計解析は SPSS software, version 20 (SPSS, Chicago, IL) を使用した。

4. 研究成果

(1) 対象症例の平均年齢は 70 歳 (47-82 歳)、男女比 13:9 であった。病理組織学的診断は表 1 のとおりであった。膵管癌、胆管癌、Vater 乳頭部癌の 10 例は閉塞性黄疸を合併しており、胆管ドレナージを施行した。

表 1：病理組織学的診断

膵管内乳頭粘液腫瘍	10 例 (23.9%)
膵管癌	5 例 (47.6%)
胆管癌	3 例 (16.7%)
Vater 乳頭部癌	2 例 (4.8%)
十二指腸癌	1 例 (2.4%)
膵粘液嚢胞性腫瘍	1 例 (2.4%)

(2) 術後合併症発生率は 7/22(31.8%)であり、gradeA 4 例、gradeB 2 例、gradeC 0 例であった。術後感染性合併症として腹腔内膿瘍を 3/22(13.6%)に認めた。

胆管ドレナージ施行例における術中胆汁培養は全例陽性 10/10(100%)であったが、胆管ドレナージ非施行例では全例胆汁培養は陰

性であった。腹腔内膿瘍合併例の術中胆汁培養陽性率は2/3(67%)であり、腹腔内膿瘍非合併例の術中胆汁培養の陽性率は8/19(42.1%)であった。胆汁培養陽性例が陰性例に比較して有意に腹腔内膿瘍合併率が高かった(P=0.038)。

表2：術後合併症

術後合併症	7例(31.8%)
膵液瘻	6例(27.2%)
Grade A	4例(18.2%)
Grade B	2例(9.0%)
Grade C	0例(0%)
腹腔内膿瘍	3例(13.6%)
腹腔内出血	0例(0%)
胆汁漏	1例(4.5%)

(3) 胆管ドレナージ時の胆汁と術中胆汁サイトカイン (pg/ml)の比較

閉塞性黄疸を伴う膵頭十二指腸切除を施行した10症例の胆管ドレナージ施行時および術中胆汁を比較した(表3)。胆汁ドレナージによってサイトカインであるIL-1 α (胆管ドレナージ時:72.8 \pm 32.1 vs. 術中:13.2 \pm 7.7)、IL-1 β (胆管ドレナージ時:336.9 \pm 261.7 vs. 術中:63.8 \pm 97.6)、IL-4(胆管ドレナージ時:28.9 \pm 26.1 vs. 術中:5.7 \pm 13.4)、IL-6(胆管ドレナージ時:7657.9 \pm 397.3 vs. 術中:267.5 \pm 288.0)、TNF- α (胆管ドレナージ時:787.6 \pm 562.6 vs. 術中:1449.7 \pm 142.2)が有意に低下した。

表3：胆管ドレナージ時胆汁サイトカインと術中胆汁サイトカイン (pg/ml)の比較

サイトカイン (pg/ml)	胆管ドレナージ時胆汁 (n=10)	術中胆汁 (n=10)	P
IL-1	72.8 \pm 32.1	13.2 \pm 7.7	0.001
IL-1	336.9 \pm 261.7	63.8 \pm 97.6	0.008
IL-4	28.9 \pm 26.1	5.7 \pm 13.4	0.004
IL-6	657.9 \pm 397.3	267.5 \pm 288.0	0.013
IL-8	8,724 \pm 7,181	3,900 \pm 4,673	0.063
IL-10	5.5 \pm 10.9	39.2 \pm 118.9	0.351
IL-13	2.9 \pm 3.3	1.9 \pm 2.6	0.553
MCP-1	2,740 \pm 2,636	2,500 \pm 1,515	0.717
IFN-	252.6 \pm 371.3	93.4 \pm 134.8	0.225
TNF-	787.6 \pm 562.6	449.7 \pm 142.2	0.031

(4) 閉塞性黄疸の有無による術中胆汁中サイトカイン (pg/ml)の比較

1における閉塞性黄疸のため胆管ドレナージを実施後、膵頭十二指腸施行(胆管ドレナージ施行群)10症例と閉塞性黄疸がなく胆管ドレナージを施行していない膵頭十二指腸施行(胆管ドレナージ非施行群)12症例の術中胆汁を比較した(表4)。胆汁ドレナージによってIL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、IL-6、TNF- α は有意に減少するものの、胆管ドレナージ非施行症例に比較して有意に高値であった。しかし、術後合併症は胆管ドレナージ施行群2例(20%)、胆管ドレナージ非施行群1例(8%)であり、両群間に有意差は認めなかった。

表4：閉塞性黄疸の有無による術中胆汁中サイトカインの比較

サイトカイン (pg/ml)	胆管ドレナージ施行群 (n=10)	胆管ドレナージ非施行群 (n=12)	P
IL-1	13.2 \pm 7.7	0.4 \pm 0.9	0.001
IL-1	63.8 \pm 97.6	1.4 \pm 2.2	0.038
IL-4	5.7 \pm 13.4	0.6 \pm 1.7	0.205
IL-6	267.5 \pm 288.0	0.9 \pm 1.6	0.006
IL-8	3,900 \pm 4,673	250 \pm 764	0.019
IL-10	39.2 \pm 118.9	1.1 \pm 2.1	0.279
IL-13	1.9 \pm 2.6	1.9 \pm 2.6	0.385
MCP-1	2,500 \pm 1,515	1,862 \pm 615	0.196
IFN-	93.4 \pm 134.8	0.3 \pm 0.7	0.026
TNF-	449.7 \pm 142.2	0.4 \pm 1.4	0.027

(5) 術後腹腔内膿瘍の有無による術中胆汁中サイトカイン (pg/ml)の比較

術後腹腔内膿瘍を合併した3症例と術後腹腔内膿瘍を合併しなかった19症例の術中胆汁サイトカインを比較した。腹腔内膿瘍合併症例ではIL-1、IL-1、IL-4、TNF-の有意的な上昇を認めた。

表5：術後腹腔内膿瘍の有無による術中胆汁中サイトカインの比較

サイトカイン (pg/ml)	腹腔内膿瘍 (+) (n=3)	腹腔内膿瘍 (-) (n=19)	P
IL-1	22.4 \pm 5.7	3.7 \pm 5.1	0.001
IL-1	126.1 \pm 166.5	14.6 \pm 32.7	0.008
IL-4	16.1 \pm 23.5	0.9 \pm 2.1	0.005
IL-6	393.8 \pm 430.3	124.6 \pm 237.6	0.473

IL-8	7,233±7.332	1,114±2,007	0.285
IL-10	2.6±4.0	21.0±86.4	0.370
IL-13	2.6±4.1	1.3±2.0	0.637
MCP-1	3,353±1,876	1,963±913	0.046
IFN-	358.2±620.4	106.3±279.4	0.233
TNF-	167.8±206.9	22.8±62.8	0.016

(6) 本研究のまとめ

閉塞性黄疸症例において胆管ドレナージによって胆汁中 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α は有意に低下した。

閉塞性黄疸を認めない症例と比較して胆管ドレナージを施行した術中胆汁の炎症性サイトカインである IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α は有意に高値であった。

術後感染性合併症としての腹腔内膿瘍合併例では胆汁中 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、TNF- α の有意な上昇を認めた。

以上より腹腔内膿瘍の危険因子として胆汁中サイトカインの網羅的探索により IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、TNF- α の有意な上昇が抽出された。今後は症例を重ねてカットオフ値を設定する必要がある。

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川井 学 (Kawai Manabu)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40398459

(2) 研究分担者

(計 5人)

山上 裕機 (Yamaue Hiroki)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20191190

廣野 誠子 (Hirono Seiko)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：60468288

岡田 健一 (Okada Ken-ichi)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：50407988

宮澤 基樹 (Miyazawa Motoki)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：90549734

清水 敦史 (Shimizu atsushi)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：00637910

(3) 連携研究者

(計 0人)

(4) 研究協力者

(計 0人)