

田中 貴之 論文内容の要旨

主論文

Development of a novel rat model with pancreatic fistula
and the prevention of this complication using tissue-engineered myoblast sheets.
膵液瘻ラットモデルの構築と組織工学を利用した筋芽細胞シートによる膵液瘻予防の検討

田中貴之、黒木 保、足立智彦、大野慎一郎、
北里 周、平原正隆、高槻光寿、江口 晋

Journal of Gastroenterology 2012 Nov 20. Epub ahead of print (ページ数 : 9)

長崎大学大学院医歯薬総合研究科医療科学専攻
主任指導教官：江口 晋

[緒言]

膵液瘻は、膵臓手術後に膵液が腹腔内へ漏れ出る状態であり、膵臓外科において最も注意すべき合併症の一つである。その発生頻度は術式により若干異なるが、10-30%とされている。また膵液瘻からの合併症として、腹腔内膿瘍、敗血症、仮性動脈瘤破裂などがあり、仮性動脈瘤破裂に伴う死亡率は14-58%といわれ、致命的状況を引き起こしかねない。これまでも、再建法の工夫、切除器具の工夫、補強法の工夫による膵液瘻予防はなされてきたが、現状において臨床的に膵液瘻を確実に予防する方法は存在せず、あるいは実験的検討に使用可能な膵液瘻小動物モデルの報告はない。一方、組織・臓器の傷害や欠損に対する新たな治療法として、細胞シートが注目されており、角膜再構築や食道粘膜切除後の食道狭窄予防、心不全治療のために細胞シートが実際に臨床の場でも利用されている。そこで、①膵液瘻ラットモデルの確立と②再生医療を活用した細胞シートによる膵液瘻予防の検討、を目的として本研究を行った。

[方法]

A) 膵液瘻ラットモデルの作成検討

対象動物：8-9週齢SD雄性ラット（体重250-300g）

開腹のみ群(sham群)と4か所のラット膵管(gastric, duodenal, common, splenic duct)ごとに膵管を切離した群(G, D, C, S群)を作成し(各n=5)、至適切離部位、至適観察期間を検討。

B) 筋芽細胞シートによる膵液瘻予防の検討

① 筋芽細胞シートの作製

細胞源：SD ラット由来筋芽細胞

筋芽細胞を温度応答性培地 (UpCell[®]) に 1×10^6 個を播種し、overconfluent になるまで 3-5 日間培養。その後、培養皿を 20°C に氷冷しシートとして回収。

② 筋芽細胞シート貼付による膵液瘻予防実験

レシピエント：8-9 週齢 F344 雄性ヌードラット (体重 250-300g)

A) の実験で検討したモデルを利用し、膵切離断端に cell shifter[®] を用いて筋芽細胞シートを貼付。シート(+)群とシート(-)群の 2 群を作成(各 n=5)。

③ 検討項目：術後 1, 3, 7 日目に犠牲死、摘出膵の肉眼的観察および HE 染色、筋芽細胞特異的蛍光染色 (MyoD 染色) にて病理学的に評価。また血清・腹水中アミラーゼ/リパーゼを測定。

[結果]

A) G・D 群では膵液瘻は極軽度で、全例生存。C 群では胆汁漏を併発し、3 日以内に全例死亡。S 群では膵液瘻を認め、5 例中 3 例は 4 週目に死亡、それ以外の 2 例は 4 週間以上生存した。また、S 群では膵周囲の炎症が著明であり、好中球の集簇を認め、G、D、C 群では認められなかった肉芽形成を認めた。

以上より splenic duct 切離 (S 群) が、膵液瘻ラットモデルとして至適であった。

B) 肉眼的には、シート(-)群では周囲との癒着が強固で、シート(+)群では軽微であった。病理学的検査ではシート(-)群では、膵周囲の炎症つまり好中球の集簇がみられ、肉芽形成していたのに対し、シート(+)群では好中球の集簇や肉芽形成は認められなかった。シート(+)群において、MyoD 染色で膵断端に密着する筋芽細胞シートの存在を認めた。血清アミラーゼ・リパーゼにおいて両群間に有意差はなかったが、腹水アミラーゼとリパーゼにおいて術後 1, 3 日目[シート(+)vs シート(-)：順にアミラーゼ(IU/l):4871.2 vs 8267.4、406.0 vs 2237.4、リパーゼ(U/l):356.8 vs 848.2、85.0 vs 382.2]に有意差 ($p < 0.05$) を認め、筋芽細胞シートによる膵液瘻予防効果を認めた。

[考察]

これまでの実験モデルはイヌやブタといった大動物モデルは存在していたが、本検討の如くのラットを用いたモデルは世界初である。本検討でのモデルの観察期間は短期間ではあるが、小動物モデルの様々な汎用性を加味すると、今後も膵液瘻予防実験に使用可能な理想的なモデルが作成し得たと考える。また既報の食道粘膜シートでは創傷部位の宿主細胞増生や炎症反応を減少させると報告された。本検討では細胞シートによる物理的な膵液瘻の予防に加え、膵周囲の炎症細胞の集簇が認められないことや周囲への癒着が少ないことから、細胞シートによる炎症軽減も作用した膵液瘻予防効果を示したと考える。

[結語]

本実験ではラットによる膵液瘻モデルの確立、および筋芽細胞シートによる膵液瘻予防という結果を得た。この結果は、今後の膵液瘻のさらなる実験に寄与し、さらに臨床の場において細胞シートの有用性を示唆するものと考えられた。