

氏 名	佐 藤 功
(ふ り が な)	(さ と う い さ お)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	乙 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 27 年 2 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 名	Changes in Cytokines in Drainage Fluid After Laparoscopic Surgery – Mechanism of Wound Healing (腹腔鏡下手術後の排液中サイトカインの変化―創 傷治癒のメカニズム)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 内 山 和 久 教授 廣 瀬 善 信 教授 林 道 廣

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《はじめに》

手術侵襲、外傷、感染などに対する局所反応は、障害された組織の細胞成分が trigger となって組織中のマクロファージから種々のサイトカインが産生され、好中球、マクロファージ、リンパ球などの炎症細胞が局所へ遊走し細菌や壊死物質が貪食除去される炎症相から始まる。Proinflammatory cytokine である IL-6 は種々の炎症細胞から産生され、術後数時間で血中濃度が上昇し、鋭敏な炎症性マーカーとされている。そして IL-6 が血管内へ spill over して全身に回り、肝臓で CRP 等の急性期反応物質の合成を誘導する。

一方 vascular endothelial growth factor (VEGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)などのサイトカインは組織修復に必要な血管新生を誘導し組織を新生すると同時に局所への炎症細胞浸潤を助長するとされる。毛細血管の新生とともに、結合組織の重要

な構成細胞である線維芽細胞が局所に侵入・増殖し、3～4 日後より局所での肉芽形成が起こる。次第にフィブリンは吸収されコラーゲンに置き換わり、1～2 週間後には新生血管や組織中の炎症細胞は減少しコラーゲン量が調節される再構築期となる。

このように創傷治癒の一連の生体反応は大きく 3 期（炎症期、組織新生期、再構築期）に分けられるが、腹腔鏡下胆嚢摘出術は侵襲が少なくかつ術中の細菌曝露はほとんど認められず、炎症期は短期間で軽微であると考えられるため、術後数日における排液中のサイトカインに注目した本研究は組織新生期のメカニズムを中心に検討できる。

本研究では腹腔鏡下手術後の排液を用いて、炎症相のサイトカインとして IL-6 を、組織新生期のサイトカインとして VEGF、bFGF を測定し、創傷治癒のメカニズムを検討することを目的とした。

《対象と方法》

胆石症に対し腹腔鏡下胆嚢摘出術を施行した 10 名を対象とした。術前と術後 24 時間、48 時間の末梢血を採取し、血清中 CRP を測定した。また腹腔内に留置したドレーンからの排液について排液量を測定するとともに、術後 12、24、48、72、96 時間後に回収し、サイトカイン（IL-6, VEGF, bFGF）濃度を経時的に ELISA にて測定した。

《結 果》

血清中の CRP は術前 0.09 mg/dl から術後 1 日目 2.3 mg/dl、術後 2 日目 2.4 mg/dl と有意に上昇した。排液量の術後 1 日の総量は 38 ml で、術後 2 日目の総量は 24 ml、以後減少する傾向を認めた。排液中 IL-6 は術後 12 時間 89.9 ng/ml、術後 12 時間から 24 時間 107.0 ng/ml、術後 24 時間から 48 時間 143.3 ng/ml、以後減少する傾向を認めた。排液中の VEGF は術後 12 時間、術後 12 時間から 24 時間では検出限界以下、術後 24 時間から 48 時間 289 pg/ml、術後 48 時間から 72 時間 1616 pg/ml、術後 72 時間から 96 時間 4436 pg/ml であった。bFGF は術後 12 時間 737 pg/ml であったが、術後 12 時間から 24 時間 279 pg/ml、術後 24 時間から 48 時間 192 pg/ml と有意に減少し、術後 48 時間から 72 時

間 603 pg/ml、術後 72 時間から 96 時間 512 pg/ml と再上昇する傾向にあった。

《考 察》

今回我々は、その創傷治癒過程における biochemical mediator の役割を検討するため、腹腔鏡下手術症例を対象とした。本術式は比較的侵襲が少なく、また術中術後に細菌曝露機会がほとんど無いと考えられ、実際に炎症期の反応指標である血清中 CRP 濃度は比較的 low 値であった。創傷治癒過程における炎症期の反応が軽微であると考えられ、正常な治癒過程、特に組織新生期を検討するのに優れた研究対象であると考えられた。創傷部に感染等が起こると炎症期が遷延し正常な創傷治癒過程が阻害されると考えられている。実際本研究では炎症期の反応指標である血清中 CRP 濃度は比較的 low 値であり、手術後の炎症反応は軽微であると考えられた。また、今回主にドレーンから採取した排液を用いてサイトカインを測定したが、排液は創傷活動が生じている部位に産生されたものであり、創傷治癒過程を直接反映しているものと考えた。また、今回用いた排液は創傷部位で産生されたものであり、創傷治癒過程を直接反映している可能性がある。したがって、正常な治癒過程、特に組織新生期を検討するのに優れていると考えられた。

本研究では組織新生期の過程をみるうえで、bFGF と VEGF に注目した。bFGF は、創傷時における線維芽細胞増殖や血管新生に関わり、治癒期間を短縮させる役割を有している。実際 bFGF は創傷治癒促進剤として褥瘡、難治性潰瘍、熱傷創などに対して臨床応用されている。今回の検討では排液中の bFGF 濃度は術後 12 時間以内に上昇したのちに一旦減少し、その後 3 日目から 4 日目に再上昇を示す二相性の上昇を認めた。bFGF は上皮細胞や中皮細胞、マクロファージなどから産生されるといわれている。また、Marcus らは腹膜中皮細胞が bFGF の産生とそのコントロールに関与していると報告している。最初の産生ピークとなった bFGF は、手術時の組織損傷によって直ちに炎症期が始まり、その刺激によって中皮細胞から産生されたものと考えられた。一方、第二のピークが 3 日目から 4 日目に認められたが、これは主に組織に浸潤したマクロファージから産生されたものと推定された。創傷後 3 日から 3 週間程度続く組織新生期は、線維芽細胞増殖とそれに伴

うコラーゲン生成及び組織における血管新生がその本体であり、局所に浸潤したマクロファージから産生された bFGF が重要な役割を担っていることが示唆された。

VEGF は線維芽細胞などから産生され、血管内皮細胞の増殖をはじめとして血管新生を促進している。VEGF 濃度の排液中での上昇には術後 3 日以上を必要とするが、創傷後 3 日目は線維芽細胞増生が盛んになる組織新生期の始まる時期と一致している。したがって、本対象での VEGF の産生源としては、局所で増生した線維芽細胞が重要な役割を担っていると考えられた。

組織新生期には多くのサイトカインが関係する複雑な過程が存在するが、bFGF と VEGF だけに絞って考察すると、主に組織中に浸潤したマクロファージから産生される bFGF により線維芽細胞が増生し、主に線維芽細胞から産生される VEGF により血管新生が起こり、創傷治癒過程が進行するものと考えられた。

《結 論》

腹腔鏡下手術症例を対象として、組織新生期の創傷治癒過程について検討した。その過程において、bFGF や VEGF が深く関与し、両者によって線維芽細胞増生や血管新生が促進され、創傷治癒過程が進行することが示唆された。

論文審査結果の要旨

創傷治癒過程には細胞内外における生物学的 pathway が多数存在している。一般に組織傷害後の創傷治癒過程は炎症期、組織新生期、再構築期に分類される。今回申請者は、その創傷治癒過程における biochemical mediator の役割を検討するため、腹腔鏡下手術症例を対象とした。本術式は比較的侵襲が少なく、また術中術後に細菌曝露機会がほとんど無い。実際に炎症期の反応指標である血清中 CRP 濃度は比較的 low 値であった。また、ドレーンから採取した排液を用いてサイトカインを測定したが、排液は創傷部位にて産生されたものであり、創傷治癒過程を直接反映している可能性がある。したがって申請者は、本研究対象が正常な治癒過程、特に組織新生期を検討するのに優れていると結論付けている。

本研究では組織新生期の過程をみるうえで、bFGF と VEGF に注目した。bFGF は、創傷時における線維芽細胞増殖や血管新生に関わり、治癒期間を短縮させる役割を有している。今回の検討で排液中の bFGF 濃度は術後 12 時間以内に上昇したのちに一旦減少し、その後 3 日目から 4 日目に再上昇を示す二相性の上昇を認めた。bFGF は中皮細胞やマクロファージから産生されるといわれているが、最初の産生ピークは、手術時の組織損傷によって直ちに中皮細胞から産生されたものであり、第二のピークは組織に浸潤したマクロファージから産生されたものと推定した。

VEGF は線維芽細胞などから産生され、血管内皮細胞の増生をはじめとして血管新生全般を促進している。VEGF 濃度の排液中での上昇には術後 3 日以上を必要とするが、創傷後 3 日目は線維芽細胞増生が盛んになる組織新生期の始まる時期と一致している。したがって、本対象での VEGF の産生源としては、局所で増生した線維芽細胞と推定した。

このように本研究では、組織新生期に多くのサイトカインが関係する複雑な過程が存在するが、腹腔鏡手術後のドレーン排液の bFGF と VEGF に着目し、組織新生期の線維芽細胞増殖あるいは血管新生に bFGF および VEGF が深く関与する可能性を示した。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Bulletin of the Osaka Medical College 60(2): 2014

<オンライン掲載> in press