

氏 名 やました かねふみ
山下 兼史

学位の種類 博士（医学）

報告番号 甲第 1581 号

学位授与の日付 平成 27 年 9 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学位論文題目

Pancreatic fistulae secondary to trypsinogen activation by
pseudomonas aeruginosa infection after pancreatoduodenectomy
（膵頭十二指腸切除後膵液瘻における細菌感染とトリプシノーゲン活性化についての検討）

論文審査委員（主査）	福岡大学	教授	山下 裕一
（副査）	福岡大学	教授	向坂 彰太郎
	福岡大学	教授	松井 敏幸
	福岡大学	准教授	高田 徹

博士学位申請論文内容の要旨

博士学位申請論文名

*Pancreatic Fistulae Secondary to Trypsinogen Activation by
Pseudomonas Aeruginosa and Infections after Pancreatoduodenectomy*

(日本語訳)

膵頭十二指腸切除後膵液瘻における細菌感染と
トリプシノーゲン活性化についての検討

博士学位申請論文キーワード

膵頭十二指腸切除術	膵液瘻
トリプシノーゲン	緑膿菌
エンテロバクター	

博士学位申請者氏名 山下 兼史

(平成 27 年 4 月 2 日提出)

【背景】膵頭十二指腸切除術(PD)は腹部手術の中で高難易度の術式であり、その合併症発生率は12～60%と他臓器手術と比較して未だに高率である。その中でも膵液漏は、腹腔内膿瘍や出血を来し手術関連死につながる非常に重篤な合併症である。

【目的】近年、膵液漏と細菌感染との関連が示唆されているが、そのメカニズムについては不明である。今回我々は、膵液漏患者より分離された細菌株を用いて、膵液漏のkey enzymeであるトリプシノーゲンの活性化についての実験を行った。

【対象と方法】2009年1月から2013年3月までに当院で施行した膵頭十二指腸切除術82症例を膵液漏のGrade別に分類した。ドレーン排液を培養し、膵液漏の起病菌の検索を行った。分離された細菌培養上清とトリプシノーゲンを37℃で共培養し、そのサンプルをSDS-PAGEにて電気泳動を行い、トリプシノーゲン活性化の有無を確認した。その後、SDS-PAGEで得られたペプチドを質量分析で解析した。Trypsinogen-Zymographyを用いてトリプシノーゲンを活性化するプロテアーゼを検索した。

【結果】当科で感染対策を行う以前の2013年3月までのPD施行症例50例中、Grade B/Cの膵液漏は9症例(18.0%)に認めた。Enterobacter cloacaeとPseudomonas aeruginosaはGrade B/Cの患者より分離され、これらの細菌の培養上清はトリプシノーゲンをトリプシンへ活性化した。また、この現象はプロテアーゼ阻害薬によって阻害された。Trypsinogen-Zymographyでは、Pseudomonas aeruginosaの培養上清中のトリプシノーゲン活性化バンドを50kDaに認めた。

【結語】これまでに細菌によるトリプシノーゲンの活性化の報告はない。本実験ではPseudomonas aeruginosaとEnterobacter cloacaeの培養上清によりトリプシノーゲンが活性化されることを明らかにした。PDの周術期管理においてこれらの細菌を中心とした感染のコントロールは重要であると思われる。

審査の結果の要旨

1. 斬新さ

膵頭十二指腸切除術後の膵液瘻と細菌感染の関連についての報告は散見されるが、実際に、どのような機序で細菌感染が膵液瘻を起こしているか、細菌感染が膵液を活性化するかということを明確に示した論文は未だない。本論文は、細菌感染による膵液の活性化を世界で初めて明らかにした。また、実験手法についても、zymographyでは通常カゼインやゼラチンを用いる。プロテアーゼの活性化物質検索のために、目的プロテアーゼを基質蛋白として用いたzymographyを行った報告も未だなく、実験手法自体も斬新である。

2. 重要性

当科の加藤らの研究により膵頭十二指腸切除術後の閉鎖式ドレーンの導入により膵液瘻が減少するとの新しいエビデンスが生まれた。(Drain selection reduces pancreatic fistulae risk: a propensity-score matched study. Hepato-Gastroenterology 2015; 62:73-80)閉鎖式ドレーンを用いることによりドレーン関連の逆行性感染が減少すると言われている。しかし、これまでに細菌感染と膵液瘻との関連を明確に示した論文はなく、本論文で、細菌感染が膵液を活性化させることを明確に示した。このことにより、膵頭十二指腸切除後の膵液瘻予防のために感染のコントロールが重要であることが実証された。

3. 研究方法の正確性

本研究では福岡大学病院で膵頭十二指腸切除術を施行された患者の十分に蓄積された臨床データを用いて行った。また、実験に関しては、福岡大学医学部微生物免疫学講座にて行い、実験結果については逐一、微生物免疫学講座のデータ検討会で正確性を確認した。また、神戸大学質量分析センターと共同研究を行い、神戸大学質量分析センターの豊富な経験をもとに、ペプチドの同定を行った。

4. 表現の明確性

目的・方法・結果・結論について明確かつ詳細に表現されている。

また、本研究は、福岡大学医学部外科学講座消化器外科・福岡大学医学部微生物免疫学講座・神戸大学質量分析センターと3施設で共同研究を行っており、それぞれ専門家を交えてその表現について検討を重ねてきたため、表現の明確性が担保された。

5. 主な質疑応答

Q:膵頭十二指腸切除術において、幽門輪は温存しているか？

A:基本的には幽門輪を温存していますが、幽門輪周囲のリンパ節廓清が必要な症例については、幽門輪を含めた胃切除を行っております。

Q:術式による膵液瘻発生の差異はあるか？

A:報告されている論文によると幽門輪を温存する~~る~~かしないかでは、差異はないという

報告が多いです。また、膵液瘻において一番重要である、膵管空腸吻合については、膵管胃吻合の方が、膵液瘻が少ないとの報告もありますが、ここに関してはまだ一定の見解が得られておりません。当科では膵管空腸吻合術を第一選択としています。

Q:膵液瘻の判断基準であるドレーンは、どこのドレーンか？また、膵液瘻の時は膿性の排液はあるか？術後、どの時期に膵液瘻が多いか？

A:当科では、膵管空腸吻合部後面・肝尾状葉下面・胆管空腸吻合部後面の3カ所にドレーンを挿入しています。術後、膵液瘻の判断となる排液中のアミラーゼが高値となるドレーンは、膵管空腸吻合部後面のドレーンが一番多いです。また、膵液瘻発生時には、ドレーンより膿性の排液が認められる症例が多いです。膵液瘻発生が一番多い時期は、術後1週間前後です。

Q:膵液活性化に関する胆汁の影響はあるか？

A:胆汁も膵液を活性化しますが、当科では術後、胆管チューブと膵管チューブを挿入しているため、膵液と胆汁の流れは別々にしています。そのため、膵頭十二指腸切除後の膵液瘻に対する胆汁の影響は少ないと考えられます。

Q:リパーゼに対する膵液漏の影響はあるか？

A:リパーゼも膵液中の重要なプロテアーゼです。一般的には、急性膵炎等においてもトリプシノーゲンの活性化が非常に重要であると言われていています。今回の研究でリパーゼによる膵液瘻の直接的な影響は確認しておりませんが、トリプシノーゲンが活性化したトリプシンによってもリパーゼは活性化されるため、膵液瘻においてもリパーゼは何らかの影響を及ぼしている可能性があると思われます。今回の実験では、膵液の活性化に一番重要であるトリプシノーゲンの活性化について注目しました。

Q:このようなデータが出た場合に、臨床的にはどのように注意すればいいか？

A:膵頭十二指腸切除術の対象疾患では、術前に黄疸や胆管炎を認め、胆道ドレナージが必要となる症例があります。この時に、胆汁細菌培養を提出し、もし、緑膿菌を認めたら、術前に完全に緑膿菌をコントロールしてから手術を行うようにしています。また、術前、緑膿菌の感染を認めた症例に関しては、周術期も緑膿菌の監視培養を行い、状況によっては、周術期に術前の細菌感受性を元に抗生剤の選択を行っております。

Q:この研究を行った時のドレーンは全部閉鎖式ドレーンか？

A:初期はほとんど開放式ドレーンで後期の症例に関しては閉鎖式ドレーンを使用しています。本研究には両方のドレーンの症例が含まれています。

Q:緑膿菌は外因性でエンテロコッカスやエンテロバクターは内因性の感染によるものだが、感染経路はどのように違うか？また、検体の採取はいつ行っているか？

A:膵頭十二指腸切除術の切除範囲は広範囲に及びます。よって、術中に腸管を切除した時等に、腸管中の細菌が術野を汚染する可能性もあります。緑膿菌に関しては、術前に胆管炎を併発しており抗生剤治療を行った症例等に多く認められますが、この場合も、術中に胆管切除した時に、胆汁中の緑膿菌が術野を汚染した可能性が考えられます。検体の採取は、術後1、3、5、7日目に行っております。

Q:50kDaのバンドの特定をするために、バンドを切り出して特定できる可能性はあるか？

A:実際に、Zymography で認めた 50kDa のバンドを切り出して、再度質量分析を行いました。しかし、SDS-PAGE と異なり Zymography においては、ゲル中にトリプシノーゲンの蛋白が多く含まれています。このため、恐らく緑膿菌の培養上清中のトリプシノーゲンを活性化するプロテアーゼの蛋白量より、切り出したゲル中のトリプシノーゲンの蛋白量の方が多かったため、50kDa のバンドのペプチドを検出することができませんでした。

Q:腹腔内にプロテアーゼ阻害薬を注入する等の治療方法はあるか？

A:臍液瘻が発生した時に、フサンや FOY 等のプロテアーゼ阻害薬で洗浄するという報告もありますが、この効果についてはまだ一定の見解が得られておりません。

Q:ドレーン自体が臍液瘻を感知するようなシステムの開発可能か？

A:貴重なご意見ありがとうございます。今後の検討課題とさせていただきます。

本論文は、上記の内容を踏まえ主査・副査で協議した結果、学位論文に値すると評価された。