

氏名・(本籍)	葛本慶裕(兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士(論)第215号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成9年6月27日
学位論文題目	Degradation of Extracellular Matrix in Intestinal Anastomosis Induces Loss of Tensile Strength at an Early Phase of Wound Healing: Protective Effect of Nafamostat Mesilate (腸管吻合後抗張力低下における吻合部細胞外間質変性の関与: 抗張力低下に対するnafamostat mesilateの予防効果)

審査委員	主査 教授	馬場 忠雄
	副査 教授	服部 隆則
	副査 教授	小玉 正智

論文内容の要旨

【目的】

消化管吻合後1-3日目に吻合部抗張力低下が起こりこのことが術後縫合不全発生の原因のひとつになることが考えられる。Högstromらはラット腸管吻合モデルにおいて抗張力低下の原因は、主として好中球由来のproteinaseや oxygen free radicalによって引き起こされるcollagenの変性にあると考察し、oxygen free radicalの消去系酵素であるsuperoxide dismutase (以下SOD)、serine proteinase inhibitorであるsoya-bean trypsin inhibitor (以下STI) が術後の吻合部抗張力低下を抑制することを報告した。しかし、STIの分子量が大きくアレルギー反応が危惧され臨床応用が困難であると報告した。nafamostat mesilate (以下NM) は膵炎、DIC等に対して我が国で広く臨床使用されている蛋白分解酵素阻害剤であることより我々は同様のラット腸管吻合モデルにおいてNM投与の効果を検討した。また、plasminはfibronectinやlamininを分解するのみならずprocollagenaseを活性化することから、fibrinolysisも抗張力低下に関与している可能性を考慮し、吻合部におけるcollagenの変性以外の因子である吻合部のextracellular matrix (以下ECM) の変性について線溶系の立場から免疫組織学的に検討した。

【方法】

200-300grの雌のSprague Dawley ratを用い、ラット腸管吻合モデルは前処置なしに全身麻酔下に開腹回盲弁より約5cm口側の小腸を一端切離した後、端々吻合した。腸管吻合ラットを以下の4群に分け術後抗張力、および吻合部の組織学的変化を術直後、術後1、3、5、7日目に比較検討した。組織の固定は4%パラホルムアルデヒドを用いて、パラフィン包埋を行った。各切片は4μmに作成し、染色法はhematoxylin-eosin染色、Azan染色、免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色はDAKO SAB Kitを用いてSAB法にて行った。発色基質としてaminoethylcarbazoleを用いた。抗体として、plasminogen activator inhibitor-1 (以下PAI-1)、vitronectin (以下Vn)、fibronectin (以下Fn)、血液第XIII因子 (以下factor XIII) を用いた。

Group 1. (SOD control: N=30) 術後8時間毎生食0.5mlを計3回静注した群

Group 2. (NM control: N=30) 術後12時間毎5%ブドウ糖1mlを計6回腹腔内投与した群。

Group 3. (SOD treatment: N=32) 術後8時間毎SOD12mg/kgを生食0.5mlに溶解して計3回静注した群。

Group 4. (NM treatment: N=28) 術後12時間毎NM 20mg/kgを5%ブドウ糖1mlに溶解して計6回腹腔内投与した群。

以上の4群に分けて検討し、Group 1と3、Group 2と4間の抗張力比較における有意差検定は、t検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

術後抗張力は、コントロール群 (Group 1と2)では術翌日には術直後抗張力値の約58%に低下し、さらに術後3、5、7日目にはそれぞれ約33%、36%、83%の値を示した。Group 3の抗張力は、術翌日が術直後の約94%を示し、Group 1の約58%に対して有意に高値を示した ($p<0.01$)。術後3、5、7日目においてもそれぞれ約51%、62%、97%とGroup 1に比してそれぞれ有意に高値を示した ($p<0.05$)。Group4の抗張力は術後3、5日目においてそれぞれ約65%、53%とGroup 2に比して有意に高値を示した ($p<0.05$)。以上よりSOD、NM は腸管吻合部抗張力低下を有意に抑制することが出来た。術翌日の吻合部における白血球集積は、Group 1と2に比べGroup 3と4では軽度であった。術後3日目吻合部collagenの変性はGroup 1と2に比べGroup 3と4では軽度であった。術翌日、Group 3ではGroup 1と比べ吻合部の糸周辺においてPAI-1の強陽性像が認められた。Group 4でもGroup 2に比べると同様の結果が得られた。術後1、3日目においてGroup 1と2に比べGroup 3と4では吻合部周辺の比較的広い範囲にFn、Vnの強陽性像を認めたが、術後5日目以後に陽性像は認めなかった。血液第XIII因子は、術後3日目にGroup 3と4でGroup 1と2に比べ吻合部の糸及びその周辺のECMにおいて強陽性像を認めた。

【考察】

ラット腸管吻合は術翌日より吻合部を中心に白血球集積が起こり、術後3日目に抗張力が最も低下した。SOD、NM投与にて吻合部collagenの変性、および吻合部ECMにおけるFn、Vnの変性に改善が認められたことより、術後抗張力低下の原因として以前より報告されてきた好中球を介した吻合部collagenの変性に加え、さらに吻合部ECM(Fn、Vn、fibrin、fibrinogen、血液第XIII因子等)の変性も関与していることが考えられた。またGroup 1において術翌日PAI-1の局在を認めなかったのに対して、Group 3では陽性所見が得られたことより、SODは術後早期にPAI-1の変性を予防し、吻合部ECMの変性を抑制することが示唆された。

【結論】

腸管吻合後抗張力低下の原因の一つとして術後早期の吻合部ECMの変性が関与することが考えられた。臨床において、術後縫合不全の予防に蛋白分解酵素阻害剤であるNMが有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

消化管吻合部の抗張力が術後1-3日目に低下することが、術後の縫合不全の原因のひとつで、抗張力低下には好中球由来の蛋白分解酵素や活性酸素によって引き起こされる吻合部のcollagenolysisが重要な役割を果たしていると考えられてきた。ラット腸管吻合モデルにおいて、活性酸素の消去系酵素superoxide dismutase (SOD) や蛋白分解酵素阻害剤soya-bean trypsin inhibitor (STI) が術後の吻合部抗張力低下を抑制することが報告されたが、いずれも分子量が大きくアレルギー反応が危惧され、臨床応用は困難である。

本研究では、ラット腸管吻合モデルにおいて臨床的に使用されている蛋白分解酵素阻害剤nafamostat mesilate (NM) の術後抗張力低下に対する効果を検討した。また、fibrinolysisもcollagenolysisと同様に抗張力低下に関与している可能性を考え、吻合部におけるextracellular matrix (ECM) の役割について、線溶系の立場から免疫組織学的に検討し、抗張力低下の機序解明を試みた。

ラットの小腸吻合モデルにおいて、術後SOD投与群、NM投与群ともに抗張力低下はコントロール群に比べて有意に抑制された。術後1日目の病理組織像では、吻合部粘膜下collagen量の変化はほとんど認めなかった。しかし、免疫組織化学的染色にてfibronectin (Fn)、vitronectin (Vn)、血液第XIII因子は、SOD投与群において術後1日目、3日目に吻合部粘膜下に強く染色され、5日目、7日目にはほぼ消失した。NM投与群は、SOD投与群に比べて染色性は弱かったが、ほぼ同じ経過を示した。なお、plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)はSOD投与群において、術

後1日目に強く染色されたことより、術後早期において、これらECMの退行変化はコントロール群に比べて軽度であると考えられた。従って、吻合部の粘膜下ECMの存在が、抗張力低下を予防する可能性が示された。

以上の結果は、消化管吻合早期において吻合部のcollagen以外のECM (Fn, Vn, 血液第XIII因子) が、抗張力低下に重要な役割を果たしている可能性を明らかにし、また、NMが臨床における術後縫合不全の予防に役立つ可能性を示した点に意義があり、博士(医学)の学位を授与するに値すると判断される。