

学位申請論文「要約」

この学位申請論文は、Artificial Organs に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

Artificial Organs に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開することの承諾を得ている。

リポゾーム封入ヘモグロビンにおける創傷治癒の研究
ーラット気管支断端縫合モデルにおける実験的検討ー

－ 研究の背景 －

国際的にも日本でも、近年肺がん患者が増加しており、手術件数も増加している(図 1)。肺がんの手術の多くは肺葉切除以上の、気管支切除を伴う方法となる。肺葉切除術後には、0.8～12%の割合で、気管支断端瘻(Bronchopleural fistula; BPF)の合併が報告されている[1-5]。BPF をひとたび合併すると、重篤な肺炎、呼吸不全などに陥り、不幸な転帰をたどることがあり、われわれ呼吸器外科医が最も危惧しなければならない病態である。BPF の原因は、技術的な理由によるものと、感染症、腫瘍残存など物理的脆弱性が挙げられる。気管・気管支は、内腔が確保される様に馬蹄形の軟骨をもち、食道と接する部分は薄い平滑筋層で構成されている。軟骨組織は元々血管網が乏しい上に[6]、手術時にリンパ節郭清などで栄養血管である気管支動脈や周囲の毛細血管が除去され、より一層の血流低下を引き起こすことなども BPF 発生の理由と考えられている[7-9]。以前から BPF を予防するため、術後高濃度の酸素投与を行ったり[10]、周術期の栄養の改善を目的とした高カロリー輸液、出血による貧血改善の輸血[11]などが行われてきた。また組織補強の目的で、気管支断端を血流を温存した有茎筋皮弁や大網、生物学的接着剤で覆うなどの方法がとられてきた[2、3、7、9]。自動縫合器の使用により、手縫いによる気管支断端処理より BPF を予防できるという報告もある[4、5]。し

かし手術操作のほとんどを自動縫合器で行う現在でも、BPF は未だ重篤な合併症として残存している。現在は高齢化社会となり様々な合併症を抱えた患者や、化学放射線治療が発展し、術前に放射線化学療法を施行され、臨床病期の down-staging を得られた後に手術適応となる患者も増えてきた[12]。しかしこれらは血管やリンパ管など脈管の減少を招くなど、創傷治癒遅延因子となり、BPF 発生の risk を一層高めることになる[13、14]。

人工酸素運搬体の 1 つであるリポソーム封入ヘモグロビン (Liposome-encapsulated hemoglobin; LEH) は、今まで皮膚、消化器の分野で創傷治癒を促進することが報告されている[15、16]。LEH の特徴は、サイズが赤血球 (Red blood cell; RBC) に比べて非常に小さいが、RBC と同等の酸素運搬能を有し、酸素親和性を調整することができることなどである (図 2)。そのため、LEH は損傷部位のより狭小化した側副血行路や毛細血管を容易に還流でき、低酸素を改善する効果が得られると考えられている。

本研究では、今までの報告をもとに、低酸素下での酸素供給を増加させる方法として、RBC よりも高親和性の LEH (high oxygen affinity-LEH; h-LEH: $P_{50}O_2 = 17\text{mmHg}$) を用いた。LEH が血流の乏しい気管支断端においても、循環し創傷治癒を促進すると仮定し、ラット気管支断端縫合モデルを用いて、実験的にその効果を

検討した。また術前導入療法後の手術モデルとして、術前に放射線照射を行ったラットを作成し、同様に LEH の効果検討を行った。

－ 総括 －

【目的】呼吸器外科手術後の気管支断端瘻 (Bronchopleural fistula、BPF) は、外科手術の技術や器具が進歩してきた昨今においても、肺葉切除における致命的な合併症として今なお重要な課題である。そこでわれわれは、BPF の発生を低下させる目的で、組織の創傷治癒促進効果があるとされる、人工酸素運搬体のリポソーム封入ヘモグロビン (Liposome-encapsulated Hemoglobin; LEH) を用いて、LEH が気管支断端においても創傷治癒促進効果をもたらすのか、実験的に検討した。

【対象と方法】Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットを用い (n=121)、手術 4 日前に胸部に放射線照射 (irradiation; IR) を行なった群 (IR+、n=103) と、放射線照射を行なわなかった群 (IR-、n=18) を作製し、左肺全摘除術を行った。左主気管支断端は 7-0 モノフィラメント糸を用い、Sweet 法にて 3 針で縫合閉鎖した。気管支断端閉鎖時に高酸素親和性の LEH (high oxygen affinity-LEH; h-LEH、 $P_{50}O_2=17\text{mmHg}$)、または生理食塩水 (normal saline; NS) を無作為に静脈内投与した (10ml/kg)。2 日後に気管支断端の破裂圧を測定した後、

組織採取、標本作成し、気管支縫合部におけるマクロファージ、好中球、単球の浸潤度を検討した。上記の結果から、IR+群において、h-LEH 投与群と NS 投与群の左主気管支断端破裂圧に有意差が大きく出たため、そのメカニズムを検討すべく、同種ラット赤血球 (Red blood cell; RBC) 投与群も同様に作製し比較検討した。また h-LEH の用量・効果関係を見るため、IR+群において h-LEH の投与量を 2ml/kg に減量し (h-LEH(2)) 投与した群を作成し、比較検討した。

【結果】放射線照射の有無に関わらず、10ml/kg 量の h-LEH(h-LEH(10)) 投与群で気管支断端破裂圧は NS 投与群に比較し、有意に高値であった (IR-; h-LEH(10) 212 ± 78 mmHg 対 NS 135 ± 63 mmHg、 $p=0.03$ 、IR+; h-LEH(10) 162 ± 48 mmHg 対 NS 116 ± 56 mmHg、 $p=0.001$)。気管支断端破裂圧が 100mmHg 以下の個体数を検討したところ、放射線照射の有無に関わらず、h-LEH(10) 投与群で少ない傾向であり、IR+群では有意差が出た (IR- NS; $4/9=44.4\%$ 、h-LEH(10) $1/9=11.1\%$ 、 $p=0.3$ 、IR+ NS; $11/29=38\%$ 、h-LEH(10) $3/32=9.4\%$ 、 $p=0.01$)。RBC 投与群の気管支断端破裂圧は、h-LEH(10) 投与群と NS 投与群の間の値を示し (RBC 投与群 145 ± 46 mmHg)、NS 投与群と間で有意差が出た ($p=0.04$)。気管支断端破裂圧が 100mmHg 以下の個体数は両群との間に有意差は出なかった (RBC; $5/26=19.2\%$)。用量・効果関係の検討では、h-LEH(2) 投与群の破裂圧は 133 ± 66 mmHg であり、

h-LEH(10)投与群と NS 投与群との間の値となり、両群との有意差は出なかった。また気管支断端破裂圧が 100mmHg 以下の個体数 ($6/16=37.5\%$) も、同様の結果であった。組織学的にみると、放射線照射の有無に関わらず、10 及び 2ml/kg の h-LEH 投与群で有意にマクロファージの出現が増えていた。また術側で好中球浸潤が増える傾向にあった。

【考察、結論】気管支断端破裂圧は、NS 投与群に比べ、h-LEH(10)投与群で放射線照射の有無に関係なく有意に高くなった。h-LEH(2)投与群での気管支断端破裂圧は RBC 投与群と同等であり、明らかな気管支断端破裂圧の改善は認められないことから、h-LEH を十分量投与することが、放射線照射の有無に関係なく、マクロファージの誘導に関連して、物理学的張力や形態学的変化を改善し、早期に気管支断端の創傷治癒を促進している可能性を示唆していると考えられた。気管支断端破裂圧は術前放射線照射で一般的に低下傾向にあったが、IR+群の h-LEH(10)投与群と IR-群の NS 投与群の破裂圧が近似していることから、放射線照射後の高 risk 群でも、h-LEH 投与により低 risk 群と同等の創傷治癒改善が期待できることを示唆していると考えられた。

－ 考察と展望 －

呼吸器外科領域の手術における BPF は、生命を脅か

す重篤な合併症として、手術手技・技術が向上した今日でも残存している。また高齢化社会に伴い様々な合併症を持った患者や、肺がんに対する化学・放射線治療の発達により、術前化学・放射線療法などが行われる症例が増えてきている。それらの合併症や術前治療の多くは創傷治癒遅延因子となり、BPFの原因となり得る。BPFの発症率は0.8～12%との報告が一般的である[1-5]。BPFを予防するため、組織の補強、血流維持や早期の血管再生を目的として、大網充填法や生体接着剤を用いるなど様々な工夫が成されてきたが、未だ完全に予防できていないのが実状である。術後BPFは生命に関わるだけではなく、合併により追加の治療が必要となり、絶命しなくとも術後の治療が遅れ、患者へ多大なる肉体的・精神的負担をかけるだけでなく、医療費のコスト増大など経済的な問題にもつながる。

今回用いたLEHは、現在までに、ラットの脳、骨格筋、サルの脳、ジャービル(スナネズミ)の内耳システムを虚血から守るとの報告がされている[17-22]。またマウスの皮膚欠損部やラットでの胃縫合部の創傷治癒を促進することも証明されている[15、16]。LEHは、今まで開発されてきた人工酸素運搬体がもつ様々な欠点や副作用を、ヘモグロビンをリポソーム膜で覆うことにより克服し、赤血球代替品としても有用であると期待されている[25]。LEHは、様々な動物や臓器で臓器保護作用が報告されている。それらの結果は、LEH

が赤血球代替品としてだけではなく、酸素運搬体として RBC よりサイズが小さいために微小循環を改善し、酸素供給によるエネルギー代謝の効率化を介した虚血組織の保護に働いていることを示唆している。それらを踏まえ、LEH を用いることにより、縫合部の虚血、低酸素、循環不全を改善し、縫合不全を回避することができると仮定しラットモデルで検討した。機能的には気管支断端破裂圧を測定した。また形態・臨床病理学的な面から H-E 染色組織像を、薬理学的な面から用量・効果関係を検討した。気管支断端の創傷治癒効果を判定するため、気管支断端破裂圧を術後 2 日目に測定したのは、今までの基礎研究において、LEH 使用後 2 日目までが最も LEH の効果が認められているとの報告がなされており [16]、またわれわれの予備実験においても、気管支断端破裂圧が術後 4 日目と比較して、術後 2 日目に顕著な圧低下が認められたためである (図 6)。また手術のみのラットに加え、術前に胸部放射線照射を行ない compromised animal としたラットを作成し、検討した。放射線照射は創傷治癒遅延因子として以前から認識されている。その主たる作用は、血管やリンパ管の破壊や細胞損傷が原因と考えられている [26、27]。胸部放射線照射においても気管支内皮が同様の状態となり、元々血流の少ない気管支において、一層の負荷をかけられることが想定され、実験系とした。また化学療法と放射線照射を行ったラットの報告

を検索したところ、放射線照射群において早期に創傷治癒が抑制されていたとの報告がある[28]。20Gy という値は、今までの実験研究から、日常生活への危険性を避け、7 日以上放射線照射による影響が残らないようにしながらも、創傷治癒には影響を伴う値である[28]。放射線照射から 4 日後に手術を行なったのは、今までの研究から照射 3 日目において既に創傷治癒遅延が認められていたためである[28]。結果として、気管支断端破裂圧は、放射線照射の有無に関わらず、h-LEH(10)投与群で NS 投与群に比べ、有意に高値であるとの結果であった。また破裂圧が 100mmHg 以下(人においては 20mmHg 相当)の個体数を抽出したところ、NS 投与群に比べ h-LEH(10)投与群で個体数が少ない結果となり、IR+群においては有意差が出た。RBC 投与群は h-LEH(10)投与群と NS 投与群の中間を取る結果となり、気管支断端破裂圧は、NS 投与群と有意差が出た。これは以前より、術後回復の促進として手術時の出血による貧血に対し輸血を行い貧血を是正し、酸素供給を改善していたこと[11]が、創傷治癒に対しても一定の効果を持っていたことを示唆していると考えられた。

今回われわれの実験では、IR+群での気管支断端破裂圧は、有意差こそ出なかったものの IR-群に比べ、低い傾向を認めた。しかし IR+群の h-LEH(10)投与群と IR-群の NS 投与群の気管支断端破裂圧は類似した値であり、h-LEH の投与により、放射線照射という創傷治

癒遅延因子を減少させることができる可能性が示唆された。今回の研究方法が、Inoue ら compromised animal を用いた他の研究と異なったとしても、創傷治癒の過程は術後早期のほうがより抑制されていることに変わりはない。臨床では、早期の BPF 発症は手技的な問題が多く、後期になるほど機械的耐久力の低下や血流などが原因となり起こる[14]ため、これらの動物実験とは異なる。そのため術後早期である今回の結果とは差異が出てしまう可能性が考えられる。しかし早期より血流、酸素供給を改善し、気管支断端の創傷治癒促進が行われていれば、遅発性の BPF も起こりにくくなるものと考えられ、臨床応用でも効果が得られる可能性は十分あると思われた。

気管支における病理組織学的検討では、単球は放射線照射や手術の有無、投与薬剤に関わらずスコア合計値が認められており、これは元々単球が血管内や組織内に存在しているためと考えられた。気管支断端への血球浸潤において、有意に差異が出たのはマクロファージであった。放射線照射の有無に関わらず、h-LEH(10)投与群で、NS、RBC 投与群に比較し、手術側においてマクロファージ浸潤スコア合計値が高値となった。これは胃における切開・吻合実験でも同様の結果となっている[16]。マクロファージは元々創傷治癒に関わる血球とされ、主な機能の 1 つに創傷部を debris する貪食能と線維芽細胞を刺激するサイトカイ

ンの合成促進があり、創傷治癒に重要な役割を果たしている[29-31]。NS 投与時の気管支断端や、胃においては空リポソーム投与群にはマクロファージが増えていないことから、マクロファージが異種タンパクであるヒトヘモグロビンに反応して出現した可能性も指摘されている[16]。h-LEH(2)投与群でもマクロファージ浸潤スコア合計値が高い傾向ではあったが、いっそう多くの量(10ml/kg)の h-LEH を投与されたものに比べて、若干スコア合計値は低い傾向であった。この反応は投与されたヒトヘモグロビン量に由来する結果かもしれない。しかしマクロファージが術側のみに多く出現しているということから、創傷治癒に関係しないところには LEH は影響を与えないと考えられた。創周囲へのマクロファージ浸潤により、創傷治癒促進のサイトカイン産生が拡大されたことが創傷治癒改善の理由の1つかかもしれない。そのため Shirafuji らの実験のように、抗マクロファージ抗体を用い実験を行なったら、LEH による効果は減少したかもしれない[31]。また LEH 投与が、胃における実験[16]や腫瘍を用いた実験[21]において、酸素供給不足状態に陥った際に誘導される低酸素誘導因子(Hypoxia Inducible Factor 1- α ; HIF-1 α)の蓄積を減少させる原因であり、LEH による酸素供給と有酸素代謝の持続が、最初の炎症カスケードの中心である HIF-1 α のシグナル伝達を抑制している可能性も指摘されている[21、32]。最近のマウスで

の実験では、LEH 投与は 3rd-party に対する最初の免疫反応には影響を与えないことがわかっている[33]。しかし他の実験でマウスの皮膚創におけるサイトカインを見ており、LEH 投与により有意に炎症サイトカイン (Interferon- γ 、Interleukin-6、Interleukin-1 β 、Granulocyte-colony stimulating factor) が抑制されていることがわかっている。これらの抗炎症効果は、胃や皮膚では LEH 投与により好中球が抑制されていることに合致する。しかし今回の実験では、放射線照射や投与薬剤に関係なく、術側で好中球が多く認められており、これは好中球が手術ダメージに反応し、増加したものと考えられた。これらの違いは、気管支は胃や皮膚と比べ周囲組織に乏しく、血流も豊富でないことなどが関係するのかもしれない。しかし RBC 投与群で術側に好中球が少なかったことには、今までの実験では説明できない機序があるかもしれない。このように LEH は HIF-1 α のシグナル伝達や、炎症反応を抑制しながらも必要な免疫反応は残し、虚血、低酸素、手術ダメージからの創傷治癒を促進することが考えられた。後期の線維期は肉芽形成が進み、LEH 投与や放射線照射の影響は少なくなってくると先の研究からも分かっている。LEH の創傷治癒への影響は、酸素代謝を含む、多くの因子の 1 つとなり得る。しかし LEH の、抗炎症作用を持ちながらも初期の免疫反応を維持するという作用機序に関しての詳細は未だ不明であり、ま

た創傷治癒には他にも様々な因子が関係しているため、全ての違いを明確にするには更なる実験が必要と思われる。

h-LEH を薬剤として評価するために、用量・効果関係を検討した結果、1/5 量に投与量を減量した 2ml/kg では、気管支断端破裂圧は NS 投与群に比較して高い結果とはなかったが、有意差は出なかった。これは今までの胃などの実験結果[16]で得られている必要最少量の結果とは異なっており、これも先述している様に気管支断端の血流や周囲組織が今までの実験組織より乏しいことが関係しているのかもしれない。創部に影響を及ぼす血流などがより少ないため、より多くの h-LEH の投与がないと効果が現れにくいことが考えられた。これらの違いは、臓器特異性と表現される相違点と言えるかもしれない。また用量が少ない h-LEH 投与では、RBC 投与以上の結果が得られなかったことから、気管支断端のような血流が少ない組織において RBC 以上の h-LEH の効果を期待するには、十分量の投与量が必要であることが示唆された。

－ 結論 －

以上より、h-LEH(10ml/kg)投与により、LEH は肺切除術早期の創傷治癒促進に効果があることが示唆された。また LEH 投与が、創傷治癒期の術前放射線照射による創傷治癒遅延の影響を相殺する可能性も示された。

これは、LEH が気管支断端の様に元々血流に乏しい組織においても酸素代謝を改善し、好氣的エネルギー代謝を通じ、炎症を抑制することにより創傷治癒を促進するという仮説に合致する。しかし h-LEH の働きは未だ不明な点が多く、全て明らかになっているわけではない。抗炎症作用など期待されうるべき効果に付いても、今後の研究の発展が望まれる。