



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | コラーゲンの偏光特性からみた食道吻合部の創傷治癒に関する実験的研究   |
| Author(s)    | 中島, 清一  |
| Citation     | 大阪大学, 1999, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.11501/3155278">https://doi.org/10.11501/3155278</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 主論文

コラーゲンの偏光特性からみた食道吻合部の  
創傷治癒に関する実験的研究  
Polarization Characteristics of Collagen at Healing Esophageal  
Anastomosis: An Experimental Study

大阪大学医学部小児外科学教室

Department of Pediatric Surgery, Osaka University Medical School

中島 清一

Kiyokazu Nakajima

(指導：岡田 正教授)

(平成 11 年 2 月 24 日受付)

The polarization characteristics of collagen fibers were evaluated in the healing esophageal anastomotic submucosa of rats at various postoperative time points. The effect of systemic application of epidermal growth factor (EGF) on the anastomotic healing was also evaluated.

The breaking strength of the anastomosed esophagus was significantly decreased on the 4th postanastomotic day, while hydroxyproline concentration or content showed no significant decrease concomitantly. The percentage of collagen fibers with longer polarization wavelengths was significantly decreased at the perianastomotic site on the 4th postanastomotic day. In EGF-treated rats, both breaking strength and the percentage of collagen fibers with longer polarization wavelengths were significantly increased compared with those of EGF-untreated rats, whereas hydroxyproline concentration or content showed no significant changes between two groups. These findings suggest that the changes of polarization characteristics of the submucosal collagen fibers are essential in maintaining the integrity of the healing esophageal anastomosis. The qualitative changes of collagen fibers may be partly responsible for the beneficial effect of EGF on the esophageal anastomotic healing.

Key words: wound healing, collagen, polarization, anastomosis, epidermal growth factor, esophagus

## 緒言

消化管吻合術は今日、日常臨床において広く行われているが、縫合不全は手術手技の進歩、周期管理の向上にもかかわらず未だ少なからず発生しており、時に重篤な経過を示す症例も見られ、創傷治癒過程からみた更なる工夫、検討が必要とされている<sup>1)4)</sup>。

さて、一般に消化管吻合部の縫合不全の多くは術後3~5日以内に発生するとされている<sup>2)11)</sup>。この時期における吻合部の物理的強度低下には、当初吻合部近傍のコラーゲン濃度、量の低下が関与しているとされていた<sup>6)11)</sup>が、その後コラーゲン定量結果は必ずしも吻合部の物理的強度を反映しないと報告が多く見られるようになった<sup>12)16)</sup>。近年では、治癒過程においてコラーゲンがむしろ何らかの構造的変化を来している可能性が示唆されている<sup>1)15)21)</sup>。

コラーゲンはコラーゲン分子が規則正しく配列したコラーゲン原線維の重合体であり<sup>22)23)</sup>、光学的異方体として偏光特性(複屈折性)を有している<sup>22)24)</sup>。シリウスレッド染色-偏光顕微鏡解析法(以下偏光解析法と略す)は、コラーゲンの偏光特性に着目した創傷治癒の解析法であり<sup>20)21)25)26)</sup>、近年皮膚<sup>27)28)</sup>、心筋<sup>29)30)</sup>や結腸<sup>20)21)</sup>等の創傷治癒過程におけるコラーゲンの構造的変化を解析する手法の一つとして注目されている。しかしながら偏光解析法を用いて食道吻合部の治癒過程を検討した報告はなく、またコラーゲンの偏光特性が消化管吻合部の物理的強度をどの程度反映するのか、その詳細は不明である。

本研究では、偏光解析法に着目し、1)ラット食道吻合部の創傷治癒過程において、吻合部の物理的強度とコラーゲン偏光特性との関係をコラーゲン定量法と併せて解析し、食道吻合部治癒過程の構造的・質的評価法としての偏光解析法の有用性を実験的に検討した。さらに、2)従来より消化管吻合部における創傷治癒の促進効果が注目されている表皮増殖因子(Epidermal Growth Factor、以下EGFと略す)について、その食道吻合部強度にもたらす効果およびコラーゲン偏光特性の変化が如何に関与しているかを偏光解析法を用いて実験的に検討した。

検討1): 食道吻合部治癒過程の質的評価法としての偏光解析法の有用性

### 対象と方法

6週齢、体重200g前後の雄性Sprague-Dawley

ラット35頭を使用した。動物実験に際しては大坂大学医学部附属動物実験施設の定めるガイドラインに準拠した。術前日より12時間の絶食の後、ペントバルビタール(ネンプタール<sup>®</sup>、大日本製薬)30mg/kgによる全身麻酔下に頸部皮膚を縦切開し、頸部食道を剥離授動した。甲状腺下極の高さで食道を一旦切断し、8-0合成非吸収糸(サージリン<sup>®</sup>、Davis&Geck)を8針用いて拡大鏡下に一層外翻吻合にて吻合した。ラットは復温、覚醒を確認後飲水のみを*ad libitum*とし、術後1日目より3日目までは60%の経腸栄養剤(エンシュアリキッド<sup>®</sup>、ダイナポット)を80ml/日投与し、以後は普通食餌を*ad libitum*で投与した。術後4、7、10、21日目に屠殺し、術創を再開創して吻合部を含めた長さ8mmの頸部食道を摘出した。

### 1)抗張力測定

摘出標本は生理的食塩水に保存し、2時間後に抗張力測定を行った。標本の口側、肛門側をそれぞれクリップで把持し、縫合糸は除去せず、電動式専用計測スタンド(SH2013M-M、日本光電)を用いて毎分2mmの速度で吻合部長軸方向に連続的な負荷を与えた。張力はデジタルフォースゲージ(DPSS-2TR、日本光電)にて常時記録し、最大値(g)を抗張力とし、また標本が断裂した部位を記録した。

### 2)ハイドロキシプロリン定量

抗張力測定後の標本を全量回収し、生理的食塩水にて洗浄し縫合糸を除去した。約1mm厚に細切し、濾紙上でblottingして湿重量を測定した後全量をエッペンドルフ管に回収し、-80℃で一旦保存した。標本を解凍後、加水分解用試験管に6N塩酸50 $\mu$ lとともに投入し、減圧封管の後恒温器(Pico-Tag<sup>®</sup> Workstation、Waters)内で110℃、24時間加水分解を行った。加水分解終了後に試験管を開管して減圧乾燥し塩酸を除去し、検体に純水200 $\mu$ lを加えて5000回転 $\times$ 5分間遠心分離を行った。上澄を0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過し、2 $\mu$ lの試料内に含まれるヒドロキシプロリン(Hydroxyproline、以下Hyproと略す)量をアミノ酸自動分析計(L-8500、日立)により測定した。なお、陽イオン交換樹脂にはスルホン酸型のもを使用し、展開はリチウム型緩衝液にて行った。Hypro濃度は検体中のHypro総量/検体の湿重量(nmol/mg)として、Hypro量は検体中のHypro総量/検体の長さ(nmol/mm)として算出した。

### 3)偏光解析

切り出した食道を長軸方向に切開し、10%緩衝

ホルマリン液にて 24 時間固定した。脱水後パラフィン包埋し 5  $\mu$ m の切片を作成し、脱パラフィン処理の後、Junqueira ら<sup>26)</sup>のピクロシリウスレッド染色変法に則って染色を行った。40 倍の対物レンズを装着した偏光顕微鏡 (BH-2、オリンパス光学) 下に明視野で吻合部を観察し、縫合糸近傍の粘膜下層領域を決定した。その後偏光フィルターを Crossed nicols 状態とし、暗視野上に偏光を発生して観察される粘膜下層領域を 3CCD カメラ (DXC-950、ソニー) で撮像した。高解像度モニタ (XP21、日本電気) 上に表示された画像を観察しつつ、画像解析ソフトウェア (MCID-M2、Imaging Research) を用いて全偏光領域とそのうち緑色系の偏光を発生する領域のピクセル数をそれぞれ算定した。暖色系偏光領域は総偏光域から緑色系偏光域を減じたものとし、下記の如く全偏光域中に占める暖色偏光域の割合を偏光比率 (%) として算出した。

$$\text{偏光比率 (\%)} = \frac{\text{総偏光ピクセル数} - \text{緑色偏光ピクセル数}}{\text{総偏光ピクセル数}}$$

#### 4) 組織学的観察

作成した 5  $\mu$ m 厚の標本をヘマトキシリン-エオジン染色し観察した。各標本毎に浮腫の程度、炎症性細胞浸潤の程度、線維芽細胞の出現程度、食道各層の連続性の有無を検討した。

以上の実験において、対照にはラット頸部食道 (n=9) を使用したが、Hypro 量の対照には吻合直後に摘出した食道 (n=5) を使用した。

全体の統計は一元分散分析法 (ANOVA) を使用し、危険率  $p < 0.05$  をもって有意差ありと判断した。

### 結 果

#### 1) 抗張力測定

術後 4 日目に屠殺した群では全検体 (n=4) が吻合部で断裂し、抗張力は対照値に比して有意に低下した (術後 4 日目;  $118 \pm 18$  g、対照値;  $248 \pm 19$  g)。術後 7 日目では 4 検体中 3 検体が吻合部以外で断裂し、抗張力は  $254 \pm 22$  g で対照値と有意差を認めなくなった。術後 10 日目以降はすべての検体が吻合部以外で断裂し、術後 21 日目の抗張力は  $290 \pm 15$  g と対照値に比して有意に高

値となった (Fig.1)。

#### 2) ヒドロキシプロリン定量

Hypro 濃度は術後 4 日目で  $21.8 \pm 4.6$  nmol/mg、術後 7 日目で  $26.9 \pm 1.4$  nmol/mg といずれも対照値  $23.6 \pm 4.8$  nmol/mg との間に有意差を認めず、術後 10 日目以降対照値に比して有意に高値となった (術後 10 日目;  $30.3 \pm 1.2$  nmol/mg、術後 21 日目;  $36.9 \pm 8.6$  nmol/mg) (Fig.2)。一方、Hypro 量は術後一貫して増加し、各測定時期において対照値  $100.6 \pm 30.4$  nmol/mm との間で有意差を認めた (術後 4 日目;  $165.2 \pm 14.2$  nmol/mm、術後 7 日目;  $217.2 \pm 4.0$  nmol/mm、術後 10 日目;  $247.0 \pm 43.5$  nmol/mm、術後 21 日目;  $276.1 \pm 57.4$  nmol/mm) (Fig.3)。

#### 3) 偏光解析

対照群における食道の粘膜下層には暖色系偏光を発生するコラーゲン線維が緑色系偏光を発生するコラーゲン線維よりも優位に分布し、画像解析により算出した偏光比率は  $66 \pm 9\%$  であった。術後 4 日目の食道吻合部近傍粘膜下層には暖色系偏光を発生するコラーゲン線維よりも緑色系偏光を発生するコラーゲン線維の方が多く分布し、偏光比率は  $36 \pm 7\%$  と対照に比して有意に低下した。術後 7 日目には暖色系偏光域が増加したが、偏光比率は  $48 \pm 9\%$  で依然対照との間に有意差を認めた。コラーゲン線維の偏光パターンは以後徐々に正常の texture を回復し、偏光比率は術後 10 日目で  $59 \pm 5\%$ 、術後 21 日目で  $65 \pm 22\%$  と漸増して対照と有意差を認めなくなった (Fig.4)。

#### 4) 組織学的観察

術後 4 日目では外翻した食道上皮、粘膜下層、固有筋層の連続性は未だ認められず吻合部直下で断裂していたが、創縁は癒合しており間に肉芽組織による架橋が認められた。吻合部を中心に浮腫が残存していたが、多核白血球を中心とする炎症細胞浸潤は中等度で、貪食細胞、線維芽細胞が創縁に認められた。術後 7 日目では食道上皮の再構築は完成し、吻合部の浮腫は消退したが炎症細胞浸潤が軽度残存していた。創縁～肉芽組織中の線維芽細胞は術後 4 日目に比してやや疎であった。術後 10 日目では食道各層の連続性はほぼ回復し、吻合部近傍での炎症細胞浸潤は完全に消退していた。術後 21 日目では食道固有筋層の連続性はほぼ達成されていた (Table 1)。

#### 小 括 1)

食道吻合部の抗張力は術後 4 日目に有意に低下したが、この時期には Hypro 濃度、量は低下を

認めなかった。一方、偏光解析による偏光比率は抗張力の低下する時期に一致して有意に低下した。

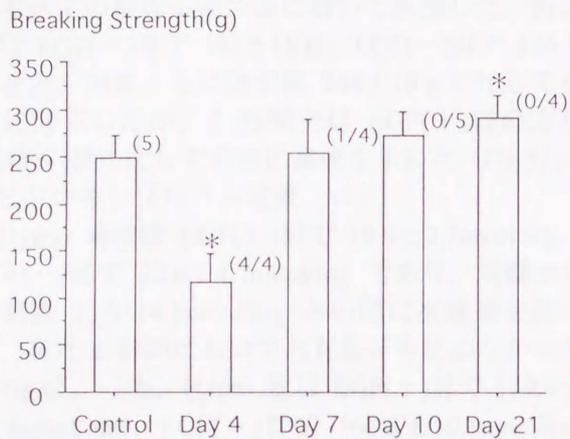


Fig. 1. Breaking strength of esophageal anastomoses with sutures. Datas are given as mean  $\pm$  SD. Figures in brackets indicate number of samples broke at anastomotic site / total number of samples observed. \*:  $p < 0.05$  vs Control.

Hydroxyproline Concentration (nmol/mg tissue)

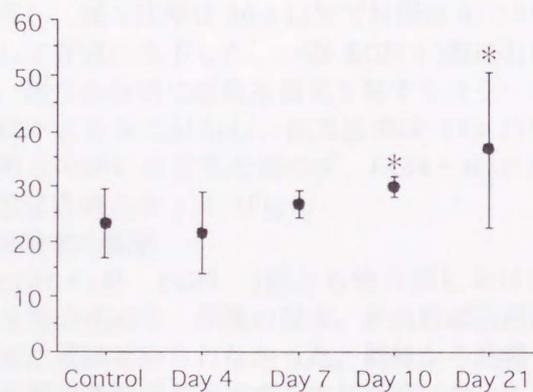


Fig. 2. Changes in tissue hydroxyproline concentration. Datas are given as mean  $\pm$  SD. \*:  $p < 0.05$  vs Control.

Hydroxyproline Content (nmol/mm tissue)

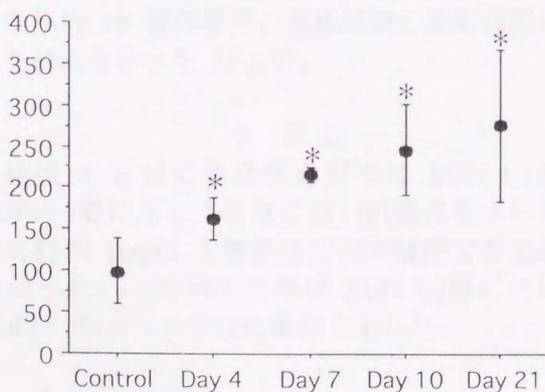


Fig. 3. Changes in tissue hydroxyproline content. Datas are given as mean  $\pm$  SD. \*:  $p < 0.05$  vs Control.

% Collagen Fibers with Polarization Colors of Longer Wavelengths

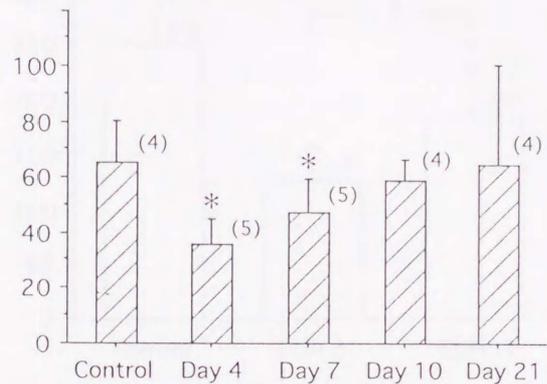


Fig. 4. Percentages of collagen fibers with polarization colors of longer wavelengths observed at esophageal anastomotic submucosa. Datas are given as mean  $\pm$  SD. Figures in brackets indicate number of samples observed. \*:  $p < 0.05$  vs Control.

| Healing Parameters      | Days after Surgery |    |    |    |
|-------------------------|--------------------|----|----|----|
|                         | 4                  | 7  | 10 | 21 |
| Local Edema             | ++                 | -  | -  | -  |
| PMN Leucocytes          | ++                 | +  | -  | -  |
| Macrophages             | +                  | +  | -  | -  |
| Fibroblasts             | +++                | +  | +  | +  |
| Granulation Formation   | +                  | ++ | ++ | ++ |
| Re-epithelialization    | -                  | +  | +  | +  |
| Muscle Layer Continuity | -                  | -  | -  | +  |

Table 1. Histologic findings of the healing esophageal anastomoses. Each section was evaluated and scored by the individual pathologist in the blinded manner. Scales are - (negative), + (weak), ++ (moderate) and +++ (strong). PMN: Polymorphonuclear

検討 2): EGF がコラーゲン偏光特性に及ぼす影響

#### 対象と方法

検討 1)と同様のラット食道吻合モデルに対して、術直後より、ヒト組み換え型 EGF (Genzyme) 20  $\mu$ g/kg/日を連日腹腔内投与した EGF(+)群 (n=12)、および等量の生理的食塩水のみを同期間腹腔内投与した EGF(-)群 (n=14) の 2 群において、術後 4 日目に屠殺し抗張力測定、Hypro 定量、偏光解析、組織学的観察を行った。対照には正常食道 (n=10) および吻合直後に切り出した食道 (n=5) を使用し、統計は検討 1)と同様に行った。

## 結果

### 1)抗張力測定

すべての検体が吻合部において断裂した。抗張力は EGF(+)群で  $181 \pm 18$  g、EGF(-)群で  $124 \pm 13$  g と、両群とも対照値  $248 \pm 19$  g に比して有意に低下したが、2 群間では EGF(+)群の方が EGF(-)群に比して有意に高値を示した (Fig.5)。

### 2)ヒドロキシプロリン定量

Hypro 濃度は EGF(+)群で  $19.0 \pm 7.3$  nmol/mg、EGF(-)群で  $22.6 \pm 4.7$  nmol/mg であり、両群とも対照値  $23.6 \pm 4.8$  nmol/mg との間に有意差を認めず、また 2 群間においても有意差を認めなかった (Fig.6)。一方、Hypro 量は EGF(+)群で  $149.4 \pm 43.4$  nmol/mm、EGF(-)群で  $163.8 \pm 10.1$  nmol/mm と、両群とも対照値  $100.6 \pm 30.4$  nmol/mm よりも有意に増加したが、2 群間での有意差は認められなかった (Fig.7)。

### 3)偏光解析

EGF(-)群では、縫合系近傍の粘膜下層において緑色系の偏光を発するコラーゲン線維が優位に分布し、偏光比率は  $36 \pm 12\%$  で対照値  $65 \pm 6\%$  に比して有意に低下した。一方 EGF(+)群においては、縫合系近傍に暖色系偏光を発するコラーゲン線維がより多く分布し、偏光比率は  $53 \pm 13\%$  と対照との間に有意差を認めず、EGF(-)群に比べ有意に高値となった (Fig.8)。

### 4)組織学的観察

EGF(+)群、EGF(-)群とも吻合部における食道各層の連続性、浮腫の程度、炎症性細胞浸潤の程度に差は認められなかった。創縁から粘膜下層～筋層の断裂部を架橋する肉芽組織においては、EGF(+)群では EGF(-)群に比してより多くの線維芽細胞を認めた。EGF(+)群で認めた線維芽細胞は細長い核を持つ、より分化度の高い形態を有していたが、mitosis は 1 視野平均 2~3 個程度で差を認めなかった。重層扁平上皮の細胞数は両群とも平均 10 層前後で、基底細胞の増殖程度にも差を認めなかった (Fig.9)。

### 小括2)

術後 4 日目の食道吻合部では EGF(+)群は EGF(-)群に比して有意に高い抗張力を示したが、この時期 Hypro 定量結果には両群間で差を認めなかった。一方偏光比率は EGF(+)群において EGF(-)群よりも有意に高値を示した。

Breaking Strength(g)

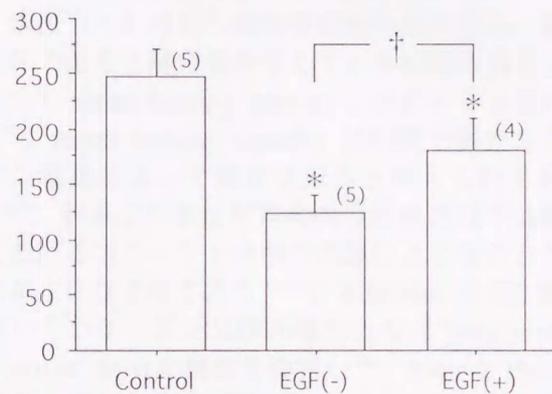


Fig. 5. Breaking strength of esophageal anastomoses at Day 4 with/without EGF challenge. Datas are given as mean  $\pm$  SD. Figures in brackets indicate number of samples observed. \*:  $p < 0.05$  vs Control. †:  $p < 0.05$  between two groups.

Hydroxyproline Concentration (nmol/mg tissue)

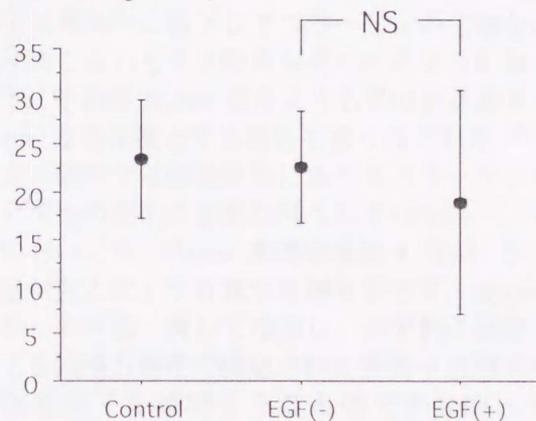


Fig. 6. Tissue hydroxyproline concentration of esophageal anastomoses at Day 4 with/without EGF challenge. Datas are given as mean  $\pm$  SD. NS: Not significant.

Hydroxyproline Content (nmol/mm tissue)

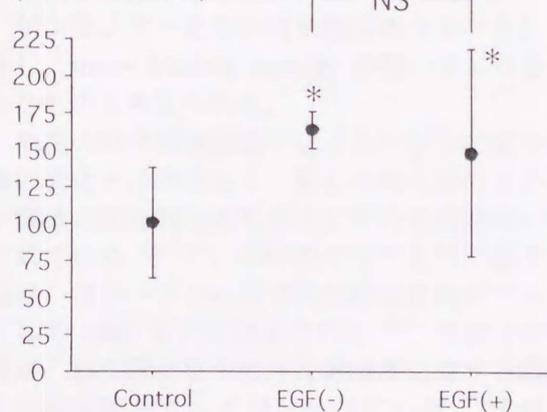


Fig. 7. Tissue hydroxyproline content of esophageal anastomoses at Day 4 with/without EGF challenge. Datas are given as mean  $\pm$  SD. \*:  $p < 0.05$  vs Control. NS: Not significant.

% Collagen Fibers with Polarization  
Colors of Longer Wavelengths

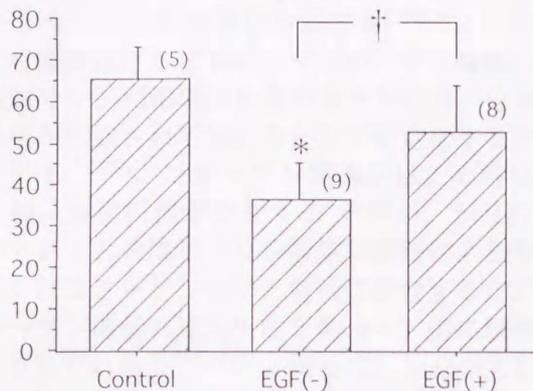


Fig. 8. Percentages of collagen fibers with polarization colors of longer wavelengths observed at esophageal anastomotic submucosa treated with/without EGF.

Datas are given as mean  $\pm$  SD. Figures in brackets indicate number of samples observed.

\*:  $p < 0.05$  vs Control. †:  $p < 0.05$  between two groups.

#### 考 察

食道は構造的に胃、小腸や結腸等の腹腔内消化管とは異なる特徴を有している<sup>1)</sup>。最外側には漿膜を欠き、臓器血流は腹腔内消化管に比して乏しい<sup>1),31),32)</sup>。食道に置かれた吻合部は隣接する器官や頸部の動きによる外力の影響を受けやすく<sup>31)</sup>、また小児外科領域において問題となる食道閉鎖症においても吻合は一般に緊張下に行われることが多い、高率に縫合不全が発生することが知られている<sup>5),31)-36)</sup>。以上より、食道に置かれた吻合部は元来創傷治癒にとって好ましい環境にあるとは言えず<sup>1)</sup>、さらに吻合部を被覆する大網を欠くために、縫合不全の発生が広汎な膿瘍の広がりを惹起し致命的となる場合がある<sup>1),31),32)</sup>。

食道吻合部の縫合不全を未然に防ぐ試みは従来より種々報告されてきた<sup>5),31),32),34),37)-41)</sup>が、大部分の報告は吻合部に発生する緊張を減ずるための手術手技上の工夫であり<sup>37)-39)</sup>、吻合部そのものの治癒を促進する試みは未だ十分な成果を挙げているとは言えない<sup>40),41)</sup>。一方、食道吻合部の創傷治癒過程に対する基礎的な研究は他の消化管におけるものに比して報告も少なく、断片的である<sup>31),32),40)</sup>。消化管の潜在的な創傷治癒能は部位によって異なる可能性があり<sup>1)</sup>、殊に食道は前述の如き特徴を有し、上皮は皮膚と同じく扁平上皮である<sup>42)</sup>。本研究では、縫合不全対策を論じる上では改めて食道吻合部の創傷治癒過程を基礎的に検討する必要があると考え、吻合部におけるコラーゲン線維

の偏光特性の変化に着目して検討を行った。

術後 3~4 日目の消化管の吻合部強度は、縫合自体の強さと縫合糸を支えている組織の強さ、すなわち suture holding capacity に依存するとされる<sup>6)-11)</sup>。suture holding capacity は粘膜下層のコラーゲン線維によって規定されると考えられており<sup>1),3),4)</sup>、従来より術後早期の吻合部強度低下は創縁におけるコラーゲン分解の亢進によるものとの解釈が主になされてきた<sup>6)-11)</sup>。Adamson らは創縁においてコラーゲン分解が優位となる "biochemically active" zone の概念を提唱し<sup>43)</sup>、Irvin と Hunt は術後 3 日目の吻合部近傍においてコラーゲン量が 25% 減少すると報告した<sup>12)</sup>。以上の報告においてコラーゲン量はすべて Hypro 濃度として表現されてきた<sup>6)-11),43)</sup>。しかしながら、創傷治癒炎症期においては創部に血漿タンパク等のいわゆる non-collagenous tissue influx が生じており<sup>1)</sup>、Hypro 濃度は相対的に低下してコラーゲンの正確な総量を反映しないとする報告が見られるようになった<sup>12)-16)</sup>。その後 Hypro 濃度よりも単位長さあたりの Hypro 量を指標とする報告も多くなされた<sup>15)</sup>が、最近の研究では術後早期におけるコラーゲンの量や可溶性の変化の証拠は得られていない<sup>1)</sup>。本研究においても、Hypro 濃度は術後 4 日目、7 日目では対照と比して有意な変動を示さず、Hypro 量はむしろ術後一貫して増加し、いずれの指標によっても抗張力測定で確認された術後 4 日目の吻合部強度低下を説明することはできなかった。Hypro の定量結果からは、早期の吻合部においてはコラーゲン分解とコラーゲン合成が平衡状態を形成している<sup>1)</sup>か、あるいは反応性のコラーゲン合成が亢進している<sup>7),8)</sup>と考えられるが、この時期創部に供給されたコラーゲンは未だ成熟したコラーゲン線維の形態を取らず、創縁においてコラーゲンモノマーあるいは未熟なポリマーとして存在し、suture holding capacity の担い手たり得なかったものと考えられる。

早期の吻合部強度低下はコラーゲンの量や可溶性の変化とは関係なく、むしろ何らかのコラーゲン線維の構造的な変化が生じている可能性が指摘されている<sup>1),15)-21)</sup>。本研究で取り上げた偏光解析法は、コラーゲンの光学的な構造を解析する手法として 1960 年代に報告された<sup>44)</sup>。当初は皮膚の母斑、結合織疾患や肥厚性癬痕等に対する病理学的補助診断法として用いられていた<sup>27),28)</sup>が、近年、心筋の梗塞巣<sup>29),30)</sup>や消化管吻合部<sup>20),21)</sup>の創傷治癒過程の新たな評価法として注目されるようになった。

線維芽細胞で作られたプロコラーゲンは、細胞外へ放出される時にN末端とC末端のプロペプチドが切れてコラーゲン分子となり、次第に重合してコラーゲン原線維を形成する<sup>22),23)</sup>。コラーゲン原線維はさらに集束してコラーゲン線維となり、修飾リシン側鎖間の共有結合で分子内、分子間に架橋が形成されて線維束として安定化するとされている<sup>22),23)</sup>。コラーゲン線維にはこの時点で既に弱い複屈折性が存在する<sup>22),44)</sup>が、シリウスレッドF3BAはピクリン酸飽和溶液による酸性条件下にコラーゲン分子と並列に結合するため、コラーゲン線維の複屈折性を約4~7倍に増幅するとされている<sup>20),21),26),44)</sup>。従って、シリウスレッドにより染色した切片標本を偏光フィルターを装着した顕微鏡下に観察すると、コラーゲン線維は緑~赤の偏光を発して観察されるようになる<sup>44)</sup>。当初、これらコラーゲンの偏光色の波長を規定しているものはコラーゲンの分子種であり、I型コラーゲンが黄~橙~赤色の暖色系偏光を、III型コラーゲンが緑色偏光を発していると考えられていた<sup>45)</sup>が、その後分子種ではなく線維径が偏光色を決定する因子であると報告された<sup>46)</sup>。しかしながら1989年Dayanらは様々な分子種よりなる精製コラーゲンを偏光解析法により観察し、コラーゲン線維の偏光波長の長短を決定するものは線維の径のみならず、コラーゲン分子のpackingの程度、配列の優劣であると報告した<sup>47)</sup>。コラーゲン分子がより密に、より規則正しく配列し、結果としてより太い線維を形成すれば複屈折性が増強し、線維の偏光色は黄~橙~赤の暖色系となる<sup>47)</sup>。一方、コラーゲン分子のpackingが粗く、配列が乱れるとコラーゲン分子に並列に結合したシリウスレッド分子による"summation effect"が相殺されるため複屈折性は増強せず、線維の偏光色は緑色となる<sup>47)</sup>。偏光解析法は以上の原理に基づく創傷治癒の評価法であり、治癒過程におけるコラーゲンの構造的変化を質的にとらえることができるとされている<sup>20),21)</sup>。

1995年、Rabauらは結腸吻合部の創傷治癒過程を偏光解析法とHypro定量法により検討し、術後4日目には吻合部近傍に緑色偏光を発するコラーゲン線維が有意に増加したが、Hypro定量法によるコラーゲン濃度、可溶性には変化が認められなかったと報告した<sup>21)</sup>。本研究においても、術後4日目、7日目においては食道吻合部近傍に緑色偏光を発するコラーゲン線維が有意に増加し、この時期に食道粘膜下層のコラーゲン線維が光学的・構造的変化を受けていることが示された。術

後4日目においてはすべての標本が吻合部で断裂しており、この時点の抗張力は組織の suture holding capacity を反映し、それが食道吻合部において術後4日目で有意に低下することが確認された。以上より、食道吻合部の創傷治癒過程早期においては粘膜下層のコラーゲン線維の多くは細く、コラーゲン分子の packing が粗く、また配列が乱れた状態にあり、これらは suture holding capacity が低下した状態を説明し得るものと考えられた。吻合部近傍の粘膜下層コラーゲン線維はその後徐々に複屈折性を増加させていくが、術後21日を経ても対照値を上回ることなく、その回復は緩やかであった。一方吻合部は術後7日の時点で既に正常部位よりも強い物理的強度を獲得しており、抗張力の測定結果は術後7日以降はもはや吻合部の強度を反映せず、実際の吻合部強度は測定結果以上であると推測される。炎症期以降の創傷治癒増殖期においてコラーゲン線維の構造的変化は引き続き進行する<sup>1)</sup>が、偏光解析法で解析可能な偏光特性の変動域を超えた線維の成熟化が生じている可能性がある。あるいはこの時期においては Hypro 量の測定結果に示されたようなコラーゲンの量的変化の方が吻合部の安定化には優位に作用している可能性も考えられる。以上の検討により、術後4日以内の創傷治癒炎症期においては、偏光解析法の方がコラーゲン定量法よりも吻合部の治癒過程の良き指標であり、物理的強度をよりの確に反映すると考えられた。

EGFは従来より創傷治癒を促進するサイトカインの一つとして注目されてきた物質である<sup>48)</sup>。ヒトEGFは分子量約6kDのポリペプチドで、唾液腺、膵外分泌腺や胆汁内をはじめとして全身に認められ<sup>49)</sup>、上皮細胞や線維芽細胞、あるいは皮膚や消化管上皮の基底膜側に存在する受容体に作用して、リガンド依存的にチロシンキナーゼ活性を亢進させてDNA合成を促進する<sup>48),49)</sup>。EGFはchemoattractantとして線維芽細胞を創部へ誘導するのみならず、線維芽細胞のmitogenesisを促し、コラーゲン合成を促進するとされている<sup>50),51)</sup>。EGFの創傷治癒促進作用はBuckleyの報告<sup>52)</sup>以降主として皮膚の創傷モデルに対して研究が進み<sup>53)</sup>、また消化管吻合部ではブタの胃、小腸、結腸吻合部の抗張力増強効果が報告されている<sup>54)</sup>が、食道吻合部の抗張力増強作用はこれまで報告されていない。

本研究においては、EGF(+)群の食道吻合部抗張力はEGF(-)群に比して有意に増加した。しかしながらHypro濃度、量のいずれも両群間での

有意差を認めず、コラーゲン定量法によって EGF の抗張力増強作用を説明することはできなかった。一方、EGF(+)群における偏光比率は EGF(-)群に比して有意に高値であり、EGF(+)群では創縁の粘膜下層に EGF(-)群に比してより密に、規則正しく packing した太いコラーゲン線維が多く存在することが示された。これら光学的に成熟したコラーゲン線維が suture holding capacity の担い手となり、結果として抗張力を増強せしめたと考えられ、EGF の食道吻合部強度増強作用にコラーゲン線維の光学的な構造変化が関与している可能性が示された。

コラーゲンを供給する線維芽細胞は創傷治癒の炎症期が増殖期へと移行する過程で創部に出現する<sup>1),19)</sup>が、近年の研究により創傷ストレスそのものが線維芽細胞の EGF に対する感受性を変化させることが知られている<sup>55)</sup>。Brasken らは結腸吻合部での EGF 受容体の発現を mRNA レベルで検討し、吻合部近傍の線維芽細胞や平滑筋細胞に術後3日目と7日目に EGF 受容体が有意に upregulate すると報告している<sup>55)</sup>。従って、検討 2)において EGF 投与を行った時期には線維芽細胞の EGF に対する感受性が增大しており、EGF により遊走能を刺激された線維芽細胞がより早期により多く創部に動員された可能性が考えられる。供給されたコラーゲン分子が線維へと凝集、配列していく過程には依然不明な点が多い<sup>22),23)</sup>が、従来より親水基間の相互作用によるエンタルピーの増大が主たる決定因子とされてきた<sup>23)</sup>。従って、創縁に誘導された線維芽細胞から新生コラーゲン分子がより早期に多く供給された結果、その後の熱力学的・生理学的プロセスであるコラーゲン分子の凝集、配列がより早い段階で進行し、結果としてより密に、規則正しく凝集した太いコラーゲン線維が多く形成されたと解釈することができる。一方で、EGF 自体にコラーゲン線維の成熟化を調節する作用のある可能性も否定できない<sup>54)</sup>。Christensen らはラット結腸吻合モデルに成長ホルモンを投与し、術後4日目の吻合部近傍のコラーゲン原線維は密度、配列ともに非投与群に比して良好であることを走査型電子顕微鏡で観察している<sup>19)</sup>。彼らは成長ホルモンにはコラーゲン原線維のコラーゲン線維への構築を促進する作用があると推測している<sup>19)</sup>が、EGF 自体に同様の作用が存在するか否かについては今後のさらなる検討が必要と思われる。

## 結 語

- 1)ラットの頸部食道を切断後吻合し、その創傷治癒過程を従来用いられてきた物理学的指標である抗張力、生化学的指標である Hypro 濃度、量により評価し、かつ新たな指標としてコラーゲンの偏光特性に着目して検討した。さらに EGF を用いた場合の変化についても検討した。
- 2)抗張力測定の結果、術後4日目に摘出した検体はすべて吻合部において断裂し、抗張力は対照に比して有意に低下した。しかしながら Hypro 定量の結果によると術後4日目に Hypro 濃度、量のいずれも低下を認めなかった。
- 3)偏光解析の結果、術後4日目には吻合部近傍の粘膜下層において暖色系偏光を示すコラーゲン線維の占める比率が対照に比して有意に減少した。従って、偏光解析法は術後早期において吻合部治癒過程の良好な指標となり得ると考えられた。
- 4)EGF の腹腔内投与により、術後4日目の吻合部強度は非投与群に比して有意に増加した。同時期 Hypro 定量結果は両群間で有意差を示さなかったが、偏光解析法による粘膜下層の暖色系コラーゲン線維が占める比率は EGF 投与群で非投与群に比し有意に高値であった。
- 5)EGF の吻合部強度増強効果にはコラーゲン線維の質的变化が関与している可能性が示された。

稿を終わるにあたり本研究を終始直接指導いただき、御校閲を賜った岡田正教授に慎んで感謝の意を表します。また、本研究遂行にあたり、終始御協力、御助言をいただいた大阪大学医学部小児外科学教室の諸兄に深謝いたします。

尚、本論文の要旨は第99回日本外科学会総会(平成11年3月、福岡)において口演した。

## 文 献

- 1)Graham MF, Blomquist P, Zederfeldt B. The alimentary canal. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ eds. Wound healing: Biochemical & clinical aspects. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992: 433-449.
- 2)Jonsson K, Jiborn H, Zederfeldt B. Breaking strength of small intestinal anastomoses. *Am J Surg* 145: 800-803, 1983.
- 3)Hogstrom H, Haglund U, Zederfeldt B. Suture technique and early breaking strength of intestinal anastomoses and laparotomy wounds. *Acta Chir Scand* 151: 441-443, 1985.

- 4)Hogstrom H, Haglund U. Postoperative decrease in suture holding capacity in laparotomy wounds and anastomoses. *Acta Chir Scand* 151: 533-535, 1985.
- 5)Chittmitrapap S, Spitz L, Kiely EM, Brereton RJ. Anastomotic leakage following surgery for esophageal atresia. *J Pediatr Surg* 27: 29-32, 1992.
- 6)Hawley PR, Faulk WP, Hunt TK, et al. Collagenase activity in the gastrointestinal tract. *Br J Surg* 57: 896-899, 1970.
- 7)Jonsson K, Jiborn H, Zederfeldt B. Comparison of healing in the left colon and ileum. Changes in collagen content and collagen synthesis in the intestinal wall after ileal and colonic anastomoses in the rat. *Acta Chir Scand* 151: 537-541, 1985.
- 8)Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. Effects of suture technique on collagen metabolism in the colonic wall. *Am J Surg* 139:406-413, 1980.
- 9)Hesp FLEM, Hendriks T, Lubbers EJC, DeBoer HHM. Wound healing in the intestinal wall. A comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. *Dis Col Rect* 27: 99-104, 1984.
- 10)Hendriks T, Vereecken THLB, Hesp WLEM, Schillings PHM, DeBoer HHM. Loss of collagen from experimental intestinal anastomoses: early events. *Exp Mol Pathol* 42: 411-418, 1985.
- 11)Jonsson K, Jiborn H, Zederfeldt B. Mechanical and biochemical alterations in the intestinal wall adjacent to an anastomosis. *Am J Surg* 151: 387-390, 1986.
- 12)Irvin TT, Hunt TK. Reappraisal of the healing process of anastomoses of the colon. *Surg Gynecol Obstet* 138: 741-746, 1974.
- 13)Blomquist P, Ahonen J, Jiborn H, et al. The effect of relative bowel rest on healing of colonic anastomoses. Collagen synthesis and content in the colonic wall after left colon resection and anastomosis in the rat. *Acta Chir Scand* 150: 677-681, 1984.
- 14)Hogstrom H, Bondeson L, Haglund U. Neutrophil-induced decrease in wound margin strength after intestinal anastomosis: Influence on collagen and mechanisms of granulocyte action. *Eur Surg Res* 20: 260-266, 1988.
- 15)Hendriks T, Mastboom WJB. Healing of experimental intestinal anastomoses: Parameters for repair. *Dis Col Rect* 33: 891-901, 1990.
- 16)Koruda MJ, Rolandelli RH. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. *J Surg Res* 48: 504-515, 1990.
- 17)Brasken P, Lehto M, Renvall S. Changes in the connective tissue composition of the submucosal layer of colonic anastomosis. *Acta Chir Scand* 155: 413-419, 1989.
- 18)Brasken P, Renvall S, Sandberg M. Fibronectin and collagen gene expression in healing experimental colonic anastomoses. *Br J Surg* 78: 1048-1052, 1991.
- 19)Christensen H, Chemnitz J, Christensen BC, Oxlund H. Collagen structural organization of healing colonic anastomoses and the effect of growth hormone treatment. *Dis Colon Rectum* 38: 1200-1205, 1995.
- 20)Rabau MY, Dayan D. Polarization microscopy of picrosirius red stained sections: A useful method for qualitative evaluation of intestinal wall collagen. *Histol Histopath* 9: 525-528, 1994.
- 21)Rabau MY, Hirshberg A, Hiss Y, Dayan D. Intestinal anastomosis healing in rat: Collagen concentration and histochemical characterization by picrosirius red staining and polarizing microscopy. *Exp Mol Pathol* 62: 160-165, 1995.
- 22)垣内欣二. コラーゲン構造の化学的基礎. 野田春彦, 永井裕, 藤本大三郎編. コラーゲン — 化学、生物学、医学 —. 東京: 南江堂, 1978: 15-46.
- 23)Miller EJ, Gay S. Collagen structure and function. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ eds. *Wound healing: Biochemical & clinical aspects*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992: 130-151.
- 24)Wolman M. Polarized light microscopy as a tool of diagnostic pathology: A review. *J Histochem Cytochem* 23: 21-50, 1975.
- 25)Puchtler H, Sweat FW, Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with Picro-Sirius Red F3BA. *Beitr. Path. Bd.* 150: 174-187, 1973.
- 26)Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11: 447-455, 1979.
- 27)Barr RJ, Young EM, King DF. Non-polarized collagen in dermatofibrosarcoma protuberans: a useful diagnostic aid. *J Cutan Pathol* 13: 339-346, 1986.
- 28)Pickering JG, Boughner DR. Quantitative assessment of the age of fibrotic lesions using polarized light microscopy and digital image analysis. *Am J Pathol* 138: 1225-1231, 1991.
- 29)Pickering JG, Boughner DR. Fibrosis in the transplanted heart and its relation to donor ischemic time: Assessment with polarized light microscopy and digital image analysis. *Circulation* 81: 949-958, 1990.
- 30)Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering

- JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol* 89: 397-410, 1994.
- 31) Man DWK, Tang MYM, Li AKC. End-to-end Oesophageal anastomosis: An experimental study in the rat. *Aust N Z J Surg* 58:975-978, 1988.
- 32) Pearlstein L, Azneer IB, Polk HC. An experimental assessment of esophageal anastomotic integrity. *Surg Gynecol Obstet* 146: 545-550, 1978.
- 33) 岡田正. 教室における食道閉鎖症治療の歩み. *日小外会誌* 32: 843-857, 1996.
- 34) Touloukian RJ. Reassessment of the end-to-side operation for esophageal atresia with distal tracheoesophageal fistula: 22-year experience with 68 cases. *J Pediatr Surg* 27: 562-567, 1992.
- 35) O'Neill JA, Holcomb GW, Neblett WW. Recent experience with esophageal atresia. *Ann Surg* 195: 739-745, 1982.
- 36) Sillen U, Hagberg S, Rubenson A, et al. Management of esophageal atresia. Review of 16 year experience. *J Pediatr Surg* 23: 805-809, 1988.
- 37) Freud E, Greif M, Rozner M, Finaly R, Efrati I, Kidron D, Odes M, Mares AJ. Bridging of esophageal defect with lyophilized sura mater: An experimental study. *J Pediatr Surg* 28: 986-989, 1993.
- 38) Kimura K, Soper RT. Multistaged extrathoracic esophageal elongation for long gap esophageal atresia. *J Pediatr Surg* 29: 566-568, 1994.
- 39) Carachi R, Azmy A, Gorham S, Reid J, French DA. Use of bioprosthesis to relieve tension in oesophageal anastomosis: An experimental study. *Br J Surg* 76: 496-498, 1989.
- 40) Kullendorff CM, Okmian L, Jonsson N. Technical considerations of experimental esophageal anastomosis. *J Pediatr Surg* 16: 979-982, 1981.
- 41) Blair GK, Castner P, Tayloe G, Newman D, Santoso B. Esophageal atresia - A rabbit model to study anastomotic healing and the use of tissue adhesive fibrin sealant. *J Pediatr Surg* 23: 740-743, 1988.
- 42) 藤田尚男, 藤田恒夫. 食道. 標準組織学各論. 東京: 医学書院, 1987: 109-112.
- 43) Adamson RJ, Musco F, Enquist IF. The chemical dimensions of healing incision. *Surg Gynecol Obstet* 123: 515-521, 1966.
- 44) Constantine VS, Mowry RW. The selective staining of human dermal collagen. II. The use of Picrosirius Red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol* 50: 419-423, 1968.
- 45) Junquiera LCV, Cossermelli WS, Brentani RR. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn* 41: 267-274, 1978.
- 46) Junquiera LCV, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picro-sirius-polarization method. *Histochemistry* 74: 153-156, 1982.
- 47) Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* 93: 27-29, 1989.
- 48) Schultz G, Rotatori DS, Clark W. EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. *J Cell Biochem* 45:346-352, 1991.
- 49) Lee DC, Han KM. Expression of growth factors and their receptors in development. In: Sporn ME, Roberts AB eds. *Peptide growth factors and their receptors*. Berlin: Springer-Verlag, 1990: 611-703.
- 50) Laato M, Kahari VM, Niinkoski J, Vuorio E. Epidermal growth factor increases collagen production in granulation tissue by stimulation of fibroblast proliferation and not by activation of procollagen genes. *Biochem J* 247: 385-388, 1987.
- 51) Hata R, Sunada H, Arai K, Sato T, Ninomiya Y, Nagai Y. Regulation of collagen metabolism and cell growth by epidermal growth factor and ascorbate in cultured human skin fibroblasts. *Eur J Biochem* 173: 261-267, 1988.
- 52) Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, Wolt TB, Woodward SC. Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7340-7344, 1985.
- 53) Brown GL, Nanney LB, Griffen J, Cramer AB, Yancey JM, Curtsinger LJ III, Holtzin L, Schultz GS, Jurkiewicz MJ, Lynch JB. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N Engl J Med* 321: 76-79, 1989.
- 54) Kingsnorth AN, Vowles R, Nash JRG. Epidermal growth factor increases tensile strength in intestinal wounds in pigs. *Br J Surg* 77: 409-412, 1990.
- 55) Brasken P, Renvall S, Sandberg M. Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor genes in healing colonic anastomoses in rats. *Eur J Surg* 157: 607-611, 1991.

抄 録

ラット食道吻合部の創傷治癒過程と表皮増殖因子投与の影響をコラーゲンの偏光特性の面から検討した。術後4日目には抗張力は有意に低下したが、ヒドロキシプロリン濃度、量ともに低下を認めなかった。偏光解析によると術後4日目の吻合部近傍では暖色系偏光を呈するコラーゲン線維が有意に減少していた。表皮増殖因子を投与した群では抗張力、暖色系偏光を呈する線維の割合ともに非投与群に比して有意に高くなったが、ヒドロキシプロリン濃度、量には差を認めなかった。吻合部の治癒過程にはコラーゲン線維の偏光特性が大きな役割を果たしており、また EGF の吻合部強度増強機序にはコラーゲン線維の質的な変化が関与している可能性が示唆された。



Fig. 3. Histologic findings of rat esophageal anastomosis repaired with/without EGF challenge. (Hematoxylin-Eosin stain.)

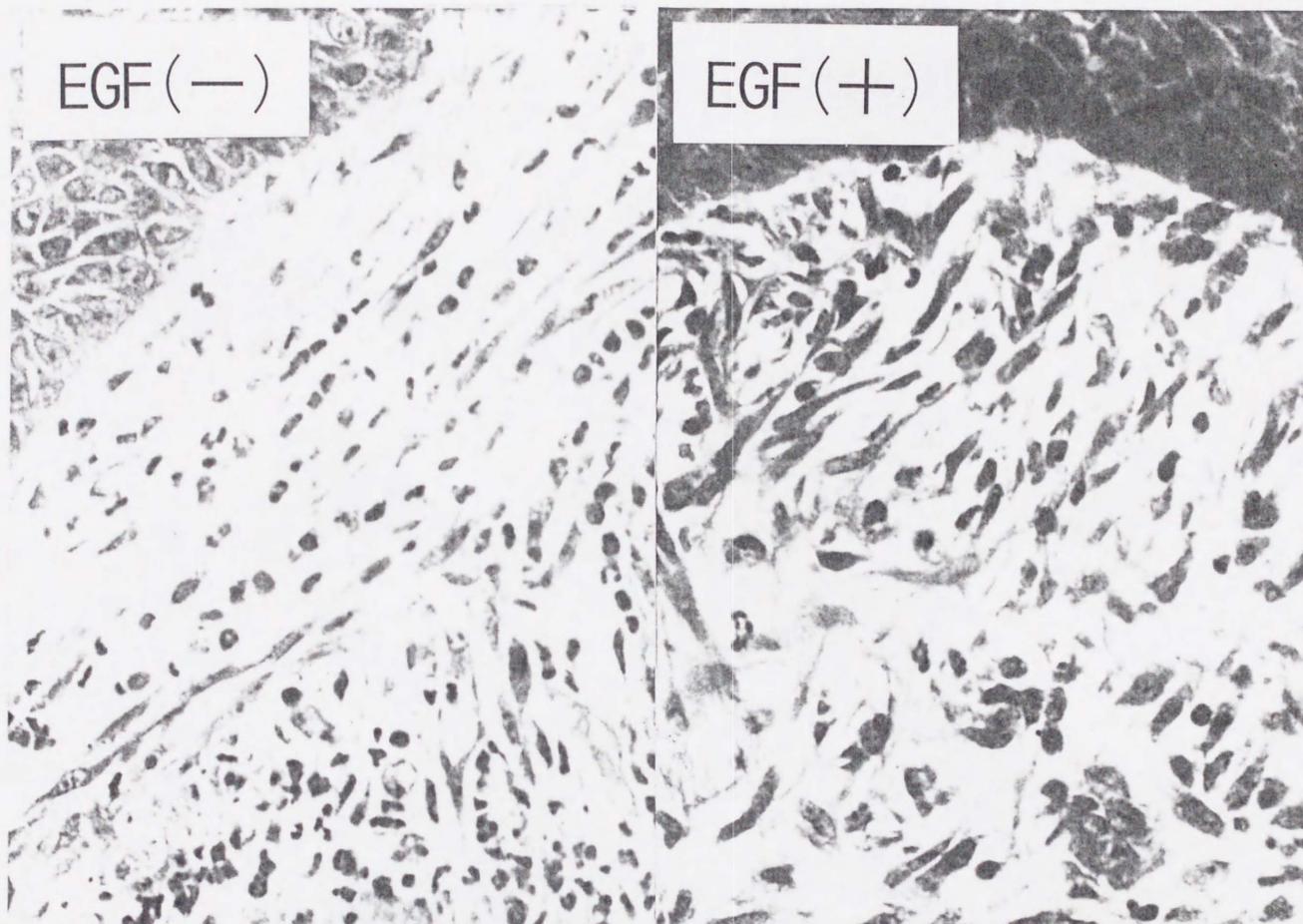


Fig. 9. Histologic findings of the perianastomotic site treated with/without EGF challenge. (Hematoxylin-Eosin staining,  $\times 400$ )

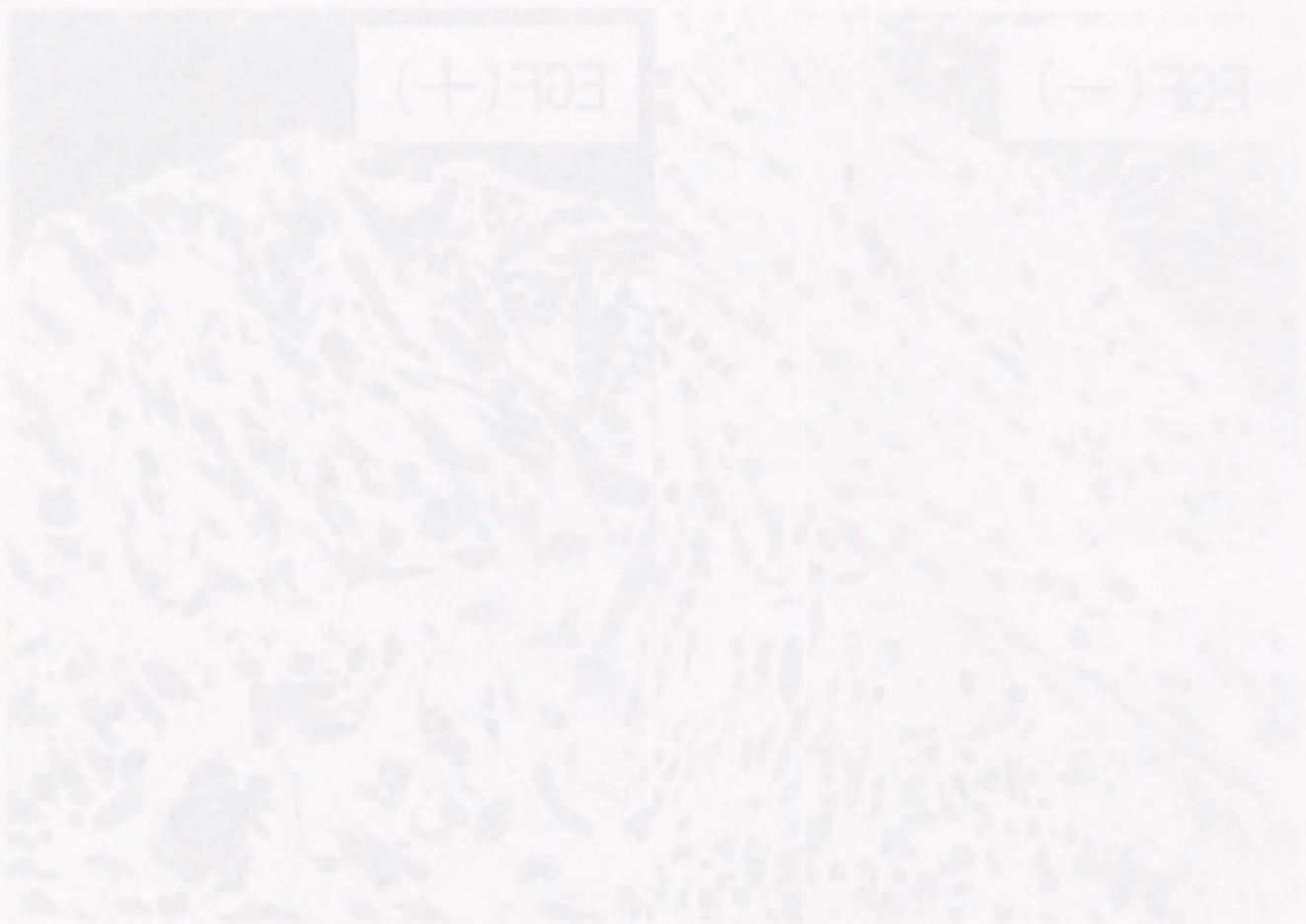


Fig. 2. Histological features of the adenocarcinoma are similar with/without EGF. (Left) EGF (+) and (right) EGF (-). (H&E,  $\times 400$ )

Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

