

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24303  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K19943  
研究課題名(和文) ラットを用いた開胸癒着モデルでの低用量アスピリンによる胸膜癒着抑制の機序の解明

研究課題名(英文) Effect of inhibiting pleural adhesion with aspirin in rats

研究代表者  
石原 駿太 (Ishihara, Shunta)  
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60751279  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アスピリンと胸腔内癒着について関連があるかラットを用いて検討した。全身麻酔、気管内挿管し、左第4肋間に臓側胸膜に10mmの癒着処置を行ったのち、アスピリン内服群(A群)とコントロール群(C群)を割り付け、14日間の経口投与した。再開胸し癒着した距離を比較したところ、癒着の平均距離は、A群で有意に癒着が短い結果となった(8.2mm vs 11.2mm,  $p = 0.024$ )。またday1,3,7,14の免疫組織学的評価をなしたところ、day1-3のPDGFの発現、day3の  $\alpha$ -SMAの発現に減弱が見られた。アスピリンは胸膜癒着抑制効果を持つ事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of aspirin on the pleural adhesion in rats. We used a total of 16 Spague-Dawley male rats aged 10 weeks. We performed procedure of causing adhesion and allocated control group or aspirin group t random. After 14 days, we performed re-thoracotomy and measured the adhesion length. The adhesion length of aspirin group was significantly shorter than that of control group ( $8.7 \pm 2.0$  mm vs  $11.2 \pm 1.1$  mm,  $p = 0.024$ ). And the adhesion section was analyzed by immunohistochemical staining with PDGF, VEGF,  $\alpha$ -SMA, PDGFR- $\alpha$  on day 1, 2, 3, 7 and day 14 after same procedure. The expression of PDGF on day1 and that of  $\alpha$ -SMA on day3 in aspirin group was more weakened than in control group. The expression of PDGFR- $\alpha$  on macrophage was not shown entirely in aspirin group on day3. Aspirin inhibits postoperative pleural adhesion.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：胸膜癒着 癒着抑制 アスピリン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、手術年齢の高齢化により第二癌や転移性腫瘍の再発に対しての再手術を行う機会が増加している。再手術時には、初回手術時の侵襲により手術創周囲の癒着を呈していることが多い。このような手術では、癒着の有無により手術の難易度が大きく異なってくる。呼吸器外科領域でも同様に、癒着を合併すると胸腔鏡下での手術操作が困難となり、合併症のリスクが増加する。当院での癒着を伴った症例の検討においても、手術時間・出血量が増加、合併症のリスクや、ドレーン抜去までの時間も増加していた。また、手術後に胸膜癒着を呈すると、肺機能において拘束性障害を呈するため、術後の呼吸機能の低下を認める。癒着防止の方法として、消化器外科領域ではセプラフィルム<sup>®</sup>やインターシード<sup>®</sup>等の癒着防止剤が開発されているが、呼吸器外科領域では確立されたものが無いのが現状である。私達は臨床においてアスピリン内服患者の再手術症例に癒着が少ない事を確認した。アスピリンはシクロオキシゲナーゼ(COX)を阻害することによりトロンボキサン A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)の産生を抑制し、血小板活性を抑制する。血小板活性は創傷治癒過程において重要な役割を担っており、癒着形成の初期段階でも関連すると推察される。そこで、アスピリンと胸腔内癒着について関連があるか検証し、癒着抑制の機序を解明する事を研究目的とした。

## 2. 研究の目的

アスピリンによる術後癒着抑制効果を、ラット開胸癒着モデルを用いて検証する。また、癒着部位の組織学的評価を行う事で、アスピリンによる癒着抑制効果の機序を解明する事を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 開胸癒着モデルの作成

平成 27 年度は、ラットの開胸癒着モデルの作成を行なった。ラットの系統種や、週齢を検討した結果、10 週齢の雄 SD ラット (Crea Co., Japan) を用いる事とした。麻酔は、イソフルランにて導入麻酔を行ったのち、維持麻酔としてペントバルビタールナトリウム (40mg/kg) を腹腔内投与した。気管内挿管し人工呼吸管理下に手術を行い、左側の側方開胸を行い癒着誘発の処置を行った。癒着誘発の方法としては、過去の報告にもある壁側胸膜を綿棒で擦過する方法や、胸腔内への血液注入など、幾つかを検証した結果、臓側胸膜の焼灼が最も有効であったためこの方法を選択した。

ラットの開胸癒着モデル：上記全身麻酔・人工呼吸器下に、ラットの左第 4 肋間で 20mm の開胸を行い、開胸直下の臓側胸膜の 10mm × 5mm の範囲を電池焼灼器 (Bovie セントメディカル社) で焼灼した (図 1)。癒着処置後、肺の膨張を確認しながら速やかに閉胸した。

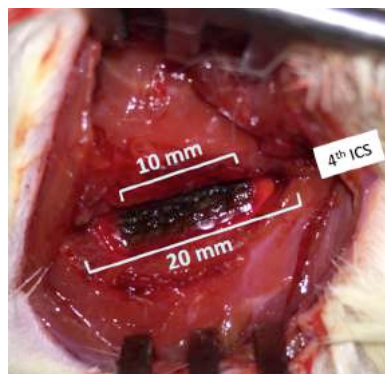


図 1

処置を行った日から 14 日後に再開胸し、第 2 肋間から第 7 肋間の胸壁と左肺を一括して摘出すると、処置を行った部位の肺と胸壁の間に癒着が形成されていた (図 2)。肺と胸壁が癒着でつながっている距離を定量的に評価する事が可能であった。全体でこの癒着モデルによる癒着の形成率は約 90%であった。

摘出した胸壁と肺の検体をホルマリン固定後にパラフィン包埋し、薄切標本にて癒着部分の組織学的な評価が可能であることを確認した。



図 2

### (2) アスピリン内服による癒着抑制効果の検証

平成 28 年度は、作成した開胸癒着モデルを用いて、アスピリン内服による癒着抑制効果を検証した。

① アスピリンによる癒着距離への影響の検証：10 週齢の雄 SD ラット (n=16) に癒着処置を行ったのち、封筒法により無作為にアスピリン内服群 (以下 A 群: n= 8) とコントロール群 (以下 C 群: n=8) を割り付けた。A 群にはアスピリン (sigma-aldrich 社) と無菌蒸留水を懸濁し 2ml (100mg/kg) を、C 群には無

菌蒸留水 2ml を、術翌日から 14 日間、経口投与した。癒着処置の 14 日後にいずれの群かわからないようにした上で再開胸を行い、肺と胸壁の間の癒着の距離をデジタルノギスで計測した。全く癒着の認めなかった個体は検討から除外した。

② アスピリンによる癒着部分への組織学的影響の検証：①と同様にして癒着処置を行いアスピリン内服群 (n=12) とコントロール群 (n=12) に振り分け、術後 1 日目、3 日目、7 日目、14 日目の個体を再開胸して胸壁と左肺を一括にして摘出し、癒着部位の組織切片を作成した (各群 n=3)。HE 染色に加え、Platelet-Derived Growth Factor A (PDGFA), Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA),  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA), PDGFR-alpha (PDGFR- $\alpha$ ), Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) にて免疫組織科学染色を行い、組織学的評価をなした。

#### 4. 研究成果

##### ① 癒着の距離

A 群では 2 例に癒着を認めなかったため除外した。C 群では 1 例で蒸留水投与処置時に死亡し除外した。残りの 13 例では処置を行った部位に一致して、肺と胸壁との間に器質化した癒着を認めた。癒着の平均距離は、A 群 (n=6) で  $8.7 \pm 2.0$ mm、C 群 (n=7) で  $11.2 \pm 1.1$ mm で、2 群を比較すると A 群で有意に癒着が短い結果となった ( $p = 0.024$ ) (図 3)。アスピリン内服により、術後の癒着形成が抑制されている事が示唆された。

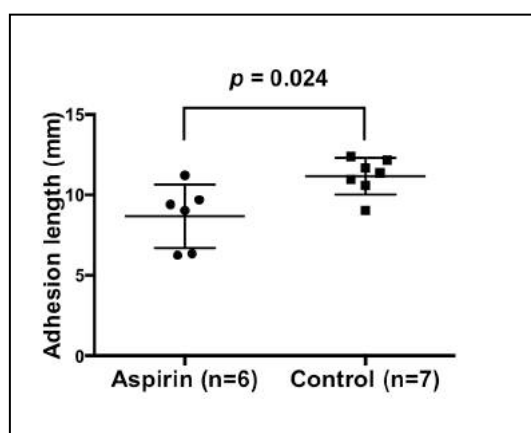


図 3

##### ② 免疫組織学的評価

癒着処置後、術後 1, 3, 7, 14 日目の癒着部位の組織切片を用いて PDFGA, VEGFA,  $\alpha$ -SMA, PDGFR- $\alpha$ , PAI-1 の免疫染色を行なった。PDGFA, VEGFA は癒着部分の間質および炎症細

胞に発現し術後 3 日目にピークとなり、その後漸減していった。 $\alpha$ -SMA は術後 1 日目には発現せず、術後 3 日目より線維芽細胞に発現し 7 日目にピークとなった。PDGFR- $\alpha$  は術後 1-3 日目にマクロファージ等の炎症細胞に発現したが、術後 7 日目以降には一部の炎症細胞にのみ発現が見られた。PAI-1 は間質に発現しており、術後 3-7 日目でピークとなり、術後 14 日目には減弱していた。

免疫組織学的所見を A 群・C 群と比較すると、術後 3 日目の A 群における  $\alpha$ -SMA の発現が C 群に比べ低下していた。同じく術後 3 日目の PDGFR- $\alpha$  染色で、術後 3 日目の C 群に認めていたマクロファージでの発現が A 群では見られなかった。PDGFA の発現は術後 1-3 日目に A 群でやや低下していた。VEGFA, PAI-1 には明らかな差は見られなかった (図 4)。

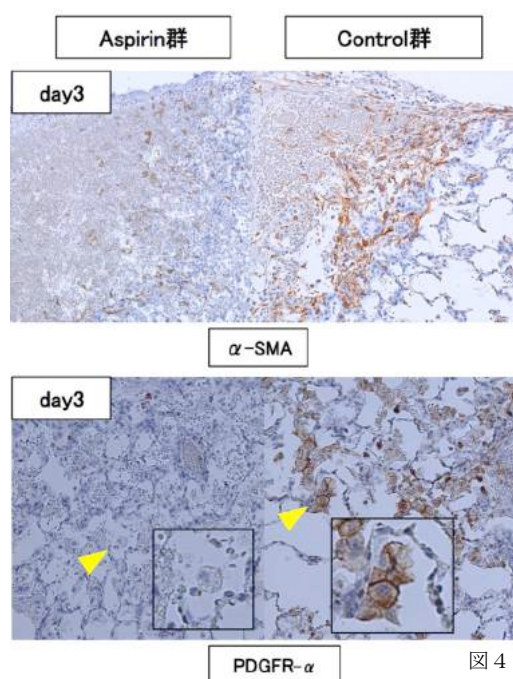


図 4

以上の結果より、アスピリンによる血小板活性の阻害は、血小板の放出するサイトカインを抑制し、炎症反応の段階で線維芽細胞の誘導を減少させる事で、術後の癒着形成を抑制することが示唆された。

#### 考察

ラット開胸癒着モデルにより、形成された癒着の組織学的な変化を経時的に評価する事が出来た。癒着処置後、1 日目～3 日目で胸膜損傷部位に炎症細胞が浸潤し、3 日目から線維芽細胞が誘導され、7 日目に活性を示す  $\alpha$ -SMA の発現がピークとなっており、癒着形成が創傷治癒過程と一致している事が確認できた。

このような癒着形成の初期である創傷治癒過程において、血小板の働きは重要である。これら創傷治癒と血小板の関連は、近年種々

の報告がされており、障害され露出した損傷組織のコラーゲンやトロンピンにより、血小板が活性化されて TGF- $\beta$  や PDGF を放出し、好中球やマクロファージなど種々の炎症細胞が誘導される。また、血小板は bFGF, EGF, VEGF を放出し線維芽細胞を誘導し細胞外基質の合成が始まる。血小板活性は創傷治癒の上位カスケードに位置しており癒着形成においても重要な因子となっていると考えられる。

本研究で検証したアスピリンによる TXA<sub>2</sub> 産生の阻害は、血小板活性を抑制し PDGF などの放出を低下させ線維芽細胞の誘導を減少させたと考えられる。ただし、血小板活性経路は P2Y<sub>12</sub> や PAR4 等を介する経路も存在し、その効果は限定的であったと考えられる。今後、血小板と癒着の関連について検証する必要があると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 石原駿太、他. ラット開胸癒着モデルを用いたアスピリンによる胸膜癒着抑制効果の検討. 第 69 回日本胸部外科学会. 2016 年 9 月 28 日-10 月 1 日. 岡山
- ② Shunta Ishihara, et al. Effect of inhibiting pleural adhesion with aspirin in rats. 31th European Association For CardioThoracic Surgery. 2017 年 10 月 7-10 日 Vienna, Austria.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石原 駿太 (Ishihara, Shunta)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：60751279