

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16426

研究課題名（和文）ラット開胸モデルを用いた血小板活性抑制による癒着防止効果の検証

研究課題名（英文）Verification of anti-pleural adhesion effects with suppression of platelet activity in rats

研究代表者

常塚 啓彰 (Tsunezuka, Hiroaki)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：00453100

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：臨床データを後方視的に解析し抗血小板薬の癒着抑制効果を確認した。続いてラットを使用し癒着程度に加え組織学的評価を行う胸膜癒着モデルを作成した。組織学的評価では癒着に關与する炎症細胞等を同定するために各種抗体を使用した。アスピリン群とコントロール群と比較し有意に癒着距離が短縮し、組織学的にPDGFと $\alpha$ -SMAの減弱等を確認した。更に抗血小板薬として抗炎症作用のないprasugrel群で検証、組織学的に血小板関連サイトカインが減弱し免疫応答細胞が少ない傾向を認めた。また薬剤癒着処置において血清中の血小板固有蛋白が低下していた。本研究で血小板抑制効果は癒着部位での炎症を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癒着は肺切除後には呼吸機能低下を低下させる一因となる。また近年は第2癌や転移性肺腫瘍の増加に伴い再手術を行う機会も増えており、癒着は再手術でのリスク因子とされている。これまで胸部の領域では癒着抑制をする方法に確立されたものはなかった。そこで本研究では癒着カスケードに影響を及ぼす血小板に着目しその機序と効果の検証を行い、臨床データに加え組織学的にも抗血小板薬による癒着抑制効果の可能性が示唆される結果が得られた。今後更なる基礎研究を経て癒着機序の解明を図り、新たな癒着防止方法の開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Clinical data were analyzed to confirm the adhesion suppressive effects of antiplatelet drugs. We created a thoracic adhesion rat model, in which we measured the adhesion lengths and performed histological evaluation. In histological evaluation, various antibodies were used to identify inflammatory cells involved in adhesion. The adhesion distance was significantly shorter in the aspirin group than that in the control group, and the reduction of PDGF and  $\alpha$ -SMA was confirmed histologically. Furthermore, it was verified in the prasugrel hydrochloride group that they have no anti-inflammatory action as an antiplatelet drug, and the tendency that platelet-related cytokine was weakened histologically and the immune response cell was few was recognized. Platelet-specific protein in serum decreased in the drug adhesion treatment. This suggests that the platelet suppression effect may suppress inflammation at the adhesion site and reduce 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 抗血小板作用

### 1. 研究開始当初の背景

近年、異時性多発肺癌や転移性肺腫瘍（とりわけ大腸癌）に対し複数回の手術を行う機会が増加している。再手術では癒着が問題となり、癒着は術中出血や手術時間の延長あるいは術後肺瘻の遷延化など手術関連の合併症のリスク因子となる。また癒着は肺拡張を制限し拘束性障害の原因ともなる。他科領域にも目を向けると腹部外科領域では腸閉塞、整形外科領域では関節の可動制限などの原因ともなり、多くの外科領域で解決が望まれる課題である。

創傷治癒のメカニズムそのものに立ち返り血小板の果たす役割に着目した。手術や感染などにより組織が障害され炎症が惹起されると、その治癒過程で種々のサイトカインにより炎症細胞の誘導やフィブリンが析出する。この過程では、凝固系カスケードが活性化されたのち、線溶系カスケードが働きフィブリンが溶解する。その過程が不十分であると隣接する臓器と連続性を持ち癒着を形成することとなる。癒着形成の初期のメカニズムである創傷治癒において血小板は重要な役割をしている。障害を受け露出した組織のコラーゲンやトロンビンにより血小板が活性化され、TGF-β や PDGF を放出する。これにより好中球やマクロファージなどの炎症性細胞が誘導される。このように血小板は癒着形成の上位カスケードに位置しており重要な因子となっている。

このことから抗血小板作用が癒着を抑制する可能性を検証した。

### 2. 研究の目的

フィルムを用いた物理的な方法で癒着を防止する方法がとられることがあるが、癒着を防止する確立された方法はない。フィルムのように物理的に障壁を作る方法ではなく、創傷治癒のメカニズムにおける血小板の癒着に果たす役割に着目している。血小板と癒着を関連付ける報告は無く、癒着機序の解明を図ることで新しい観点による癒着防止法の開発の一助となる可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) 臨床データでの抗血小板薬の癒着への影響を評価

まず、臨床データを用いてアスピリン内服症例での再開胸時の癒着抑制効果を検討した。2006年1月～2018年8月に当院で行った同側肺の再切除症例のうち術後合併症に伴う再手術例は除外し、58例を対象とし、アスピリン内服例と日内服例を比較した。結果として、高度癒着が少ない因子は、単変量解析では手術時間 (<120分)、アスピリン内服歴、化学療法投与歴、術後白血球数低値であった。(p<0.05)。

多変量解析では、アスピリン内服歴、化学療法投与歴が癒着軽度と関連を認め(p<0.05) (図1)。手術後早期のアスピリンの内服、術前化学療法投与歴では、同側肺再切除時に癒着が軽度である事が確認できた。

図.1 【癒着と臨床背景の相関】

Characteristics	univariate*			multivariate**		
	OR	95% CI	p Value	OR	95% CI	p Value
Age (<65 years)	0.95	0.32-2.86	0.93			
Female	0.93	0.30-2.89	0.91			
Primary disease						
Non-Lung cancer	2.22	0.73-6.81	0.16			
Primary procedure						
Wedge resection	1.47	0.36-5.79	0.59			
Approach						
Minimally invasive	2.33	0.51-10.58	0.23			
Covering (no)	0.89	0.32-2.51	0.83			
Operating time (<120 min)	4.56	1.39-14.97	<b>0.001</b>	1.73	0.48-8.04	0.48
Bleeding (<30 g)	3.37	0.78-14.50	0.090			
History						
Diabetes	0.51	0.13-1.95	0.32			
Steroid	0.47	0.02-8.02	0.60			
Aspirin	4.12	1.03-16.48	<b>0.037</b>	5.04	1.10-31.32	<b>0.037</b>
Chemotherapy	8.44	2.31-30.82	<b>&lt;0.001</b>	6.47	1.44-34.79	<b>0.015</b>
Pre-WBC (<5600)	1.79	0.58-5.54	0.31			
Post-WBC ① (<8800)	2.00	0.60-6.74	0.25			
Post-WBC ② (<8200)	3.66	1.06-12.62	<b>0.035</b>	2.38	0.50-11.85	0.27
ΔWBC (<0.85)	3.4	0.88-13.21	0.068			
Pre-PLT (<15.8)	0.34	0.09-1.20	0.088			
Post-PLT ① (<14.8)	0.23	0.05-0.95	<b>0.033</b>			
Post-PLT ② (<28.2)	3.1	0.92-10.41	0.062			
ΔPLT (<1.34)	3.63	1.11-11.74	<b>0.028</b>	2.05	0.47-8.96	0.16

\* ROC curveを用いてcut off(括弧内)を算出

\*Chi-squared test

\*\*Logistic regression

## (2) ラットを使用した胸膜癒着モデルによる抗血小板剤の癒着抑制効果の検証

### a. 血小板関連サイトカインの抗体の Validation

ラット胸膜癒着モデルによる癒着形成に関わる炎症細胞を同定するための抗体について validation を行った。癒着形成時に炎症細胞から放出される血小板関連因子 PDGF-A (sc-9974), PDGF-B (ab16829), VEGF (ab), 癒着形成における線維芽細胞の同定には  $\alpha$ -SMA (ab5694) を用いて染色性を確認した。また癒着形成の線溶系サイトカインとして plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1, ab66705) の免疫染色を行い染色性を確認した。

### b. ラット癒着モデルを使用した抗血小板薬の検証

ラット胸膜癒着モデルとして、開胸直下に臓側胸膜に 2cm の焼灼を行った胸膜焼灼処置、4320KE の胸腔内投与(0.2KE/ml)を用いた薬剤癒着処置の胸膜癒着モデルを用いた。10 日後に再開胸し癒着距離の測定および癒着部位の組織学的評価を行なった。免疫組織学的所見として、PDGF-A, PDGF-, VEGF, PAI-1, SMA の免疫染色を行い、また血液を採取し ELISA 法により血小板固有蛋白である血清 Plasmin Inhibitor 4 (PF4) の測定を行なった。血小板抑制群 (N=6) としてプラスグレル 10mg/kg (エフィエント®) 内服群を設定し、コントロール群 (N=6) として蒸留水投与(2ml/body)群を比較した。プラスグレル は他の抗血小板剤と比較し、高い活性代謝物の AUC および C max を有し低用量で早期に発現を有することが報告されているため (Sugidachi A. J Thromb Haemost, 2007, Payen CD. J Cardiovasc Pharmacol, 2007), 手術後早期の癒着抑制効果を検証する抗血小板剤としてこれを選択した。

結果として、両群とも強固な癒着の形成は認めなかった。一部形成された癒着部位および胸膜焼灼部位のパラフィンブロック切片を作成し組織学的評価を行なった。

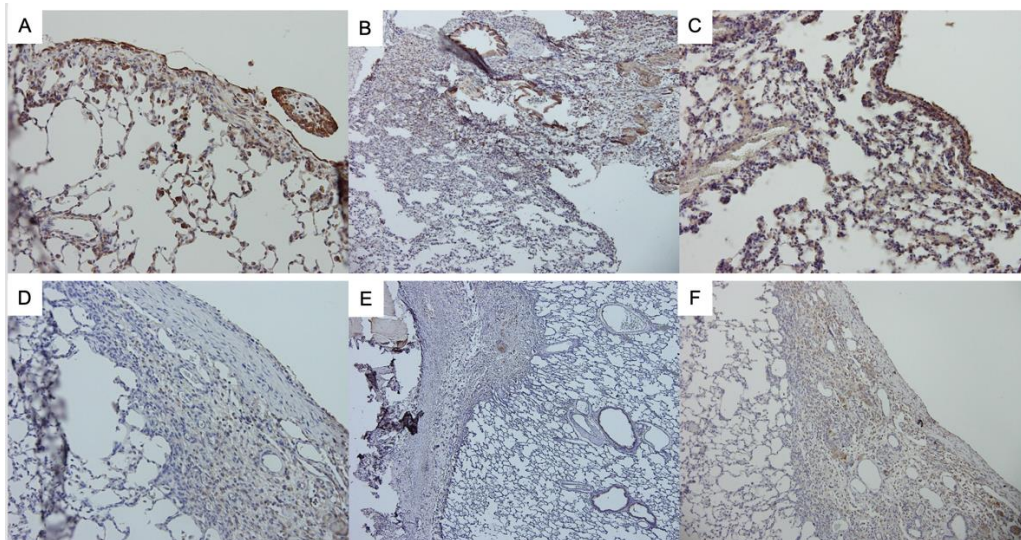
胸膜焼灼処置では胸膜処置部位の好中球やマクロファージ、リンパ球などの炎症細胞が浸潤し、PDGF-A, PDGF-B, VEGF が発現しており炎症が誘発されている組織所見が確認できた。周囲の肺胞組織にはサイトカインの発現は低い傾向にあった。一方、プラスグレル 群では癒着部位の PDGF-A, PDGF-B, VEGF が減弱していた (図 2)。SMA による胸膜肥厚の違いは両群で見られなかった。

4320KE 胸膜癒着処置では胸膜癒着部位に好中球やマクロファージ、リンパ球などの炎症細胞が浸潤し、PDGF-A, PDGF-B, VEGF が発現、また周囲の胸膜直下の肺胞組織にも PDGF-A, PDGF-B, VEGF が発現しており、炎症が惹起されている所見であった。一方、プラスグレル 群でも同様に、癒着部位の PDGF-A, PDGF-B, VEGF の発現を認めたが、プラスグレル 群と比較し減弱しているようであった。

血清 PF4 値は、薬剤癒着処置において、コントロール群 (生食 2ml/body) と比較しプラスグレル内服群で低下していた ( $85 \times 10^2$  pg/mL (C 群) vs  $57 \times 10^2$  (P 群) pg/mL, 中央値)。胸膜焼灼処置では、癒着処置群ではプラスグレル内服群とコントロール軍に差を認めなかった ( $60 \times 10^2$  pg/mL (C 群) vs (P 群)  $50 \times 10^2$  pg/mL, 中央値) (図 4)。SMA による胸膜肥厚の違いは両群で見られなかった。

以上より、胸膜焼灼処置群では局所的に 4320KE 処置群では肺組織全体的に炎症が誘発され、プラスグレル内服によって血小板抑制効果は組織学的に血小板に由来する炎症を抑え癒着部位での炎症を抑制する可能性が示唆された。

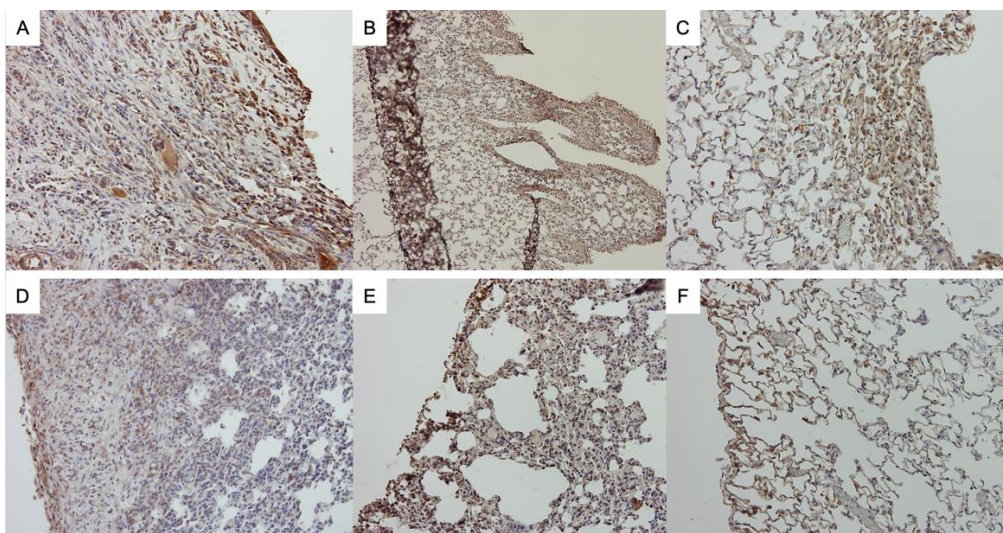
図 2. 胸膜焼灼処置による癒着部位の組織学的所見



A-C: コントロール群, D-E: プラスグループ 内服群

A, D : PDGF-A, B, E : PDGF-B, C, F : VEGF-A

図 3. 4320KE 処置による癒着部位の組織学的所見



A-C: コントロール群, D-E: プラスグループ 内服群

A, D : PDGF-A, B, E : PDGF-B, C, F : VEGF-A

#### 4. 研究成果

再開胸時の臨床データおよび小動物による胸膜癒着モデルを用いた抗血小板剤の癒着抑制効果を検証した。抗血小板剤は再開胸時の癒着を軽減する効果が示された。また、胸膜癒着モデルを用いた実験では、抗血小板薬により血小板に関わる炎症性サイトカインが抑制され、血中において血小板由来因子 (PF4) を減弱させる可能性が示唆された。今後更なる基礎研究を経て癒着機序の解明を図り、新たな癒着防止方法の開発の一助となることが期待される。

石原駿太, 常塚啓彰他

アスピリンによる再開胸手術時の癒着抑制効果

第 36 回呼吸器外科学会 (大阪) 2019 年 5 月 16 日~17 日

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石原駿太, 常塚啓彰他
2. 発表標題 アスピリンによる再開胸手術時の癒着抑制効果
3. 学会等名 第36回日本呼吸器外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原駿太, 常塚啓彰他
2. 発表標題 ラット開胸癒着モデルでのアスピリンによる胸膜癒着抑制効果の組織学的検討
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

胸膜癒着と血小板に関する研究 <a href="http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/thoracic/medical/research.html">http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/thoracic/medical/research.html</a>
---

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------