



Topical application of basic fibroblast growth factor reduces esophageal stricture and esophageal neural damage after sodium hydroxide-induced esophagitis in rats

大片，祐一

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2012-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5406

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005406>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Topical application of basic fibroblast growth factor reduces esophageal stricture and esophageal neural damage after sodium hydroxide-induced esophagitis in rats

水酸化ナトリウム水溶液を用いたラット食道狭窄モデルにおける
bFGF 局所投与の治療効果：狭窄の軽減および食道神経障害の軽減

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
小児外科学
(指導教員：西島 栄治 教授（兵庫県との連携教授））

大片 祐一

【背景】

腐食性物質誤飲に対する治療と予防は小児救急医療において重要な課題である。腐食性物質誤飲の初期治療の目的は、食道炎・食道穿孔・縦隔炎などの急性期合併症と食道狭窄症などの長期合併症を予防することであるが、未だ最適な治療方法は確立されていない。特に腐食性食道炎後の食道狭窄症は時に難治性となり、長期間にわたる治療を必要とするため患児の QOL は著しく損なわれる。

これまで数多くの薬剤が、動物実験レベルで腐食性食道炎後の食道狭窄形成予防効果を示すとして報告されているが、いずれも創傷治癒過程において重要なコラーゲンの生成を抑制するため、食道穿孔や縦隔炎などのさらに重篤な合併症を引き起こす可能性がある。ゆえに、創傷治癒を促進し、かつ腐食性食道炎後の食道狭窄を予防する理想的な治療薬が求められる。

塩基性線維芽細胞増殖因子である basic fibroblast growth factor(以下、bFGF)はすでにその創傷治癒促進効果が証明されており、現在臨床の場において褥瘡治療・熱傷治療などに広く用いられている。また、最近では動物の皮膚切開創・皮膚欠損創において bFGF を局所投与することで創の収縮を抑制し、後の瘢痕形成を軽微化することが明らかとなってきた。

今回我々は、水酸化ナトリウム水溶液を用いた腐食剤誤飲後ラット食道狭窄モデルを用いて、腐食性食道炎に対する bFGF 局所投与の治療効果を検討した。

【方法】

1. 水酸化ナトリウム水溶液を用いたラット食道狭窄モデル

腐食性食道炎後のラット食道狭窄モデルを作成するにあたり、強アルカリである水酸化ナトリウム水溶液を用いた腐食性食道炎モデル・食道狭窄モデルの過去の動物実験報告をもとに、食道狭窄を形成する最適な水酸化ナトリウム濃度と投与方法を決定した（参考文献）。

2. 実験方法

7 週齢雄の Sprague-Dawley ラット 36 匹を用いた。開腹下に腹部食道を露出したのち、食道内腔にカテーテルを経口的に挿入し、腹部食道の頭尾側を 1.5cm あけて絹糸で一時的に結紮し、その内腔に限局するように 30%水酸化ナトリウム水溶液を 2 分間作用させ腐食性食道炎を引き起こした。

腐食性食道炎を引き起こした後、生理食塩水を食道内腔に 10 分間作用させた非治療群（以下、B 群）、10 μ g/ml の bFGF を 10 分間食道内腔に作用させた治療群（以下、C 群）に、水酸化ナトリウムの代わりに生理食塩水を反応させ腐食性食道炎を引き起こさなかった群（以下、A 群）を加えた 3 群に分類した。

術後は通常の食餌を与え、術後 28 日目に下部食道を 1.5cm にわたり摘出し、パラフィン固定した。

3. 生存率・有症状率・体重増加

各群における 28 日目での生存率・有症状率（観察期間中に食道炎および食道狭窄に伴う流涎・喘鳴などの症状が出現した割合）・28 日間での体重増加について評価した。

4. 組織学的評価

1) 組織損傷スコア

膠原線維を選択的に染める Masson's trichrome 染色法を用いた。

食道壁の障害の程度を評価するために、①粘膜下層での膠原線維の増生の程度（スコア：0～2）、②粘膜筋板の損傷の有無（スコア：0～1）、③食道筋層における膠原線維の増生の程度（スコア：0～2）をそれぞれスコアリングし、3 つの項目の総和を組織損傷スコアと定義して各群間で比較した。

2) 食道狭窄率

H.E. 染色を行った食道組織の短軸像で食道内腔面積/全食道面積を測定し、食道狭窄率と定義して組織学的な狭窄の程度の指標とした。

5. 免疫組織学的評価

食道神経損傷の程度については、神経線維マーカーである anti-protein gene product 9.5 (PGP 9.5) 陽性神経線維の食道壁に占める割合を測定し評価した。

6. 統計学的解析

統計学的評価は JMP software(SAS Institute, USA)を用い、生存率・有症状率は Fisher's exact test を、体重増加・組織損傷スコア・食道狭窄率・PGP9.5 陽性線維の占める割合は Wilcoxon rank sum test を行い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

【結果】

C 群の 1 例は手術直後に一時的な呼吸困難を呈したため除外したが、観察期間中無症状で経過した。

1. 生存率・死亡原因・有症状率

28 日間生存率は A 群 (12 例) 100%、B 群 (7/12 例) 58.3%、C 群 (9/11 例) 81.8%、有症状率（嚥下困難に伴う症状を呈したものの割合）は A 群 0% (0/12 例)、B 群 50% (6/12 例)、C 群は 27.3% (3/11 例) であり、生存率・有症状率ともに B 群・C 群間で有意差はなかった ($p=0.3707$, $p=0.4003$)。

2. 体重増加

生存例の体重増加の中央値(範囲)は A 群 99 (80-113)g、B 群 61 (9-108)g、C 群 77 (33-147)g 群であり、A 群と比較して B 群でのみ有意な体重減少を認めた($p=0.0123$)。

3. 組織損傷スコア

組織損傷スコアの中央値（範囲）は、A 群 0 (0-0)・B 群 3 (1-4)・C 群 3 (1-5)であり、組織学的な損傷の程度に B 群・C 群間で差は認めなかった($p=0.8974$)。

4. 食道狭窄率

C 群の食道狭窄率(範囲) は 0.21 (0.13-0.37)と B 群の 0.13(0.025-0.35)に比して有意に改善していた($p=0.0004$)。

5. 免疫組織学的評価

食道壁の PGP9.5 陽性神経線維が占める割合は、A 群 7.2%、B 群 3.0%、C 群 4.3%と A 群に比して B 群・C 群ともに減少していたが (B 群・C 群ともに $p < 0.0001$)、C 群は B 群に比して有意に高かった($p=0.01$)。

【考察】

今回の実験結果から、腐食性食道炎後に bFGF を局所投与することで組織学的な食道狭窄を改善し得る可能性が示唆された。

bFGF は FGF(線維芽細胞増殖因子)ファミリーの 1 つであり、上皮細胞やマクロファージから産生され、創傷治癒過程における線維芽細胞の増殖や血管新生に関わり、創傷治癒を促進する。また興味深いことに、臨床研究および動物実験において皮膚切開創や熱傷創の急性期に bFGF を投与することで、筋線維芽細胞のアポトーシスが誘導され、創の過剰な肉芽形成の抑制し、創の収縮と瘻化を抑えた治癒を促進することが明らかとなっており、今回の狭窄軽減も同様のメカニズムによるものと推測している。

食道壁神経傷害の程度の指標として食道壁に占める PGP9.5 陽性線維の割合を評価したが、これは我々の以前の研究において、食道壁の損傷が組織学的に明らかでないにも関わらず食道狭窄に関連した症状を呈した例があること、またアカラシア・肥厚性幽門狭窄症・先天性食道狭窄症の原因として消化管壁の神経叢・神経線維の減少あるいは欠損を指摘している報告やラット大腸炎モデルにおいて消化管壁の神経線維の部分的な欠損が狭窄形成に関与しているとする報告があることが理由である。実際、今回の結果においても B 群に比べ C 群での PGP9.5 陽性神経線維の食道壁に占める割合が高いことから、C 群における食道狭窄率の改善と神経障害の程度の軽減に何らかの関与があることが推測された。

今回の実験では食道狭窄の軽減と神経障害の軽減のメカニズムを明らかにするに至っておらず、今後の課題として、bFGF の経時的な効果とメカニズムの解明および臨床応用にむけて最適な bFGF 濃度・投与方法を決定する必要がある。

【まとめ】 bFGF は水酸化ナトリウム水溶液による腐食性食道炎後の組織学的な食道狭窄率を有意に改善した。

(参考文献)

Development of a model of benign esophageal stricture in rats: the optimal concentration of

sodium hydroxide for stricture formation.

Okata Y, Hisamatsu C, Hasegawa T, Nishijima E, Okita Y.

Pediatr Surg Int. 2011 Jan;27(1):73-80.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2225 号	氏 名	大片 祐一
論文題目 Title of Dissertation	Topical application of basic fibroblast growth factor reduces esophageal stricture and esophageal neural damage after sodium hydroxide-induced esophagitis in rats 水酸化ナトリウム水溶液を用いたラット食道狭窄モデルにおける bFGF 局所投与の治療効果：狭窄の軽減および食道神経障害の軽減		
審査委員 Examiner	主 査 東 健 Chief Examiner 副 査 横 崎 久 Vice-examiner 副 査 黒 田 大 介 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

腐食性物質誤飲に対する治療と予防は小児救急医療において重要な課題である。腐食性物質誤飲の初期治療の目的は、食道炎・食道穿孔・縦隔炎などの急性期合併症と食道狭窄症などの長期合併症を予防することであるが、未だ最適な治療方法は確立されていない。特に腐食性食道炎後の食道狭窄症は時に難治性となり、長期間にわたる治療を必要とするため患児の QOL は著しく損なわれる。これまで数多くの薬剤が、動物実験レベルで腐食性食道炎後の食道狭窄形成予防効果を示すとして報告されているが、いずれも創傷治癒過程において重要なコラーゲンの生成を抑制するため、食道穿孔や縦隔炎などのさらに重篤な合併症を引き起こす可能性がある。ゆえに、創傷治癒を促進し、かつ腐食性食道炎後の食道狭窄を予防する理想的な治療薬が求められる。

塩基性線維芽細胞増殖因子である basic fibroblast growth factor (bFGF) はすでにその創傷治癒促進効果が証明されており、現在臨床の場において褥瘡治療・熱傷治療などに広く用いられている。また、最近では動物の皮膚切開創・皮膚欠損創において bFGF を局所投与することで創の収縮を抑制し、後の瘢痕形成を軽微化することが明らかとなってきた。

本研究は、水酸化ナトリウム水溶液を用いた腐食剤誤飲後ラット食道狭窄モデルを用いて、腐食性食道炎に対する bFGF 局所投与の治療効果を検討した。7 週齢の Sprague-Dawley ラットを開腹下に腹部食道を露出したのち、食道内腔にカテーテルを経口的に挿入し、腹部食道の頭尾側を 1.5cm あけて絹糸で一時的に結紮し、その内腔に局限するように 30% 水酸化ナトリウム水溶液を 2 分間作用させ腐食性食道炎を引き起こした。腐食性食道炎を引き起こした後、生理食塩水を食道内腔に 10 分間作用させた非治療群 (B 群)、10 μ g/ml の bFGF を 10 分間食道内腔に作用させた治療群 (C 群) に、水酸化ナトリウムの代わりに生理食塩水を反応させ腐食性食道炎を引き起こさなかった群 (A 群) を加えた 3 群に分類した。術後は通常の食餌を与え、術後 28 日目に下部食道を 1.5cm にわたり摘出し、ホルマリン固定した。その結果、28 日間生存率・有症状率には B 群・C 群間で有意差は認めず、組織学的な損傷の程度も B 群・C 群間で差は認めなかった。しかし、C 群の食道狭窄率(範囲)は B 群に比して有意に改善し、食道壁の PGP9.5 陽性神経線維が占める割合が C 群は

B 群に比べ有意に高かった。本研究結果から、腐食性食道炎後に bFGF を局所投与することで組織学的な食道狭窄を改善し得る可能性が示唆された。

bFGF は FGF(線維芽細胞増殖因子)ファミリーの 1 つであり、上皮細胞やマクロファージから産生され、創傷治癒過程における線維芽細胞の増殖や血管新生に関わり、創傷治癒を促進する。また興味深いことに、臨床研究および動物実験において皮膚切開創や熱傷創の急性期に bFGF を投与することで、筋線維芽細胞のアポトーシスが誘導され、創の過剰な肉芽形成の抑制し、創の収縮と癒着化を抑えた治癒を促進することが明らかとなってきた。本研究の狭窄軽減も同様のメカニズムによるものと推測される。食道壁神経傷害の程度の指標として食道壁に占める PGP9.5 陽性線維の割合を評価したが、これは本研究者の以前の研究において、食道壁の損傷が組織学的に明らかでないにも関わらず食道狭窄に関連した症状を呈した例があること、またアカラシア・肥厚性幽門狭窄症・先天性食道狭窄症の原因として消化管壁の神経叢・神経線維の減少あるいは欠損を指摘している報告やラット大腸炎モデルにおいて消化管壁の神経線維の部分的な欠損が狭窄形成に関与しているとする報告があることが理由である。実際、今回の結果においても B 群に比べ C 群での PGP9.5 陽性神経線維の食道壁に占める割合が高いことから、C 群における食道狭窄率の改善と神経障害の程度の軽減に何らかの関与があることが推測された。

本研究は腐食性食道炎に対する bFGF 局所投与の治療効果について、そのメカニズムを研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった腐食性食道炎に対する bFGF の治療効果と神経障害との関連について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。