

原 著

ラット胃潰瘍に対する各種薬剤の創傷治癒効果についての病理組織学的比較 —胃潰瘍の内視鏡的止血術におけるフィブリン接着剤と bFGF の有効性の検証—

東京女子医科大学東医療センター救急医療科

*福井大学医学部附属病院病理

ハマダ タカミツ ナカガワ タカオ ス ガ ヒロヤス コバヤシ タカシ イマムラ ヨシアキ
濱田 隆光・中川 隆雄・須賀 弘泰・小林 尊志・今村 好章*

(受理 平成20年7月15日)

Histopathological Comparison of Wound Healing Effect of Various Drugs to Gastric Ulcer of Rat: Verification of Effectiveness of Endoscopic Hemostasis of Gastric Ulcer between the Fibrin Glue and bFGF

Takamitsu HAMADA, Takao NAKAGAWA, Hiroyasu SUGA,
Takashi KOBAYASHI and Yoshiaki IMAMURA*

Department of Emergency Medicine, Tokyo Women's Medical University Medical Center East

*Department of Pathology, Fukui University Medical School-Affiliated Hospital

A number of patients who are brought to our emergency center suffer from complication of coagulation-fibrinolysis disorder and those patients who also suffer from gastrointestinal hemorrhage present a problem in endoscopic hemorrhagic control. Thus an experiment was conducted by using rat to find the hemostatic and tissue healing effects of fibrin glue and basic fibrocyte growth factor (bFGF). Under Nembutal anesthesia, the rats were subjected to laparotomy to create mechanically hemorrhagic ulcers in the pyloric antrum. Into these lesions a physiological saline (sham), Bosmin in a hypertonic saline (HSE), ethanol (ET) or a fibrin glue (FG) was injected locally and their wound were closed. On the 1st, 3rd, 5th and 7th day following surgery, the abdomen was re-opened and pylorotomy was conducted for comparative evaluation of the local hemostatic and ulcer healing effects. FG was most effective in epithelial regeneration, remaining in the tissue until 7th day and suggesting its sustained hemostatic effect. Other groups showed some complications, such as mucosal and submucosal hemorrhage, inflammatory cell infiltration, poor epithelial development and others. The FG local injection therapy results in satisfactory epithelial regeneration: in addition to its hemostatic effect, the wound healing effect may be expected from the combination with bFGF.

Key words: hemorrhagic gastric ulcer, endoscopic hemostasis, wound healing, basic fibroblast growth factor, fibrin glue

はじめに

上部消化管出血は日常の臨床の場においてしばしば遭遇する病態であるが、救急領域における凝固異常を伴う重症患者などでは、その基礎疾患、全身状態により止血に難渋するとともに潰瘍治癒の遅延を来することがしばしば認められる^{1)~3)}。2000年10月より、フィブリン接着剤を凝固異常などを有する出血性潰瘍の内視鏡止血術に用い有効であった¹⁾。また、ラットを用いたフィブリン接着剤局注による実験的

検討では、より持続性の止血効果と再生上皮の出現促進効果が認められた¹⁾。しかし FG 局注においては、その局注手技などの問題より、より簡便な止血手技が望まれる。近年、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor ; bFGF) の潰瘍治療への適応が検討されており⁴⁾、今回我々はラットを用いてフィブリン接着剤、bFGF の併用での組織病理と組織治癒効果を実験的に検討した⁵⁾。

方 法

SD ラット (リタイヤ) をエーテル麻酔下に開腹し、幽門前庭部に各群 6 例ずつ機械的に出血性潰瘍 (眼科剪刀により約 1mm 大の粘膜欠損 (UI III)) を作製し各種薬剤により処理した。処理後に閉腹し、術後 1, 3, 5, 7 日目に再開腹し幽門側胃切除を施行し、局注部の止血効果、治癒過程を比較検討した。検討は生理食塩水 (Sham: 0.2ml), 高張生食ボスミン (HSE: 0.2ml), エタノール (ET: 0.1ml), およびフィブリン接着剤 (FG: 0.2ml, ボルヒール, 化血研, 熊本) (表 1) について行った。そしてさらに、防御因子促進効果をもつ薬剤として注目され、現在は皮膚潰瘍、褥創の治療薬として普及している薬剤である bFGF (フィブラスト, 科研, 東京) の 0.1ml 局注を併用することにより創傷治癒効果の促進が得られるかどうかについても検討した。

評価方法としては、ET 等は止血処置による潰瘍の増大が認められることがあり、また、今回の検討が創傷治癒効果に着目したことより、再生上皮の出現の程度について行った。具体的には組織病理学的に、Score 0: 再生上皮の出現のないもの、Score 1: 一部に再生上皮の出現がみられるものの不完全なもの、Score 2: 潰瘍底の全体に再生上皮が認められるもの、に分類し評価を行った。また、術後第 5, 7 日目のスコアの平均を Mann-whitney \bar{U} 検定にて検討した。

実験手技、動物の処理については東京女子医科大学倫理委員会の審査、許可のもとに行った。

結 果

再生上皮の出現状況を表 2 に示す。Sham 群は処置後 3 日目の開腹時、胃内への出血が全例に認められた。また 7 日目の病理では局注による組織傷害は認められないものの粘膜、粘膜下層への出血を認めた (図 1)。HSE 群は処置後 3 日目の開腹時、胃内への出血例が 3 例に認められ、そして 7 日目の病理では組織障害は軽度であるが、FG 群、Sham 群に比較すると再生上皮の出現は悪い結果となった (図 2)。ET 群においては、3 日目の開腹時出血例はなく確実な止血が出来た。そして 7 日目の病理組織では出血はないものの組織傷害は強く炎症細胞の浸潤も高度で、再生上皮の出現も不良であった (図 3)。FG 群は 3 日目の開腹時の出血例は認められず、再生上皮の出現は最も良好であり、さらに若干の組織傷害は認められるものの 7 日目まで粘膜下のフィブリンは残存しており、持続的止血効果が示唆された (図 4)。

表 1 フィブリン接着剤製剤の組成

Liquid A (2 ml)	Fibrin	80 mg/ml
	Factor XIII	75 unit/ml
	Aprotinin solution	1,000 KIE/ml
Liquid B (2 ml)	Thrombin	125 unit/ml
	Ca Cl ₂	5.9 mg/ml

また、bFGF の局注を併用することにより、3 日目の開腹時の出血例は Sham で 5 例 (83.3%), HSE 群で 3 例 (50%), ET 群で 1 例 (16.7%), FG 群で 0 例と止血効果は単独使用群とほぼ同様であったが、病理組織学的にはいずれの群においても再生上皮の出現は早く FG 群では 5 日目には再生上皮の出現があり、7 日目には潰瘍底全体に再生上皮の出現を認めた (図 5)。単独使用では再生上皮の出現を認めなかった ET 群も含め、すべての群において bFGF の併用により処置後 7 日目の再生上皮の出現は改善される傾向が認められた (図 1~4)。そして、各薬剤の単独処理群と bFGF 併用群の第 5, 7 日目のスコアを比較すると bFGF 併用群で有意に改善された (表 3)。

考 察

上部消化管出血は日常の臨床の場においてしばしば遭遇する病態であり、迅速な診断と処置を必要とする救急疾患の一つである。近年、内視鏡機器の進歩により、緊急内視鏡が出血源の確認を容易にし、内視鏡止血が高く評価されるようになった⁵⁾。その方法としてエタノール⁶⁾、高張食塩水エピネフリン (HSE)⁷⁾、その他の硬化剤⁸⁾の局注およびクリッピング⁹⁾等が用いられてきた。しかしクリッピングにおいては潰瘍の占拠部位の直視が困難な場合があり、エタノール局注においては組織傷害性があり、広範囲潰瘍よりの複数部位からの出血、基礎疾患 (肝硬変、凝固障害など) からの出血を増強させる場合がある等の問題が残されている¹³⁾。特に救命救急センターで取り扱う疾患に合併する上部消化管出血はその基礎疾患において播種性血管内凝固 (DIC) などの凝固線溶系異常を伴っている場合が少なくなく、組織侵襲が少なく長期間の確実な止血が望まれる。

2000 年 10 月よりクリッピングの困難な部位の症例、肝硬変、脳梗塞後の抗血栓療法中の症例、DIC などの凝固線溶系異常を伴う症例の内視鏡止血術、ポリペクトミー、endoscopic mucosal resection (EMR) 時の出血コントロールに対しフィブリン接着剤^{13) 10)~12)}局注を単独使用、あるいは他の止血法と

表2 実験結果

		Day 1	Day 3	Day 5	Day 7
Sham	(n = 6)	0	0	0	1
HSE	(n = 6)	0	0	0	1 *
ET	(n = 6)	0	0	0	0
FG	(n = 6)	0	0	1	1
Sham + bFGF	(n = 6)	0	0	1	1
HSE + bFGF	(n = 6)	0	0	1 **	1
ET + bFGF	(n = 6)	0	0	0	1 **
FG + bFGF	(n = 6)	0	0	1	2

いずれの処置群においても、単独処置群に比較し bFGF の併用群は再生上皮の出現が早かった。

Score 0: 再生上皮の出現なし, Score 1: 一部に再生上皮の出現がみられるものの不完全, Score 2: 潰瘍底の全体に再生上皮が認められる. *: 4 例のみ Score 1 で他は Score 0. **: 5 例のみ Score 1 で他は Score 0.

併用し良好な成績が得られた。症例の内訳は、胃潰瘍が 22 例、胃癌が 3 例、食道潰瘍が 2 例、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍が各 1 例、ポリペクトミー、EMR 症例は上部 15 例、下部 12 例の計 56 例である。このうち十二指腸潰瘍は視野確保が不十分であり正確な局注ができず再出血し手術となったが、他の症例では再出血は認められなかった¹⁾。現在、内視鏡止血術に最も用いられているエタノールは強力な止血作用を有する一方で強い組織傷害を有し、凝固障害を有する患者などへの注入には注意を要する¹³⁾⁶⁾。また HSE は組織傷害は軽度であるもののその止血効果の持続性に問題がある¹³⁾⁷⁾。クリッピングにおいては、フードの使用などの工夫がなされているものの潰瘍の占拠部位によっては熟練を要する¹³⁾⁹⁾。そこでフィブリン接着剤の局注を検討した。フィブリン接着剤はフィブリンからなる A 液とトロロンビンからなる B 液からなり、局所で混合することにより瞬時に凝固効果を発現する薬剤で、主に手術中の難治性出血の止血に散布する薬剤として用いられている¹¹⁾¹³⁾。1997 年 Rutegeerts ら⁸⁾によってポルトガノールとの比較検討によりフィブリン接着剤の胃潰瘍に対する止血効果が実証され、本邦においては中村ら¹¹⁾によって検討されるようになった。その局注方法では、Olaf ら¹³⁾による二重構造になった局注針などの報告もあったが、中村ら¹¹⁾によって通常用いる局注針でのサンドイッチ法による局注により慣用されるようになった。当科でも先に述べたごとく 2000 年より臨床で用い良好な成績であった¹⁾。我々はラットを用いて実験的検討も加えた。その結果、フィブリン接着剤の局注はエタノールなどに比較し持続的な止血効果を認めるとともに創傷治癒効果も期待で

きる薬剤であることが示唆された。

全身状態の不良な重症救急患者における難治性潰瘍からの出血はよく遭遇するものであるが、フィブリン接着剤はその際の止血、治癒促進効果に有効な治療手技と考えられた³⁾。しかし、再出血を生じた十二指腸潰瘍症例からも、視野の確保、サンドイッチ法が習熟を要することなどまだ問題は残されている。よってより簡便なエタノール局注などの組織傷害という弱点の補助療法の検討余地も残されている。また、重症病態の患者においては凝固線溶系の異常を伴った場合をはじめとして難治性の出血でそのコントロールに難渋することが少なくない。萩原ら²⁾¹⁴⁾によれば難治性潰瘍はその潰瘍底への細菌感染が問題となると報告している。しかし現実には重症病態での感染のコントロールは容易ではなく、全身状態の改善に努めるのは元より、早期の止血、潰瘍治癒のための新たな加療が望まれる。

1993 年より bFGF の潰瘍再生過程における関与が報告されるようになり⁴⁾¹⁵⁾、bFGF-CS23 (フィブラストスプレー) が褥創などの皮膚潰瘍、口腔外科領域での潰瘍治癒に効果をあげるようになった¹⁶⁾¹⁷⁾。bFGF を現在使用されているエタノール局注、HES 等と組み合わせることにより、重症病態を有する患者に合併した消化管出血に対しより効果的治療が可能か否か、今回実験的検討を加えた。

胃炎・胃粘膜傷害・胃潰瘍実験モデルとしては発症機序によって①熱湯、無麻酔拔牙などの物理的刺激によるもの、②酢酸、エタノール投与といった化学物質によるもの、③虚血再灌流刺激などの生物学的要因によるものなどが現在までその実験目的により作製、報告されてきた¹⁸⁾。またこれらの中には胃潰

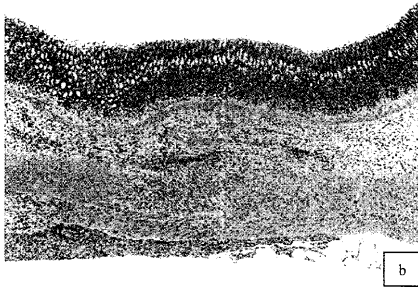


図1 Sham(a)およびSham + bFGF (b)の施行7日目の組織病理 (HE, ×10)

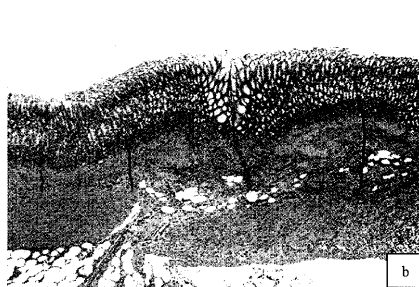
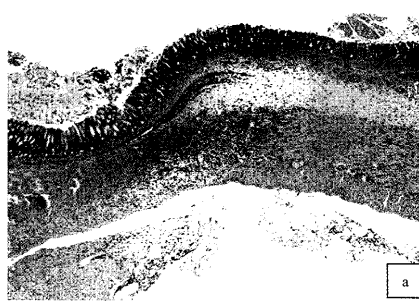


図2 HSE (a) および HSE + bFGF (b) 施行7日目の組織病理 (HE, ×10)

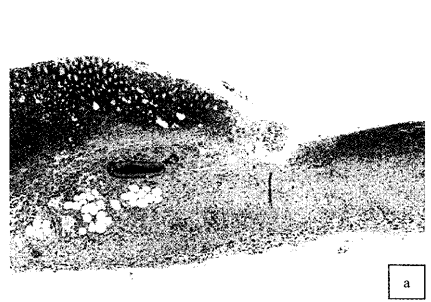


図3 Ethanol (a) および Ethanol + bFGF (b) 施行7日目の組織病理 (HE, ×10)

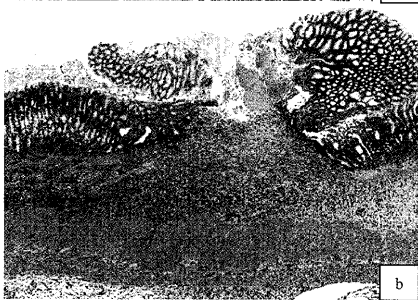
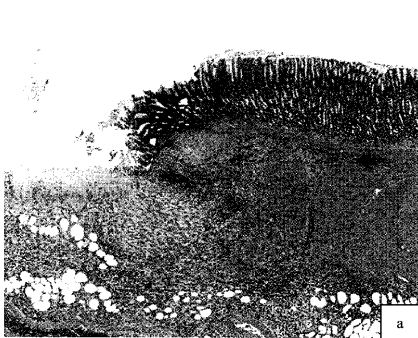


図4 FG (a) および FG + bFGF (b) 施行7日目の組織病理 (HE, ×10)
a : FG, b : FG + bFGF

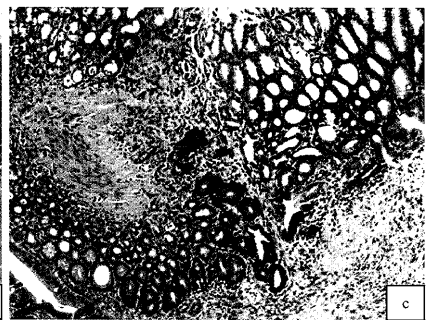
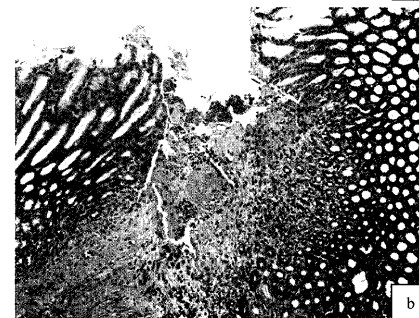


図5 FG + bFGF 症例
5日目より再生上皮の出現があり, 7日目より潰瘍底の全体に再生上皮を認めるまでに改善している。a : Score 0 処置後3日目 (HE, ×25), b : Score 1 処置後5日目 (HE, ×25), c : Score 2 処置後7日目 (HE, ×25)

瘍の難治化要因の検討などもなされてきた。今回の検討においては、可及的に同一サイズの潰瘍を同様の部位に生じさせ処置を行い、その後の経過を診ることを目的に、一回の開腹で潰瘍の作製と同時に処置を行う須賀ら¹³⁾の機械的に幽門前庭部潰瘍を作製

する実験モデルを選択した¹⁸⁾¹⁹⁾。

通常の創傷の治癒過程は多彩であるが、これには多くのサイトカイン、増殖因子の発現と役割のネットワークが関与することが示されている²⁰⁾。増殖因子は生体のあらゆる組織で細胞増殖のみならず、そ

表3 第5, 7日目の各種薬剤の単独処置群とbFGFの併用群の比較

		平均 score	p
Sham	(n = 12)	0.50 ± 0.15	0.0056
Sham + bFGF	(n = 12)	1.00 ± 0.00	
HSE	(n = 12)	0.33 ± 0.14	0.0039
HSE + bFGF	(n = 12)	0.92 ± 0.01	
ET	(n = 12)	0.00 ± 0.00	0.0139
ET + bFGF	(n = 12)	0.42 ± 0.15	
FG	(n = 12)	1.00 ± 0.00	0.0056
FG + bFGF	(n = 12)	1.50 ± 0.15	

の分化, 迷走等において重要な役割を有しており, 胃粘膜においても例外ではなく上皮増殖因子 (epidermal growth factor; EGF), 形質転換増殖因子 (transforming growth factor; TGF), 線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor; FGF) 血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor; PDGF) などの多くの増殖因子が創傷治癒過程に大きな影響を与えている^{17)20)~23)}。なかでも bFGF は線維芽細胞に対する増殖刺激ばかりではなく強力な血管新生作用も指摘されており⁴⁾¹⁵⁾, これらの作用を利用し褥創, 口腔外科領域での創傷治癒促進薬として適用されるようになった¹⁶⁾¹⁷⁾²⁴⁾。この bFGF は胃粘膜中の局在も報告され²⁵⁾, その結合組織増生あるいは血管新生という観点から, 消化性潰瘍の治癒過程に重要な役割を果たしていると考えられる。Folkman ら²⁶⁾ はラットの十二指腸潰瘍モデルにおいて, その治癒過程での粘膜の bFGF 量の増加を報告しており, この組織修復作用を利用して消化性潰瘍への効果が検討されるようになった。救急領域で遭遇する重症患者では潰瘍治癒の遷延にしばしば遭遇するが, 萩原ら²⁾の報告では潰瘍底の感染が潰瘍遷延に関与するので, そのコントロールが重要であると指摘している。その一方で中村ら¹¹⁾はフィブリン糊等の人為的局注はその治癒過程の促進に寄与するとも報告している。しかし, 重症病態における感染のコントロールや栄養状態をはじめとした全身状態の改善には難渋する 경우가少なくなく, 当科でのラットでの実験的検討においてもフィブリン接着剤の使用により再生上皮の出現は有意に良好であったが³⁾, より創傷治癒効果を促進できる治療手技が望まれている。そこで今回, 消化性潰瘍の治癒過程に重要な役割を果たしていると考えられる bFGF とその局注が治癒過程に促進的に作用するとされるフィブリン接着剤とを組み

合わせることで, 止血効果とともに有効な創傷治癒効果をもたらすのではないかと考え検討を加えた。また, 元来使用されてきたエタノールの強力な止血作用とともにその組織傷害性を緩和出来るかについても検討した。その結果フィブリン接着剤に bFGF を併用することにより単独使用に比較し早期より再生上皮が出現し (図 5), 有効な治療効果が得られるとともに, エタノール止血における組織傷害を緩和する効果が示唆された (表 2, 3)。先に述べたごとく, 当科で検討してきたフィブリン接着剤局注は持続性, 創傷治癒の面からの長所を有する一方で, その手技, 視野の確保等の問題が残されているが, bFGF の併用は非常に簡便であり, 従来使用されているエタノール局注, HSE 等と組み合わせることにより, 様々な重症病態での出血性消化性潰瘍の有効な治療が可能となると考えられた。

結 語

1. ラットの出血性胃潰瘍における各種薬剤局注による止血効果について創傷治癒効果を中心に実験的に検討した。
2. フィブリン接着剤局注は再生上皮の出現が良好で, 止血効果と共に創傷治癒効果も得られた。
3. bFGF との併用は消化性潰瘍治癒効果も望みうる。
4. これらの薬剤の組み合わせにより重症病態でのより有効な治療が可能になると考えられた。

文 献

- 1) Suga H, Nakagawa T, Soga Y et al: Experimental study of hemostasis with local injection of fibrin glue to treat hemorrhagic ulcer in the upper digestive tract in comparison with ethanol. J Tokyo Wom Med Univ **73** (12): 508-515, 2003
- 2) 萩原栄一郎, 中村紀夫, 堤 純ほか: 消化性潰瘍難治症例と創傷治癒. Prog Med **20** (11): 2307-2308, 2000
- 3) Suga H, Nakagawa T, Soga Y et al: Endoscopic hemostasis using fibrin adhesive to treat hemorrhage in the upper digestive system. Surg Today **34**: 902-906, 2004
- 4) 寺野 彰, 平石秀幸, 島田忠人ほか: 細胞増殖因子による胃粘膜病変. GI Res **3** (1): 15-19, 1995
- 5) Kubba AK, Palmer KR: Role of endoscopic injection therapy in the treatment of bleeding peptic ulcer. Br J Surg **83**: 461-468, 1996
- 6) Asaki S, Nishimura T, Sato A et al: Endoscopic hemostasis of gastrointestinal hemorrhage by local application absolute of ethanol: a clinical study. Tohoku J Exp Med **141**: 373-383, 1983
- 7) Hirano M, Kobayashi T, Masuda K et al: Endoscopic local injection of hypertonic saline-epinephrine solution to arrest hemorrhage from up-

- per gastrointestinal tract. *Gastrointest Endosc* **31**: 313-317, 1985
- 8) Rutgeerts P, Rauws E, Wara P et al: Randomised trial of single and repeated fibrin glue compared with injection of polidocanol in treatment of bleeding peptic ulcer. *Lancet* **350**: 692-696, 1997
 - 9) Nagayama K, Tazawa J, Sakai Y et al: Efficacy of endoscopic clipping for bleeding gastroduodenal ulcer: comparison with topical ethanol injection. *Am J Gastroenterol* **94**: 2897-2901, 1999
 - 10) Herold G, Preclik G, Stange F: Gastroduodenal ulcer hemorrhage: endoscopic injection therapy using fibrin sealant. *Hepatogastroenterology* **41**: 116-119, 1994
 - 11) 中村紀夫, 藤田誠一郎, 繁田稔之: 上部消化管出血の止血術はどこまで可能か フィブリン接着剤注入法. *消内視鏡* **8**: 1213-1216, 1996
 - 12) Dunn CJ, Goa KL: Fibrin sealant: a review of its use in surgery and endoscopy. *Drugs* **58**: 863-886, 1999
 - 13) Olaf F: Endoscopic Fibrin Gluing—Method and concept for early elective therapy. *消内視鏡* **8** (9): 1217-1220, 1996
 - 14) 萩原栄一郎, 中村紀夫: 消化性潰瘍出血および穿孔例の細菌学的検討. *日腹部救急医学誌* **20** (4): 505-512, 2000
 - 15) 寺野 彰, 高橋盛雄, 太田慎一: 胃粘膜傷害の修復過程. *GI Res* **1**: 683-690, 1993
 - 16) 川鍋 仁, 石川博之, 木下尚一ほか: 口蓋部瘢痕形成ラットの創傷治癒過程における bFGF 投与の効果. *Orthod Waves-Jpn Ed* **63** (1): 29-41, 2004
 - 17) 岩田譲司: フィブラストスプレーが奏効を示した術後潰瘍の1症例. *診療と新薬* **41** (7): 622-623, 2004
 - 18) 白井 睦, 松井裕史: 胃炎・胃粘膜傷害・胃潰瘍実験モデル. *GI Res* **14** (1): 82-90, 2006
 - 19) 有沢富康, 後藤秀実, 大宮直木ほか: 胃潰瘍治癒過程における好酸球の動態—難治化要因としての好酸球の役割—. *Ther Res* **19** (suppl. 1): 35-40, 1998
 - 20) 前田迪郎, 宮脇美保子, 深田美加ほか: 創傷治癒過程におけるサイトカイン, 細胞増殖因子の関与—サイトカインの褥創治療への応用—. *褥瘡会誌* **4** (3): 347-352, 2002
 - 21) Szabo S, Vattary P, Morales R et al: Orally administered bFGF mutein; effect on healing of chronic duodenal ulcers in rats. *Dig Dis Sci* **34**: 1321-1323, 1989
 - 22) Itoh M, Joh T, Imai S et al: Experimental and clinical studies on epidermal growth factor for gastric mucosal protection and healing of gastric ulcers. *J Clin Gastroenterol* **10**: S7-S12, 1988
 - 23) Takahashi M, Ota S, Terano A et al: Hepatocyte growth factor induces mitogenic reaction to the rabbit gastric epithelial cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **191**: 528-534, 1993
 - 24) 小野一郎, 赤坂喜清: bFGF 製剤の創傷治癒促進作用について—迅速な創閉鎖から軽微な瘢痕化を目指して—. *細胞* **36** (12): 503-510, 2004
 - 25) 中村正彦, 土本寛二: 消化管内自律神経および壁在神経は再生するか—増殖因子, とくに bFGF との関連. *医のあゆみ* **201** (1): 67-71, 2002
 - 26) Folkman J, Szabo S, Strovroff M et al: Duodenal ulcer; discovery of a new mechanism and development of angiogenic therapy which accelerates healing. *Ann Surg* **214**: 414-425, 1991