

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008~2010

課題番号：20591541

研究課題名 (和文) 早期経口摂取が消化管吻合部創傷治癒を促進する機序の解明と臨床応用

研究課題名 (英文) Early Postoperative Oral Intake Accelerates Upper Gastrointestinal Anastomotic Healing: Its underlying mechanism and clinical application

研究代表者

寺島 秀夫 (TERASHIMA HIDEO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：10361338

研究成果の概要 (和文) :

機序の解明: 仮説として「早期経口摂取→消化管蠕動運動の早期回復・促進→腸管壁の線維芽細胞に対する機械的刺激 (mechanical loading) →消化管吻合部におけるコラーゲン合成促進→消化管吻合部の創傷治癒促進」という消化管吻合部創傷治癒促進の一連のメカニズムを提唱し、その機序の解明を行った。まず、ラットを用いて術後早期経口栄養摂取モデルと術後絶飲食下静脈栄養モデルを確立し、術後早期経口栄養摂取が上部消化管 (空腸) 吻合部耐圧性及び吻合部 hydroxyproline 含有量を有意に増加させることを実証した。次いで、静脈栄養管理下で胃瘻から生理食塩水または蒸留水を投与する術後早期経口補水液モデルと術後早期飲水モデルの 2 群を追加して実験を行った。その結果、術後早期経口補水液・飲水モデルでも絶飲食下の静脈栄養管理に比して術後早期栄養摂取モデルと同様に吻合部の創傷治癒が有意に促進された。すなわち、消化管吻合部の創傷治癒を促進するメカニズムには、吻合部局所に対する栄養学的な効果ではなく、栄養剤・経口補水液・水の摂取による mechanical loading が関与している可能性を初めて明らかにした。in vitro の実験として、ラットの胃から分離・培養した線維芽細胞に対して伸展圧縮負荷細胞培養装置を用いて mechanical loading を加えて、細胞シグナルの解析を行った。増殖系のシグナルである ERK と AKT や細胞移動に係わる STAT3 の発現が見られ、最も重要な所見として collagen type I・III の mRNA が発現することが確認され、仮説の後半部分の一端を立証することができた。また、創傷治癒に促進には血小板が大きく関与していることから、副次的に、血小板と消化管吻合部の創傷治癒の関係も検討した。その結果として、PRP (Platelet-Rich Plasma) が空腸吻合部の創傷治癒を促進することならびにその効果は bimodal effect であることも初めて解明した。

臨床応用: 以上の基礎実験に基づいて、非常に難易度が高いとされる胸部食道癌手術の術後においても早期経口摂取が安全に実施でき、かつ術後回復を大幅に促進し得ることを実証し、国内外の学会で発表した。特に本邦では、第 64 回日本消化器外科学会総会ワークショップ (2009 年)、第 65 回日本消化器外科学会総会 ランチョンセミナー (2010 年) において講演を行い、上部消化管吻合術後の慣習的な絶飲食期間の撤廃を提言し、早期経口摂取という新しい clinical practice の普及に大きく貢献した。

研究成果の概要 (英文) :

Basic research: In our previous study, we reported that early postoperative oral feeding accelerated upper gastrointestinal anastomotic healing in rats. To investigate its underlying mechanism, we performed in vivo and in vitro experiments. Rats that received proximal jejunal anastomosis were divided into four groups: the enteral nutrition (EN) group were fed via gastrostomy, the total parental nutrition (TPN alone) group were fed via a venous catheter, the TPN + saline group received an additional administration of normal saline solution via gastrostomy, and the TPN + water group received an additional administration of distilled water via gastrostomy. The anastomotic bursting pressure (ABP) and the hydroxyproline content of the anastomotic tissue were measured 5 d postoperatively. In an in vitro setting, the rat gastrointestinal fibroblasts were subjected to uniaxial stretching for 60 min, and the expression of type I and type III collagen mRNA was evaluated. The ABP and hydroxyproline content in the EN group, the TPN + saline group, and the TPN

+ water group were significantly higher than those in the TPN alone group. The mRNA levels of type I and type III collagen were increased by stretch stimulation. In addition, the expression of ERK, AKT, STAT3 and p38 MAPK was significantly observed. These results suggest that mechanical loading plays a key role in anastomotic healing. Collaterally, we examined the effects of platelet-rich plasma (PRP) on intestinal anastomotic healing because platelet is regarded as a storage vehicle of growth factors and plays a key role in the early phase of intestinal anastomotic healing. As a result, PRP might exert positive effects on intestinal anastomotic healing in a dose-dependent manner up to a certain level, but adverse effects occur when it is highly concentrated (bimodal effect). The essential PRP action appears to be driven by the platelets themselves.

Clinical application: Based on above-mentioned studies, we delivered the following vision for clinical practice. Provided that anastomosis has been performed correctly, early postoperative oral intake after upper gastrointestinal anastomosis does not have a negative impact on anastomotic wound healing. There is a strong probability that early postoperative oral liquid intake accelerates upper gastrointestinal anastomotic healing compared with parenteral nutrition with a fasting period. We proposed that it is time to consider abolishing a period of starvation after upper gastrointestinal surgery. So, we demonstrated that postoperative early oral intake is feasible and safe as well as the experimental setting reported by us, also in an upper gastrointestinal operation with the high degree of surgical stress such as esophagectomy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：代謝栄養外科学

1. 研究開始当初の背景

近年、わが国でも、クリニカルパスが導入され、在院日数の短縮が推進されている。消化管手術後の在院期間短縮は、術後合併症がない場合、経口摂取の開始時期により規定される。つまり、食事の開始時期が早まれば、それに応じて輸液管理が早期に不要となり、退院までの期間短縮が加速化される。1990年代半ばより、欧米では、この問題が罹患率の多い大腸癌手術をモデルとして検討されてきた。動物実験では、下部消化管(回腸・大腸)吻合術を行った直後から消化管内に栄養を投与すると、絶食下で静脈栄養管理した場

合に比べ、有意に吻合部の創傷治癒が促進されることが証明され、創傷治癒の観点からも早期の経口栄養摂取が望ましいことが示された。次いで、2000年に発表された臨床試験では、大腸癌手術症例を対象に、liquid dietを用いることにより術後第1ないし2病日以内に合併症を増加させることなく安全に経口栄養摂取が可能であることが明らかにされ、術後在院日数が最短2日間までに至っている。一方、胃・十二指腸・空腸といった上部消化管手術に対して、同様の検討を行った研究は、現在に至るまで動物実験および臨床試験ともに皆無である。その理由は、手術後

吻合部を直接食物が通過するため、吻合部の安静が保たれず、縫合不全の誘因となるという外科医の科学的根拠のない経験則である。この経験則により、上部消化管吻合後の早期経口摂取は禁忌とされ、現在、早くとも経口摂取開始時期は術後 3~5 日となっている。こうした状況の中、我々は、ラットを用いて上部消化管術後の早期経口栄養摂取モデルを作成し、手術直後からの早期経口栄養摂取が絶食下の静脈栄養管理に比して上部消化管吻合部の創傷治癒を有意に促進する新たな知見を得ていた (World J Surg 2007; 31:1234)。この研究を発展させるべく予備実験を行い、吻合部の創傷治癒が促進された機序は消化管へ投与された栄養素の直接効果ではなく、機械的刺激である仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

予備実験から、吻合部創傷治癒を促進した要素は消化管内へ投与された栄養素の直接効果ではなく、消化管に対する機械的刺激である可能性が強く示唆された。そこで、仮説として、「早期経口摂取 (栄養剤, 電解質液, 水) →消化管の蠕動運動促進→腸管壁の線維芽細胞に対する機械的刺激 (mechanical loading) →消化管吻合部におけるコラーゲン合成促進→消化管吻合部の創傷治癒促進」という消化管吻合部創傷治癒促進の一連のメカニズムを提唱し、機序の解明を行う。臨床応用として、上部消化管術後のクリニカルパスに早期経口摂取を組み込み、その安全性と feasibility を検証し、その有用性を実証して、術後の絶飲食撤廃と早期経口摂取という新しい clinical practice の普及を目指す。

3. 研究の方法

(1) 早期経口摂取が上部消化管吻合部の創傷治癒を促進させる機序の解明

① in vivo の検討

9 週齢の SD 雄性ラットを用いて、空腸起始部を切離・吻合した後に、胃瘻カテーテルおよび右内頸静脈経路で中心静脈カテーテルを留置した。術後直後から胃瘻カテーテルから栄養剤 (ビタミン添加高カロリー輸液製剤, 151kcal/kg, 9mL/kg/h) 投与する早期経口栄養摂取モデル (EN 群), 静脈カテーテルから同一の栄養剤を投与する絶飲食・静脈栄養モデル (TPN alone 群), 同様の静脈栄養管理を行いながら胃瘻カテーテルから生理食塩水または蒸留水を持続投与 (1ml/h) する早期経口補水液モデル (TPN+saline 群) と早期経口飲水モデル (TPN+water), の計 4 群 (各群とも n=20) を設定し、個別代謝ケージ内で飼育した。術後 5 日間の飼育を行い、体重変化、術後 5 病日目の血液生化学検査 (総蛋白, アルブミン, 尿素窒素, 血糖)・吻合部耐圧試

験 (Anastomotic Bursting Pressure : ABP)・吻合部 hydroxyproline 含有量 (組織 collagen 量を反映) を検討項目とした。吻合部耐圧試験は in situ で行った。具体的には 6 ゲージシカテーテルを空腸吻合部から 1.5cm 口側から吻合部に向けて挿入・留置し、吻合線を中心に近位側, 遠位側 1.5cm の部位で腸管を結紮し、カテーテルから 1ml/min の定速で注入し、その腸管内圧をトランスミッターにより持続的に測定しながら、吻合部が破裂する直前の内圧を ABP とした。吻合部 hydroxyproline 含有量 (HYP) は Guzmán らの方法 (J Liq Chromatogr 1992;15:1163) に準じて定量した。

創傷治癒に促進には血小板が大きく関与していることから、副次的に、血小板と消化管吻合部の創傷治癒の関係についても研究項目に含める方針とし、以下のごとく検討した。platelet-rich plasma (PRP) 作製 : 生後 6 週間 SD 雄ラットより採血 (10%ACD-A 液を混合) し、2 回の遠心分離にて PRP を採取し、platelet-poor plasma (PPP) にて濃度を調節し、高濃度 (5×10⁶/mm³ : 5 倍濃度), 低濃度 (2×10⁶/mm³ : 2 倍濃度) を作成した。Bovine thrombin および CaCl₂ を混ぜ合わせゲル化させた。PRP 濃度別増殖因子の定量 : PDGF-BB, TGF-β1 を測定した。消化管吻合部創傷治癒の検討 : ラットの上部空腸を切離・吻合した。吻合部へ低濃度 PRP, 高濃度 PRP (0.21ml) を塗布した (それぞれ L-PRP 群, H-PRP 群)。これに platelet-poor plasma を吻合部に塗布した PPP 群と Control 群を加えて計 4 群 (各群 n=12) とした。完全静脈栄養 (ビタミン添加高カロリー輸液製剤, 151kcal/kg, 9mL/kg/h) にて 5 日間飼育した後、ABP および吻合部 HYP を測定した。

② in vitro の検討

伸展圧縮負荷細胞培養装置 ST-140 を用いて、線維芽細胞に対する mechanical loading の条件設定を行った。線維芽細胞を 48 時間 incubation した後、2 秒に 1 回、20% の伸展刺激を加え、signaling pathways (ERK, AKT, STAT3, p38 MAPK) の解析を Western blot 法にて行った。さらに、消化管結合組織の主要 collagen である type I・III の mRNA を RT-PCR 法にて検討した。

(2) 早期経口摂取の臨床応用

問題となる術前合併症がなく、右開胸・開腹・D2 以上のリンパ節郭清・高位胸腔内食道胃管吻合術を施行した胸部食道癌患者 26 人を対象とした。第 1 病日 (POD) 朝、覚醒、気管内挿管チューブを抜管、2POD にソフトダイエット摂取、3~4POD は消化態栄養剤・経口補水液 200~600ml 飲用、5POD に全粥食を開始し、10POD の退院 (退院の条件は全粥食 1/2 以上の摂取) を目標とするクリニカルパスを作成した。そのアウトカムを評価することにより、術後早期経口摂取の安全性と

feasibility, 全身的な回復速度を評価した。

4. 研究成果

(1) 早期経口摂取が上部消化管吻合部の創傷治癒を促進させる機序の解明

① in vivo の検討

4 群間で栄養学的な背景に差はなかった。EN 群, TPN+saline 群, TPN+water 群の ABP および HYP はともに TPN alone 群よりも有意に高値を示した (ABP; 214.6 ± 42 , 199.4 ± 36 , and 187.3 ± 29 versus 149.5 ± 49 mmHg; $P < 0.01$, HYP 63.5 ± 10 , 67.8 ± 13 , and 64.1 ± 14 versus 50.5 ± 12 mmol/g dry tissue; $P < 0.01$). つまり, 静脈栄養管理下でも, 栄養価のない生理食塩水ならびに蒸留水を胃瘻カテーテルから持続投与することにより, 空腸吻合部の創傷治癒が, 絶飲食下の静脈栄養管理に比べて, 有意に促進されることが明らかにされた。この結果は, 消化管吻合部の創傷治癒を促進するメカニズムには, 吻合部局所に対する栄養学的な効果ではなく, 栄養剤・経口補水液・水の摂取による mechanical loading が主として関与している可能を示唆した。

PDGF-BB, TGF- β 1 濃度は PRP 濃度依存性に増加した。L-PRP 群の ABP/HYP はともに他の群に比して有意に高く, 一方, H-PRP 群の ABP/HYP は有意に低値を呈した。すなわち, PRP は消化管吻合部の創傷治癒促進効果を有するが, その効果は bimodal effect であり, 低濃度は促進し, 高濃度では抑制することが明らかにされた。

② in vitro の検討結果

ERK は 10・20 分後, AKT は 10 分後に, STAT は 30 分後に, p38 MAPK は 10・20 分後に, それぞれ有意に発現しており, proliferation, differentiation, migration, survival に関する signaling が活性化されていることが確認された。さらに, collagen type I・III の mRNA が, 60 分で強発現していることが明らかとなった。すなわち, ラット胃から分離した線維芽細胞は, 2 秒に 1 回, 20% の伸展刺激に有意に応答し, 創傷治癒プロセスにスイッチが入ることが確認された。

以上を総括すると, 提唱した仮説のうち「消化管の蠕動運動促進」の部分を検証し得なかったが, Key となる仮説「早期経口摂取 (栄養剤, 電解質液, 水) →腸管壁の線維芽細胞に対する機械的刺激 (mechanical loading) →消化管吻合部におけるコラーゲン合成促進→消化管吻合部の創傷治癒促進」の大半を立証することができた (論文 1.)。また, 副次的に, 消化管吻合部の創傷治癒と血小板の関係を検討したが, PRP の効果が bimodal effect であるという新規の知見を得ることができた (論文 2.)。

(2) 早期経口摂取の臨床応用

全例で 4 病日 (経口摂取開始後 2 日後) までに排ガスがみられ, 25/26 例がクリニカルパスを完遂し, 術後早期経口摂取は安全であり feasible であることが実証された。クリニカルパス完遂例の在院日数は 9.2 ± 0.7 日, うち 4 例は 8 日で退院でき, 再入院は皆無であり, 退院日の設定については全員が満足と回答していた。すなわち, 早期経口摂取により消化管リハビリテーションを強化することによって, 全身的な回復が促進され, 早期退院が可能になったことが明らかにされた。手術の難易度が高く, 術後合併症も多い胸部食道癌術後において, 早期経口摂取が安全かつ feasible であることが実証したことは, 消化器外科医に大きなインパクトを与えることになった。特に第 64 回日本消化器外科学会総会ワークショップ (2009 年), 第 65 回日本消化器外科学会総会 ランチョンセミナー (2010 年) の講演において, 本研究の成果を基礎と臨床面から論じ, 上部消化管吻合術後の慣習的な絶飲食期間の撤廃を提言した。その結果, 早期経口摂取という新しい clinical practice の普及させる上で大きく貢献した。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Tadano S, Terashima H, Fukuzawa J, Matsuo R, Ikeda O, Ohkohchi N. Early postoperative oral intake accelerates upper gastrointestinal anastomotic healing in the rat model. J. Surg Res, 2010 Feb 4, Epub ahead of print. 査読有
2. Yamaguchi R, Terashima H, Yoneyama S, Tadano S, Ohkohchi N. Effects of Platelet-Rich Plasma on Intestinal Anastomotic Healing in Rats: PRP Concentration is a Key Factor. J. Surg Res, 2010 Nov 2, Epub ahead of print. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 寺島 秀夫. 消化管吻合術後の絶飲食期間は必要か? - 早期経口摂取は創傷治癒を促進する -, 第 65 回日本消化器外科学会総会 ランチョンセミナー 39, 2010.7.16 山口
2. Yamaguchi R, Terashima H, Yoneyama S, Tadano S, Ohkohchi N: Effect of platelet-rich plasma on gastrointestinal anastomotic healing in rats - PRP concentration is a key factor -, European Society for Surgical Research 45th Annual Congress, 2010.6.11 ジュネーブ (スイス)
3. 寺島 秀夫, 只野 惣介, 山口 龍志郎, 福沢 淳也, 松尾 亮太, 柳沢 和彦, 稲川 智, 大河内 信弘: 上部消化管吻

合術後の早期経口摂取は術後の回復を加速化する—理論的根拠とアウトカム、第64回日本消化器外科学会総会 ワークショップ 9-1、2009.7.16-18 大阪

4. Terashima H, Tadano S, Yamaguchi R, Fukuzawa J, Ohkohchi N. Fast track program accelerates short-term recovery after transthoracic esophagectomy with extended lymphadenectomy, 35th The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism Congress, 2008.9.6-13 プラハ (チェコ共和国)

[図書] (計1件)

1. 寺島 秀夫. 周術期の栄養管理2 (ERAS について), キーワードでわかる臨床栄養 改訂版 (大熊利忠・金谷節子編), 羊土社, in press, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺島 秀夫 (TERASHIMA HIDEO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師

研究者番号 : 10361338

(2) 研究分担者

大河内 信弘 (OHKOHCHI NOBUHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
教授

研究者番号 : 40213673

近藤 匡 (KONDO TADASHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
准教授

研究者番号 : 00375495