

主論文の要旨

**The effects of bevacizumab on intestinal
anastomotic healing in rabbits**

〔 ラビットモデルにおけるベバシズマブ投与が
消化管吻合部に及ぼす影響 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：椰野 正人 教授)

中村 勇人

【緒言】

Vascular endothelial growth factor(VEGF)に対するモノクローナル抗体であるベバシズマブ(BV)は、切除不能大腸癌だけではなく、術前治療にも臨床応用されつつある。術前BV投与は消化管吻合部の創傷治癒遅延を惹起し、術後縫合不全を増加させる可能性があると考えられているが、この根拠となる基礎的なデータはない。今回我々は、術前BV投与が術後消化管吻合部の創傷治癒に影響を与えるのかを動物実験で検討した。

【対象及び方法】

ウサギ(日本白色種、雄；2.5～3.0kg)20匹を Control 群 10匹、BV 群 10匹の2群に分けた。手術 1週間前に、Control 群は生理食塩水を静脈投与し、BV 群は BV 50mg/kg を静脈投与した(Fig.1)。それぞれ静脈投与 1週間後に小腸、及び結腸の2か所で切除吻合を施行。吻合は 5-0PDS* II®糸を使用し、全層 1層の単結節縫合 14～18針で行った。手術施行 1週間後、腸管吻合部において以下の項目について比較検討を行った。

[1. 物理的張力]

吻合部口側 5cm を切開し、腸管内容を取り除いた後にカテーテル(内径=2.2mm)の先端 1cm を腸管内に留置した。吻合部肛門側 5cm の部位で遮断後、2.5ml/min の速度で生理食塩水を注入し続け、リークした時点の腸管内圧を圧トランスデューサーにより記録し、この圧を物理的張力とした。測定後にウサギは犠牲死させた。

[2. 新生血管数]

腸管吻合部のパラフィンブロック薄切標本(試料)において血管内皮をCD31で免疫染色し、1吻合につき非連続の2切片をAperio CS ScanScopeでスキャンした。2切片から無作為に6～8視野(0.5 mm²/視野)を選出し、Aperio's vessel algorithmを用いて新生血管数を測定した。

[3. α 平滑筋アクチン(α SMA)の発現]

免疫組織学的検査とmRNA量の測定を行った。

試料にHE染色、及び α SMAの免疫染色を行い、任意の高倍率視野において α SMAの発現をスコア化した。

mRNA 発現量同定には Applied Biosystems 社の Prism™ 7300 sequence detection system®を用いて RT-PCR を施行した。

[4. コラーゲン沈着]

試料を HE 染色、及び Picrosirius Red で染色し、任意の高倍率視野においてコラーゲン沈着の程度をスコア化した。

免疫染色は、BOND-MAX autostainer を使用した。

吻合組織の α SMA、及びコラーゲン沈着のスコア化は、実験群を知らない2人の観察者が、以下の Ehrlich's modified 0-4 numerical scale に従ってスコア化した：0 no evidence、1 occasional evidence、2 light scattering、3 abundant evidence、4

confluent cells or fibers。

すべての統計解析は SPSS 22.0® softwareで行った。2群間比較は、正規分布であればStudent's t検定、非正規分布の場合はMann-Whitney U検定を用いた。p<0.05を有意差ありとし、データは平均±標準誤差で示した。

【結果】

[1. 物理的張力]

小腸では BV 群は Control 群に比べて有意に低値であった(Control 184±10mmHg vs. BV 140±9mmHg; p=0.004) (Fig.2B)。結腸では BV 群でやや低い傾向にあったが、有意差を認めなかった(p=0.291)。

[2. 新生血管数]

小腸、結腸ともに BV 群は Control 群に比べて有意に低値であった(小腸：Control 234±10/mm² vs. BV 181±23/mm²; p=0.023、結腸：Control 250±5/mm² vs. BV 167±6/mm²; p=0.008)(Fig.3A、B)。

[3. αSMA の発現]

αSMA のスコアは、小腸、結腸ともに BV 群の方が Control 群に比べて有意に低値であった(小腸：p=0.002、結腸： p=0.013)(Fig.4A、B)。αSMA の mRNA の発現は、小腸では BV 群は Control 群に比べて有意に低値であった(p=0.013)(Fig.4C)。結腸では BV 群でやや低い傾向にあったが、有意差を認めなかった。

[4. コラーゲン沈着]

コラーゲン沈着スコアは、小腸、結腸ともにBV群はControl群に比べて有意に低値であった(小腸：p<0.001、結腸： p<0.001)(Fig.5A、B)。

【考察】

本研究ではウサギを用いて実験を行った。これは、ヒト型モノクローナル抗体である BV がラットやマウスの VEGF には結合しないが、ウサギの VEGF には結合するからである。

吻合部の治癒評価に物理的張力の測定は特に有用である。本研究では、術後 7 日目に物理的張力を測定し、Control 群よりも BV 群で低値であった(Fig.2)。VEGF 関連シグナル伝達を介する血管新生は吻合治癒過程において中心的な役割を果たす。本研究は、術前 BV 投与が術後 7 日目の吻合組織の血管新生を阻害することを示した(Fig.3)。これは、治癒過程増殖期において BV が癌組織だけでなく、正常組織の新生血管も阻害する可能性があることを示唆している。

吻合組織における αSMA の発現は、免疫組織学的検査、及び mRNA の両方で Control 群より BV 群において低値であった(Fig.4)。これは、術前 BV 投与が αSMA 陽性の分化筋線維芽細胞数を減少させることを意味している。筋線維芽細胞は、創収縮のための最も重要な細胞であり、コラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク質の合成や修復に関与する。本研究では、BV 群における吻合組織のコラーゲン沈着は低値であ

った(Fig.5)。腸管吻合の治癒はコラーゲンの合成と分解により完成されていくことから、吻合組織における α SMA陽性の分化筋線維芽細胞の減少は、腸管吻合の治癒に悪影響を与えると推測される。これらの結果は、Control群と比較して、BV群で低値であった腸管の物理的張力の結果を支持するものと考えられる(Fig.2)。

BVに対するウサギVEGFの親和性は、ヒトVEGFの親和性と比べて1/5~1/8程度と弱い。したがって、本研究で使用したBV(50mg/kg)の投与量は、通常大腸癌患者に使用される(5~10mg/kg)量よりも高く設定した。さらに、ウサギにおけるBVの半減期は、ヒト(3週間)よりもはるかに短い5.52日であると報告されている。本研究では、BV投与から手術までの期間を1週間としたが、この期間はヒトに換算して約3~4週間に相当する。The National Comprehensive Cancer Network(NCCN)ガイドラインは、術前BV投与と待機的手術との間に少なくとも6週間(BVの半減期の2倍に相当)の休薬を推奨している。本研究で得られた結果は、NCCNガイドラインの休薬期間を支持するものであると思われる。

【結論】

我々の研究は、術前BV投与がウサギの腸管吻合組織の治癒過程において血管新生を阻害し、 α SMAの発現、及びコラーゲン沈着を減少させることを実証した。BVの術前使用は、術後消化管吻合部の創傷治癒遅延を引き起こす可能性が示唆された。