

原 著

放射線照射 (CO⁶⁰) の食道創傷治癒に及ぼす 影響に関する実験的研究

防衛医科大学第2外科

島 伸 吾 杉 浦 芳 章
米 川 甫 尾 形 利 郎

防衛医科大学第1生化学

松 山 重 雄

AN EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECT OF IRRADIATION (CO⁶⁰) ON WOUND HEALING OF THE ESOPHAGUS

Shingo SHIMA, Yoshiaki SUGIURA, Hajime YONEKAWA and Toshiro OGATA

The 2nd Department of Surgery, National Defense Medical College, Tokorozawa, Shigeo
Matsuyama The 1st Department of Biochemistry, National Defense Medical College

雑種成犬22頭の頸部食道に CO⁶⁰ を1回 300rad 週3回に分割照射を行い、合計 3000rad と 6000rad の照射群を作り、照射終了後2週目に照射野内の食道を1cm 切除し、断端を Olsen 型1層吻合を行い、術後2週目に全例屠殺剖検し非照射群と比較検討した。縫合不全発生率は非照射群18例中1例(5.6%) 3000rad 照射群は9例中1例(11.1%)と有意差はなかったが、6000rad 照射群は7例中5例(71.4%)と前2者との間に有意差を認めた。3000および6000rad の照射を行うと組織内 hydroxyproline 量はそれぞれ70%と85%に減少する。しかし吻合後2週目では増加の傾向が認められたが非照射群より低値であった。病理組織学的変化は主に粘膜下層に浮腫を中心に強い反応が認められた。

索引用語：放射線照射 (CO⁶⁰)、創傷治癒、食道吻合、Hydroxyproline.

I. 緒 言

現在食道癌に対する術前照射はかなり広く実施されており、照射方法、適応などについても既に数多くの研究が報告されている。

支配リンパ節領域を含めた放射線治療と手術の協力という意味では、手術時 en-block resection の困難な上縦隔、および頸部を含むいわゆる Long T の照射野は局所病巣に対する併用療法のありかたとして合理性があるといえる。

しかし、この照射野で術前照射を行った場合、吻合に使用される頸部食道が照射野に含まれるため吻合部の縫合不全がもっとも懸念される。

そこで成犬の頸部食道に放射線照射をおこない、照射の創傷治癒に及ぼす影響を実験的に検討した。

II. 実験方法

体重 10~15kg の雑種成犬22頭を使用し、ネブタール麻酔下で、図1に示すごとく犬の頸部食道を中心に CO⁶⁰ を 5×12cm の照射野で、1回 3000rad の1門照射を隔日に週3回行い、合計 3000rad 照射群と 6000rad 照射群を作った。この期間犬は固形の dog food で飼育された。照射終了後、待期間14日において、ネブタール 25mg/kg の静注麻酔下で気管内挿管し、レスピレーターで呼吸管理をしながら、照射野内に含まれる頸部食道をできるだけ周囲組織を損傷しないように約5cmの長さ露出し、中央の1cmを標本として切除し、両断端を針つき3号絹糸を用いて、図2に示すような Olsen 型1層吻合を結節縫合で行った。術後1日目より1週間は粉末ピクシリン 1g を混

図1 ネンブータル麻酔下に犬の頸部に5×12cmの照射野でCO⁶⁰を1門照射している。

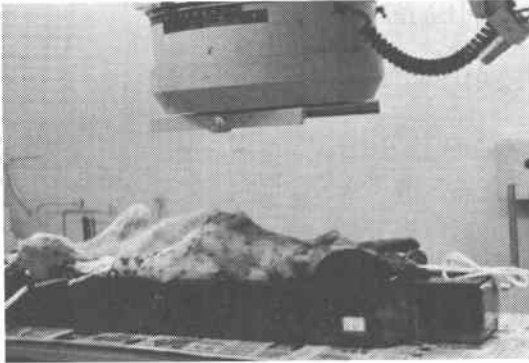
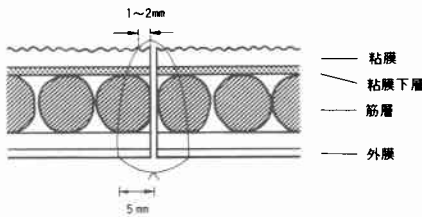


図2 Olsen型1層吻合の模式図

外膜より針を斜めに刺し粘膜は浅くとり創面を出るだけ合わせる様にする。

吻合方法 (Olsen型)



ぜたミルクを朝夕投与し、その後は普通の固形食で飼育した。術後14日目に全例屠殺剖検した。

III. 検査法

A. 肉眼所見

剖検時、肉眼所見により縫合不全の有無、粘膜面の癒合の程度および縫合線を中心としたビランや潰瘍の有無を検討した。

B. 組織内 hydroxyproline 量の測定

切除標本の一部を-30°Cに冷凍して検体を保存し、集った検体を同時に定量した。まず検体の一部を100~500mg 秤量し、これを細片にしたのち、5酸化リンにて24時間減圧乾燥し、10~50mg に秤量しなおし、6N 塩酸 2ml に混じ oil bath 110°C で20時間加水分解後、減圧乾燥を行った。これを2~3回蒸留水で水洗後、pH2.2のクエン酸 buffer で希釈し、JEOL (6-AS) Amino 酸分析機で定量した。

C. Microangiography

6頭に剖検時、ヘパリン加生食水による全身灌流後、硫酸バリウムを注入し、microangiographyを行い、食道を摘出し、ソフテックスで軟線撮影を行い、食道

- ① Epithelial alteration
- ② Submucosal layer
 - Ⓐ edematous change
 - Ⓑ hyalinization of connective tissue
 - Ⓒ abnormal fibroblast
 - Ⓓ teleangiectasia
 - Ⓔ hyaline degeneration of vessel walls
- ③ Change in muscle fibers

図3 CO⁶⁰照射が食道組織に及ぼす影響に関し病理組織学的検討項目

表1 縫合不全発生頻度

縫合不全 Olsen型 1層吻合		⊖	⊕	発生率
非照射		17	1	5.6%
照射	3000 rad	8	1	11.1%
	6000 rad	2	5	71.4%*

* P<0.025

の末梢血管、および新生血管の状態について検討した。

D. 病理組織学的検討

手術、および剖検時に採取した標本をホルマリン固定後、Hematoxyline-Eosin 染色, Azan-Mallory 染色, Elastica-Vangieson 染色, PAM 染色を行い、図3に示す検査項目について、対照群と対比して検討した。

IV. 実験結果

A. 22頭の雑種成犬に照射を行い、内6頭が照射中に全身衰弱により死亡し、9頭に3000rad, 7頭に6000radの照射が行われた。照射が終了した犬は全例手術を行った。6000rad照射例の中には縫合不全が5頭に発生し、創より滲出液の排出を見た。しかし1頭を除き残り全例は術後2週目に屠殺剖検できた。この1頭は術後12日目に全身衰弱で死亡し、剖検で吻合部が完全に離開していたことが確認された。

B. 肉眼所見

剖検時の縫合不全発生率は表1のごとく、3000rad照射群では9例中1例(11.1%)、6000rad照射群では7例中5例(71.4%)に認められた。なお、対照として行なった非照射群では18例中1例に縫合不全が発生した(5.6%)。3000rad照射群では対照群との間に有意差を認めなかったが(P<0.75)、6000rad照射群では対照群(P<0.005)、および3000rad照射群(P<0.025)との間に統計学的に有意差を認めた。

図4 非照射例の吻合術後14日目の吻合部粘膜面。癒合が完了し上皮が再生している。

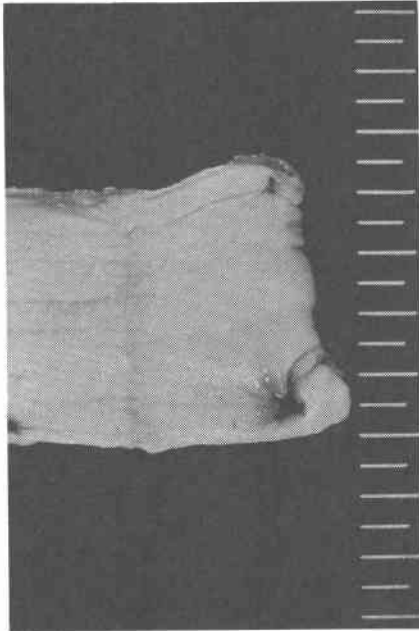
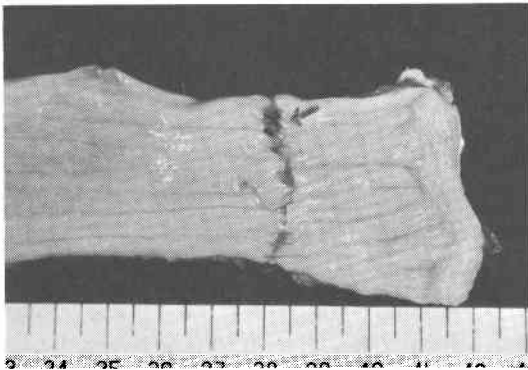


図5 3000rad 照射例の吻合後14日目の粘膜面、矢印の部は縫合糸が露出し潰瘍となっているが、穿孔は認められない。



粘膜面を見ると、非照射例では図4 に示すようにほぼ全周にわたり修復が完成されている。3000rad 照射群では図5 に示すように、非照射例に比し、縫合線の所々に粘膜の離開を認め、縫合糸の露出が認められる。しかし粘膜下層はほぼ完全に癒合しており、1例に深い潰瘍を認めるのみであった。6000rad 照射例では6例中2例に、図6 に示すような幅広いビラン面があり、中央に穿孔を認めた。他の4例においても粘膜面は全く癒合していず、粘膜下層がわずかに癒合して

図6 6000rad 照射例の術後14日目の吻合部粘膜面、中心に穿孔を認め吻合線にそって幅広いビランがある。

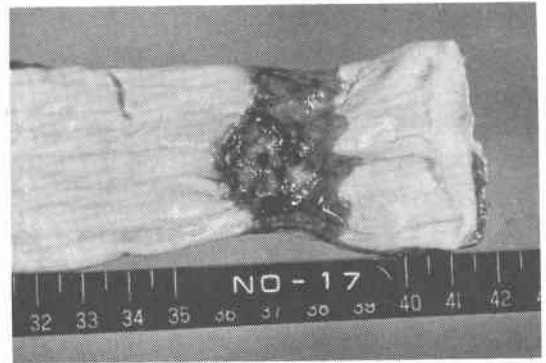


表2 Hydroxy proline 測定値

Hy-pro 量	($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight)	
	術中標本中	剖検標本中
Control n = 4	45.4 ± 2.9	52.2 ± 3.1
3000rad n = 9	32.1 ± 6.4	44.8 ± 7.5
6000rad n = 7	38.6 ± 10.9	47.7 ± 6.3

mean ± std. dev.

いる程度で、剖検中の弱い張力で完全に離開したものが2例あった。

外膜面を見ると、6000rad 照射例では縫合不全に伴う膿瘍のためか、外膜および筋層が薄くなっていた。しかし3000rad 照射群や非照射群の縫合不全ではむしろ外膜が肥厚し、周囲との癒着が強く、組織反応に相違が認められた。このことは6000rad 照射による組織反応の低下を示しているように思われた。

C. Hydroxyproline 量 (以後 Hypro と略す)

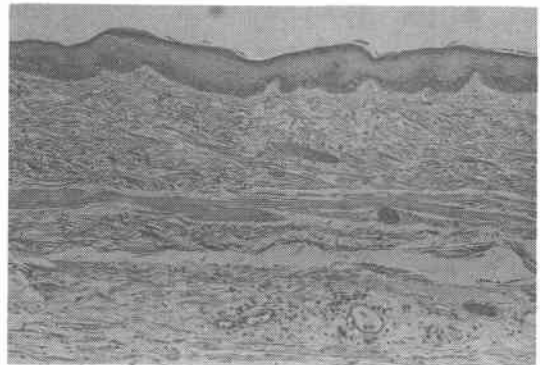
表2 に示すごとく、検体材料をすべて乾燥して、1mg 中の Hypro 量で比較検討した。対照群は4頭、3000rad 群は9頭、6000rad 群は7頭である。術中標本と同一犬の剖検時標本の比較は paired T test で、対照群、3000、および6000rad 照射群間の比較は unpaired T test で統計処理を行った。非照射群における手術時標本の Hypro 量は $45.4 \pm 2.9 \mu\text{g}/\text{mg}$ (mean ± S.D. 以下同じ) で、2週後の剖検時には $52.2 \pm 3.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ と15% の上昇を認めた ($P < 0.05$)。3000rad 照射群では術中標本の Hypro 量は $32.1 \pm 6.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ と対照群の70%

に低下していた(P < 0.01)。剖検時には 44.8 ± 7.5 μg/mg で40%の上昇を認めた (P < 0.01)。しかしこの3000rad 照射群の剖検時標本の Hypro 量は対照群の剖検時標本の86%にあたり、両者間には有意差はなかった(P < 0.1)。6000rad 照射群では、術中標本に 38.6 ± 10.9 μg/mg の Hypro が含まれており、これは対照群の85%とやや低値ではあったが、有意差はなく(P < 0.1)。3000rad 照射群の手術時標本との間にも有意差はなかった。6000rad 照射群の剖検時の Hypro 量は 47.7 ± 6.3 μg/mg と手術時に比し24%の増量があった (P < 0.1)が、対照群、3000rad 照射群の剖検時標本と比較し、両者ともに有意差はなかった。以上のように3000、および6000rad の照射を行うと、Hypro 量は低下するが、術後2週間目には術前に比しかなり増加している。しかし増加したとはいえ対照群に比べるとその絶対値はなお低値にとどまっていた。

D. 病理組織学的検討

照射の影響について、手術時切除した標本に関し、図3に示す項目について病理組織学的検討を行った。その変化の程度を3段階に分け、変化なしを(-)、軽度の変化(±)、中～強度の変化(+)として、表皮、粘膜下層、および筋層に分けて検討した。さらにこの変化と縫合不全の関連を表3にまとめて見た。3000、および6000rad を照射しても筋層には殆んど変化は認められなかった。表皮の変化は全体として軽度であり、3000rad 照射で2例、6000rad 照射で2例に中等度の変化、とくに基底膜の乱れが認められた。縫合不全との関連で見ると、表皮の変化が強いものに縫合不全の発生が多い傾向が認められた。図7に示すごとく照

図7 6000rad 照射後手術時摘出食道の組織像 HE 染色



射の影響がもっとも強い粘膜下層では、3000rad 照射群8例中6例に浮腫を認め、浮腫の強かった1例に縫合不全を認めた。6000rad 照射群では7例全例に浮腫を認め、縫合不全の発生率も高かった。結合織の硝子化に関しては、3000rad 照射では(-)～(±)のものが多かったが、6000rad 照射すると、ほぼ全例に高度な硝子様変化が認められた。線維芽細胞の出現は3000と6000rad 照射の間にあまり差はないが、やや6000rad 照射に多い傾向がみられた。照射による影響が強いとされている血管壁の変化について、特殊染色も合わせて検討したが、病理組織学的には著変を認めることができず、わずかに軽度な血管壁の硝子化を認めるにとどまり、3000と6000rad の照射量による差は認められなかった。

剖検時の標本はもっとも良く治癒している所で切片を作り検討した。対照群では粘膜も完全に癒合しており、吻合部の炎症所見も少なく、創傷治癒が完成に近い像と思われた。図8は3000rad 照射例の吻合部のHE染色像であるが、粘膜面に潰瘍を認めるものは少なく、炎症細胞の増加は中等度であり、線維芽細胞の増生も中等度であった。一方6000rad 照射例ではもっとも治癒傾向の強い部分の切片でも6例中5例に潰瘍を認め、潰瘍周囲にはビランがあり、小円形細胞浸潤が著明で、線維芽細胞の増生も3000rad 照射例に比し明らかに強かった。

E. Microangiography

2頭ずつに microangiography を行ったが、6000 rad 照射群では、1例は縫合不全例であり、他の1例は標本摘出時わずかな張力で吻合部が完全に離開したため、比較検討はできなかった。非照射例と3000rad 照射例を比較して見ると、図9に示すごとく、非照射例

表3 照射後手術時摘出標本における対照群との比較数字についての○印は症例中半数以上に変化の認められた群。

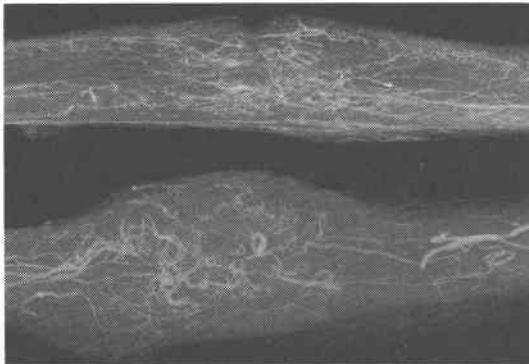
病理組織学的変化

照射量	縫合不全	変化の程度	粘膜下層の変化					筋層の変化	
			表皮の変化	浮腫	fibroblast proliferation of connective tissue	abnormal fibroblast	extracellular matrix		collagen degeneration in vessel wall
3000 rad	+	⊖	0	0	0	0	0	0	1
		±	0	0	0	0	1	0	0
		+	①	①	①	①	0	①	0
	-	⊖	3	2	3	2	5	2	7
		±	3	3	4	3	2	2	0
		+	1	2	0	2	0	3	0
		+	0	0	1	0	4	2	5
6000 rad	+	⊖	3	2	0	1	1	2	0
		±	2	③	④	④	0	1	0
		+	2	0	0	1	1	2	2
	-	⊖	0	1	0	0	0	0	0
		+	0	①	②	①	①	0	0

図8 3000rad 照射例, 吻合後2週目の吻合部の組織像, HE染色, 吻合部は上皮におおわれているが, 縫合糸を中心に中等度の炎症所見が認められる。



図9 吻合部の microangiography 像。上は 3000rad 照射例の吻合後2週目の吻合部, 下は非照射例の吻合後2週目の吻合部。



では新生血管も多く, とくに粘膜下層に太い血管が認められるが, 3000rad 照射例では多くの血管新生を認めるが, 粘膜下層では少なく, 再交通している血管も細く数も少ない傾向を示した。

V. 考 察

食道癌の治療に関し近年手術死亡率の低下など, 短期間の成績は改善されてきたが, 再発などのため, 遠隔成績はかならずしも良くなっているとは言えない。対策の1つとして葛西¹⁾は上縦隔の後照射が再発防止

に有効であることを示した。このことは放射線治療が手術で郭清が困難である上縦隔や頸部リンパ節転移に対して有効であることを示していると思われる。そこで我々は進行食道癌の術前照射として上縦隔頸部にも照射野をひろげることを考えたが, このような広範囲に照射を行う場合副作用が問題となる。その1つとして照射野内に含まれた頸部食道で吻合が行われる場合, 創傷治癒過程がどのような影響を受けるかを知る必要がある。

実験に際し大きな問題は臨床と同様に分割照射を行うか, 一回の大量照射で行うかの選択で, 過去の実験の多くは一回照射で行われていたが, 今回はできるだけ臨床に近い条件設定をするため分割照射を行った。

放射線照射の組織に対する影響に関しては種々の検討が行われ, 食道は比較的放射線障害の少ない臓器と考えられている。反対に扁平上皮癌が多い食道癌は放射線感受性が高い性質がありこの2つが相加されて食道に対する放射線治療, および術前照射はかなり以前より行われてきた。Jennings²⁾, や Phillips³⁾は一回の大量照射を行うと, 食道粘膜は比較的放射線感受性が高く, 10~20日間にもっとも強い反応を起し, 照射量によっては壊死となるが, 食道粘膜は turn over が早いので3週目には急速に再上皮化するので, 結局は抵抗性が高い臓器と考えてよいと言っている。一方我々の分割照射では3000, および6000rad 照射後2週目の標本でも表皮における変化は殆んど認められない点, 分割照射と大量照射の相違と考えられる。さらに粘膜下層に関しては Jennings は早期には浮腫のみの変化であるが, ややおくれて fibrosis が強くなり, これが食道狭窄をきたすものと考えている。筋層には変化は少ないと両者とも報告している。われわれの分割照射でも粘膜下層, 筋層の所見は同様であったが, Seaman⁴⁾は肺癌の臨床例で縦隔病変に対し照射を行い食道狭窄をきたし, 切除した標本の食道筋層にもっとも強い fibrosis を認め, 照射は筋層に強い影響を与えていると言っている。Seaman の報告は臨床例で, 照射法は我々の実験同様分割照射であるが, 筋層の fibrosis は進行食道癌で術前照射のため癌細胞の死滅後に線維で置換された例を経験していることより, Seaman の指摘している fibrosis も類似したものではないかと考える。

放射線照射が創傷治癒に及ぼす影響に関する実験は小腸, および大腸で行われたものが多く, 食道に関するものはまだ報告されていない。腸管に対する影響と比較してみると, 腸管は放射線に抵抗性が低く, 毛細血管の狭窄や拡張, 壁の透過性の亢進などが照射3時

間後より現われ、3日目をもっとも強いとされている⁵⁾。Dirksen⁶⁾も臨床例で病理学的変化は主に細小動脈、リンパ管の閉塞が原因となって初期に表皮、粘膜下層、vasoconnective tissueに変化が現われ、表皮は再生されるが、endarteritisの変化、粘膜下層のfibrosisは徐々に進行する一方筋層の変化はもっとも少いといっている。このような状態で手術を行うと合併症の発生が多くなると報告している著者も多い⁷⁾。最近庄司⁸⁾は照射が結腸の創傷治癒に及ぼす影響についてくわしく報告している。耐圧試験、microangiography、およびhydroxyproline量の測定などより見て、創傷治癒は遅延しているが、縫合不全に到るものはなかったとしている。ただ庄司の実験は1000rad 1回照射で行われており、これはEllisの式によれば、2000~2500radの分割照射に相当し、この程度の術前照射では縫合不全はおきないということを意味している。われわれの実験でも3000radの照射では対照群に比し縫合不全の発生率に関し有意差はなく、同様の結果をえている。

縫合法の実験において1つの指標とされているhydroxyproline量に関し、照射の影響を検討したものは少ないが、Bowes¹⁰⁾は大量照射を行うとhydroxyprolineは約20%減少するとしている。われわれの実験では3000rad照射では30%の減少を、6000rad照射では15%の減少を認めた。3000rad照射の方が6000rad照射より大きな減少をきたした点に関し今後さらに検討する必要があると思われる。照射後の吻合実験でhydroxyproline量を測定したものは庄司の実験のみであり、これと比較してみると、colonのGambee 1層吻合では、照射群、対照群ともに1週間は低下しており、2週目で術前量にもどるが、照射群では3週目にさらに増量するとしている。われわれの使用したOlsen型1層吻合では、2週後のみの測定であるが対照群、および照射群ともに明らかな増加を認めていた。Olsen型1層吻合の経時的hydroxyproline量の増減に関しては、第11回消化器外科学会で牛島¹¹⁾が発表しているが、術後1週目がpeakとなり、2週後ではすでに低下傾向を示している。一方A-L吻合や層々吻合では、2週後もなお増加傾向を示したと報告している。このようにOlsen型吻合では2週後は減少期となっており、照射という条件が加わった場合にもこれがあてはまるかどうか疑問であり、今後経時変化の検討が必要である。

最後に照射による組織学的変化は、毛細管レベルで著明であるとの報告は多いが、われわれの実験における光顕レベルの所見では、種々の特殊染色にもかかわ

らず、有意差を証明することはできなかった。ただmicroangiographyで血管再生が少なく、吻合部の交通枝の発達が悪いことが認められた。

VI. 結 論

1. 正常食道に3000および6000radの照射を行い、照射野内の食道に吻合実験を行ったところ、縫合不全の発生率で3000rad照射は非照射群とかわらず、6000rad照射を行うと明らかに縫合不全の発生率が高いことがわかった。

2. 食道に分割照射を行うと表皮と筋層には殆んど変化をおこさず、粘膜下層が浮腫を中心に強い反応を示し、反応の強いものに縫合不全が発生し易かった。

3. 食道に3000rad、6000radの分割照射を行うと照射終了後2週目の組織内hydroxyproline量は両群とも明らかに減少する。しかし吻合後2週目では両群とも増加傾向が認められたが対照群の絶対値よりはいづれも低値を示した。

文 献

- 1) 葛西森夫：食道癌の外科的治療—成績向上の道程。日外会誌，81：845—853，1980。
- 2) Jennings, F. et al.: Acute radiation effects in the esophagus. Arch. Path., 69: 407—412, 1961.
- 3) Phillips, Th. L. and Margolis, L.: Radiation pathology and the clinical response of lung and esophagus. Front. Radiat. Ther. Onc., 6: 254—273, 1972.
- 4) Seaman, W.B. and Ackerman, L.V.: The effect of radiation on the esophagus. Radiology, 68: 534—541, 1957.
- 5) 藤原寿則：正常組織に対する放射線の作用，4，小腸毛細血管に対する作用。日放会誌，30：70—74，1970。
- 6) Dirksen, P.K. et al: Complications following operation in the previously irradiated abdominal pelvic cavity. Am. Surg., 43: 234—241, 1977.
- 7) Schrock, T.R. et al: Factors contributing to leakage of colonic anastomoses. Ann. Surg., 177: 513—519, 1973.
- 8) Deveney, C.W. et al Surgical management of radiation injury of the small and large intestine. Dis. Col. & Rect., 19: 25—29, 1976.
- 9) 庄司宗弘：放射線 (CO⁶⁰) 照射の結腸縫合創治癒に及ぼす影響に関する実験的研究。日消外会誌，13: 406—419, 1980。
- 10) Bowes, J.H. and Moss, J.A.: The effect of gamma radiation on collagen. Rad. Res., 16: 211—223, 1963.
- 11) 牛島康栄他：食道再建における吻合法の再検討。日消外会誌，11: 345, 1978。