日消外会誌　27（1）：56～61，1994年

開腹術後の癒着と線溶系酵素の変動
―とくに局所でのプラスミノーゲンアクチベーター活性の変動について―

山形大学第1外科
小林　昌明　　松本　　修　　亀山　仁一　　塚本　　長

術後の腹膜癒着と線溶系酵素活性の変動についてSD系雄性ラットを用い実験的に検討した．まず癒着作製手術を施行し，血漿tissue plasminogen activator（t-PA）活性，plasminogen activator inhibitor-1（PAI-1）活性，癒着局所でのt-PA活性をみるため腹腔洗浄液上澄みの中のt-PA活性の変動を調べた（各群n＝10）．血漿t-PA活性は術前に比べとくに変化はみられなかった．血漿PAI-1活性は術後早期に術前と比べ上昇傾向にあった．腹腔洗浄液上澄み中のt-PA活性は術前に比べ24時間をピークとして有意に上昇（$p<0.01$）することが明らかとなった．単開腹術を施行し，漿膜損傷，血液貯留の影響による腹腔洗浄液上澄み中のt-PA活性の変動を調べると（各群n＝6），術後早期で漿膜損傷群（$p<0.01$）で，コントロール群に比べ低値を示した．術中の臓器愛護は局所のt-PA活性からみても癒着防止に有効であると考えられた．

Key words：postoperative changes in plasminogen activator activity, plasminogen activator activity in peritoneal lavage fluid, peritoneal adhesion

I．はじめに

術後の腹膜癒着による腸閉塞は，われわれ外科医にとって難渋する問題である．癒着の機序については線維素の析出過多，線溶系酵素の不足によるものであるとの考え方が主流である．すなわち漿膜損傷によるフィブリンの析出過多，血液凝固によるフィブリンの産生，多核白血球やマクロファージによる吸収不足，線溶系酵素の不足によるフィブリンの溶解不足[1)2)]などがあげられており，癒着防止法についても，線溶系酵素の不足を補う観点からurokinase（以下，u-PAと略記）[2)3)]や，近年tisse-type plasminogen activator（以下，t-PAと略記）[4)5)]により癒着を防止した報告もみられる．

しかし術後の線溶系酵素の推移については，血漿中[6)]漿膜組織中[2)]腹腔侵出細胞培養上清中[7)]の報告が散見されるのみである．そこで今回術後における線溶系酵素の推移を知るために，血漿中および局所として腹腔洗浄上澄み中の線溶系酵素活性の変動について実験的に検討し，また手術侵襲の程度や開腹時間，残留血液の線溶系に及ぼす影響についても検討を加えた．

＜1993年10月13日受理＞別刷請求先：小林　昌明
〒990-23　山形市飯田西2－2－2　山形大学医学部第1外科

II．実験方法

実験動物は体重200～300gのSD系雄性ラットを用い，飼料はCRF1（オリエンタル酵母社製）を用い14時間明所で10時間暗所でケージに入れ飼育し，以下の目的でそれぞれ実験を行った．

実験1　術後の腹腔内癒着の有無の検討（癒着作製手術の作製）

（1）ラットをエーテル麻酔下に正中切開にて開腹し盲腸を創外に出し，大気中で乾燥させ15分後に腹壁を2層に閉じる手術（以下，単開腹術Iと略記。）．（2）ラットをエーテル麻酔下に正中切開にて開腹し盲腸を創外に出し，ガーゼにて100個擦過，左右の壁側腹膜を1×1cmメスにて擦過する開腹時間15分の手術（以下，癒着作製手術と略記）を施行し7日後に屠殺後，開腹し（1）（2）の癒着の頻度を判定した．その方法は肉眼的に（A）腹壁―盲腸間，（B）腫壁―盲腸以外の腹腔内臓器間，（C）盲腸―盲腸以外の腹腔内臓器間の癒着の有無を調べた．癒着の程度の判定は行わなかった．（各群n＝10）．

実験2　術後の血中での線溶系酵素の変動

癒着作製手術を施行し術前，術後6，24，48，72，

168時間に，尾静脈より0.5ml採血し血漿t-PA活性，plasminogen activator inhibitor-1（以下，PAI-1と略記）活性を測定した．t-PA活性の測定はBiopool社製Spectrolyse™/fibrinを用いた．この測定系はグルプラスミノーゲンをプラスミン（以下，Pmと略記）に変換することのできる活性値を，PmがD-But-CHT-Lys-パラニトロアニリドをfreeパラニトロアニリドに変換することを利用し，freeパラニトロアニリドが呈する黄色（OD 405nm）を吸光度計にて測定した[8)9)]．一方，PAI-1活性は既知濃度のt-PAと試料とを混合して一定時間37℃にて反応させたときの呈色反応を用い，PAI-1の阻害活性を算出した[10)]．またt-PA活性測定時は採取時および凍結保存時に全例acid treatmentを行った（n＝10）．

実験3　術後の局所の線溶系酸素の変動

癒着作製手術を施行し術前，術後6，24，48，72，168時間に，エーテル麻酔下に腹腔内に20mlのphosphate-buffered saline（以下，PBSと略記）を注入し洗浄，30分後にエーテルにて屠殺後PBSを回収し，1,000Gにて10分間遠心しその上澄み（以下，腹腔洗浄液上澄みと略記）のt-PA活性を測定した．その測定は，変動の推移をみることを目的とし，それぞれの実験系において値が標準曲線の上に位置するように，希釈率，反応時間を実験ごとに変えて測定した（各時間においてn＝10）．

実験4　手術の種類（癒着の多少）による術後の血中での線溶系酵素の変動

単開腹術Ⅰおよび癒着作製手術を施行し術後6，12，24，36時間に，血漿t-PA，PAI-1活性を測定した（各群n＝6）．

実験5　手術の種類（癒着の多少）による術後の局所での線溶系酵素の変動

単開腹術Ⅰおよび癒着作製手術を施行し術後6，12，24，36時間に，腹腔洗浄上澄み中のt-PA活性を測定した（各群，各時間においてn＝6）．

実験6　開腹時間による術後の局所での線溶系酵素の変動

単開腹術Ⅰおよび正中切開にて開腹し盲腸を創外に出し，自然に乾燥させ45分後に腹壁を2層に閉じる手術（以下，単開腹術Ⅱとする．）を施行し，両群について，術前，術後6，24時間で腹腔洗浄液上澄み中のt-PA活性を測定した（各群，各時間においてn＝6）．

実験7　血液貯留による術後の局所での線溶系酵素の変動

単開腹術Ⅰを施行し，以下の2群について術前，術後6，24時間で腹腔洗浄液上澄み中のt-PA活性を測定した．コントロール群は術中尾静脈より0.5ml脱血し，生食0.5mlを閉腹時に腹腔内に注入した．自家血注入群は術中尾静脈より0.5ml採血し，その血液を閉腹時に腹腔内に注入した（各群，各時間においてn＝6）．

測定値はそれぞれ，平均値および標準偏差を求め，等分散検定を行い，等分散の場合はt-検定，等分散でない場合はWilcoxonの順位和検定を用いた．また癒着の有無に関してはχ^2検定を用い，いずれも$p<0.05$をもって有意差とした．

III. 結　果

実験1　単開腹術Ⅰ群では全体で40%（4/10）に癒着を認め，（A）10%（1/10），（B）40%（4/10），（C）0%であった．一方癒着作製手術群では全例に癒着が生じており，その癒着の頻度は（A）80%（8/10），（B）70%（7/10），（C）90%（9/10）であった．

癒着作製手術は，単開腹術群Ⅰに比べ有意に癒着が多かった（**Table 1**）．

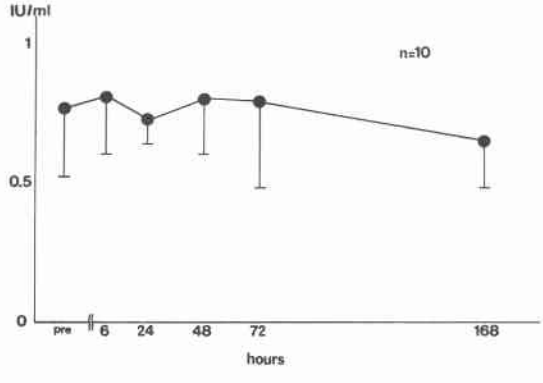
実験2　血漿t-PA活性は，術前～術後168時間（7日）においてはとくに変化を示さなかった（**Fig. 1**）．

Table 1　Adhesion incidence in models

area of adhesion	EL	PAO
（A）abdominal wall-cecum	1/10	8/10
（B）abdominal wall-organs	4/10	7/10
（C）cecum-organs	0/10	9/10
adhesion（＋）*	4/10	10/10

EL : exploratory laparotomy.　　*$p<0.05$
PAO : peritoneal adhesion operation.

Fig. 1　Postoperative changes in plasma t-PAA (mean±SD).



術後の血漿PAI-1活性は術前に比べ術後6時間から術後168時間まで，高い傾向があったが有意差はなかった（**Fig. 2**）.

実験3　術後の腹腔洗浄液上澄み中のt-PA活性は，2倍希釈反応時間3時間にて吸光度を測定したが，非手術時0.112A，術後6時間0.408A，術後24時間0.903Aと有意に上昇し，その後徐々に低下し，術後168時間では0.106Aと術前値に復した（**Fig. 3**）.

実験4　単開腹術I群と癒着作製手術群間で術後早期の血漿t-PA活性，PAI-1活性を比較したがとくに差異は認められなかった（**Fig. 4-1, 2**）.

実験5　単開腹術I群と癒着作製手術群間で術後早期の腹腔洗浄液上澄み中のt-PA活性を比較すると，術後6，12，24時間で癒着作製手術群に比べ，単開腹術I群が有意に高値であったが，36時間では両群間で差を認めなかった（**Fig. 5**）.

実験6　単開腹術I群と単開腹術II群で術後早期の腹腔洗浄液上澄み中のt-PA活性を比較するとt-PA活性は術後6時間では単開腹術II群に比べ単開腹術I群が有意に高く24時間でも高い傾向にあった（**Fig. 6**）.

実験7　コントロール群と自家血注入群で術後早期の腹腔洗浄液上澄み中のt-PA活性を比較すると術後6時間では変化はなく，24時間で自家血注入群に比べ

Fig. 2　Postoperative changes in plasma PAI-1 activity (mean±SD).

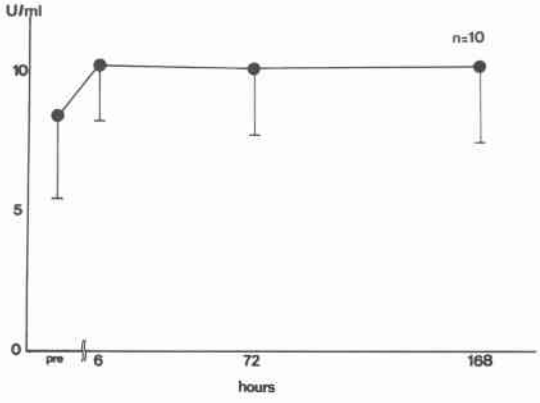


Fig. 3　Postoperative changes in t-PAA of supernatant of peritoneal lavage fluid (mean±SD). Fluid was diluted 1：4 and incubated 3 hours at 37℃.
＊：p<0.01 vs pre

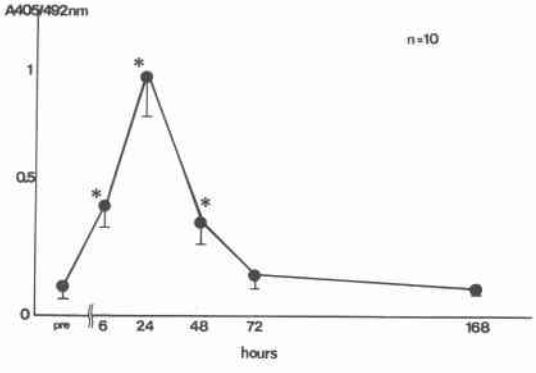


Fig. 4-1　Postoperative changes in plasma t-PAA at 6, 12, 24, 36 hours (mean±SD).
EL：exploratory laparotomy. PAO：peritoneal adhesion operation.

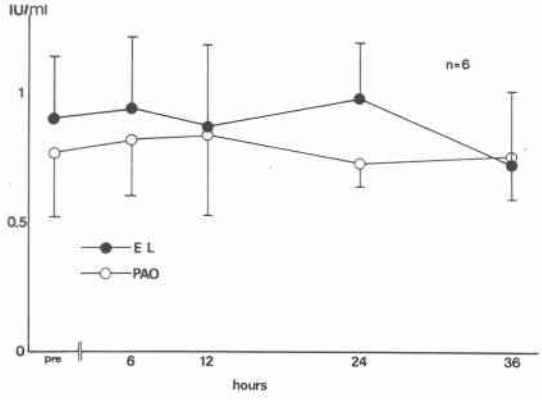


Fig. 4-2　Postoperative changes in plasma PAI-1 activity at 6, 36 hours (mean±SD).
EL：exploratory laparotomy. PAO：peritoneal adhesion operation.

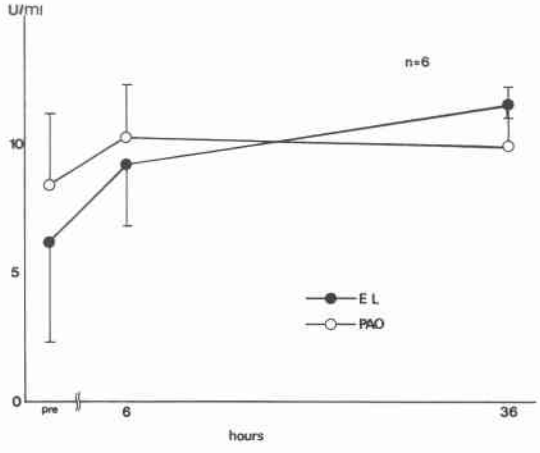


Fig. 5 Postoperative changes in t-PAA of supernatant of peritoneal lavage fluid (mean±SD). Fluid was diluted 1 : 2 and incubated 3hours at 37℃.
EL: exporetory laparotomy. PAO: peritoneal adhesion operation.

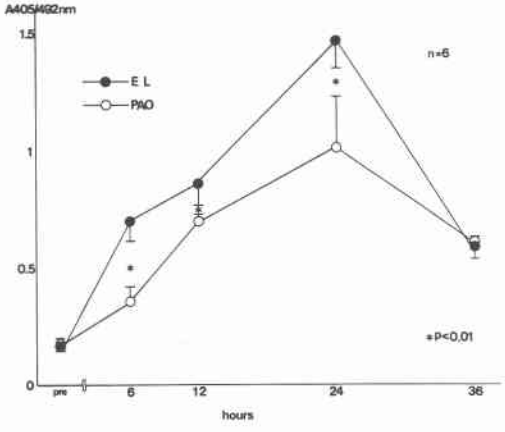
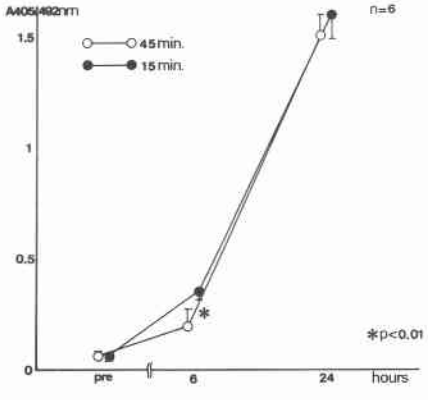


Fig. 6 Postoperative change in t-PAA of supernatant of peritoneal lavage fluid (mean±SD). Fluid was diluted 1 : 2 and incubated 3 hours at 37℃.



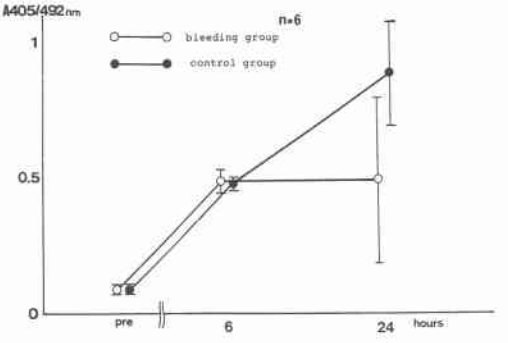
コントロール群が高い傾向があった（**Fig. 7**）.

IV. 考　察

正常組織中に存在するPAはu-PAとt-PAに大別できる．ともにフィブリンあるいはフィブリノーゲンに特異的なセリンプロテアーゼであるが，免疫学的にも分子構造，機能についても相違点がある．とくにt-PAはフィブリンに対して，高い親和性を持っている[11]．

一般にt-PAは，血中ではfree t-PAとt-PA，PAI complexの形で存在し，抗原量を測定する場合はfree

Fig. 7 Postoperative changes in t-PAA of supernatant of peritoneal lavage fluid (mean±SD). Fluid was diluted 1 : 8 and incubated 6 hours at 37℃.



t-PAとPAI-1との複合体やフラグメントを含んで測定しており，活性値ではこれらが含まれていないので両者に解離が認められる[12]．

PA活性測定については，合成基質による呈色反応を用いた方法，モノクローナル抗体を用いた方法[13]，ラジオアッセイを用いた方法[14]などがある．われわれは合成基質による呈色反応を用いた方法を用いた．この方法の短所である阻害因子の影響をより少なくするため検体の酸性化は速やかに行った．

腹膜癒着モデルはこれまでに数多く発表されているが，最も普遍的なモデルにRyan's Model[15]がある．回盲部の乾燥と自家血の法入による癒着作成は，漿膜の損傷と血液に由来するフィブリンの存在という腹膜癒着の大きな成因に基づいている．このモデルでは盲腸―盲腸間の癒着は全例に生じたと報告している．また沖野らは盲腸―盲腸間および盲腸―結腸間を一括した癒着の頻度は60%であったとしている[16]．われわれは自家血注入のかわりに，ガーゼにて盲腸を擦過し点状出血を起こし，より侵襲を与えるため，壁側腹膜にも損傷をあたえる方法を考案し盲腸―腹腔内臓器間の癒着は90%（9/10）に生じた．なお，開腹時間，出血の影響を検討する実験では，漿膜損傷の程度，出血量を一定にすべく，より一定の条件を保てる単開腹術を用いた．

腹膜癒着の機序については，漿膜の基底膜まで損傷した際の線維素の析出過多，マクロファージによる吸収が十分に行われないこと，線溶系酵素の低下により線維素の溶解が十分に行われないことがあげられている[1]．特に線溶系酵素を補う観点からu-PAの投与が行

われてきた[2)3)]が，近年フィブリンに対してu-PAより親和性の高い[11)]t-PAについても癒着防止効果があることが明らかとなった[4)5)]．そこで開腹手術による，t-PA，PAI-1活性の変化について実験的に検討した．

開腹手術によるt-PA・PAI-1活性の変化について，武田らは閉腹時，術後早期にPA・PAI-1がともに上昇するが，t-PA活性を反映するEuglobulin lysis timeは閉腹時，術後早期には術前と同じか延長がみられたと報告している[6)]．われわれの癒着モデルにおいては，術後には術前と比べ血漿t-PA活性は変化なかった．PAI-1活性は有意差はないものの上昇する傾向にあり，血液中においては開腹手術後早期には線溶抑制傾向にあることが示唆された．また侵襲の異なる手術間でも同様にt-PA活性は変化なくPAI-1活性の上昇する傾向にあったが，両群間に差はなかった．

一方，実際癒着をおこす部位は腹腔内の漿膜面または漿膜が損傷した面である．腹腔内局所でのPA活性は現在まで報告がなく方法も確立していなかった．そこで局所の変動をみる目的で腹腔内に少量のPBSを注入し洗浄後30分後に回収し，その上清中のPA活性を測定した．術後6～72時間では術後24時間をピークとして術前値より上昇していたが，漿膜損傷，点状出血を加えた癒着作製手術群ではコントロール群に比べ術後6～24時間で有意に低く，腹腔洗浄液上澄み中のPA活性は，漿膜損傷，出血などの腹腔内の現象と密接な関連があることが明らかとなった．

今までに壁側腹膜組織中のfibrinolytic activator activityは，開腹後腹膜を擦過した群では3～24時間で低下傾向を示し，腹膜有茎弁を作成した群では3～24時間でさらに低下していたという報告[1)]や，術後のマクロファージの培養上清中のPA活性は術後早期に低下し，PAI活性は術後1～3日で高値を示したという報告[7)17)]もみられる．しかし癒着局所でのPA活性は漿膜組織中のPA，マクロファージから産生されるPAばかりでなく，出血により腹腔内に漏出する血漿t-PAやPAI-1，また出血による血小板凝集の際，血小板α顆粒より放出されるtransforming growth factor β（以下，TGFβ）により産生されるPAI-1[18)]も関与している可能性がある．さらにマクロファージも多核白血球の影響を受けPA産生能が変化するという報告[19)]もある．

t-PA活性の変化を，漿膜損傷の程建を盲腸の乾燥時間を15分，45分と変えることによって客観的に調べると，t-PA活性は長時間乾燥した群が短時間に比べ術後6時間で有意に低かった．また自家血注入群でもコントロール群に比べ，t-PA活性は術後24時間で低い傾向があった．すなわち漿膜損傷，出血（血液貯留）という個々の因子が局所でのt-PAを低下させていることが明らかとなった．

最近，出血に際してはフィブリンの析出をもたらすのみでなく，血小板凝集により放出されるTGFβは癒着を促進するという報告[20)]もあり注目したい．

今回腹腔洗浄液上澄み中のPA活性を測定したところ術後早期において癒着の原因と考えられている漿膜損傷群や血液注入群で低値を示した．しかし癒着の原因はPA活性のみでなく，$\alpha_2$plasmin inhibitor，多核白血球やマクロファージによる創面の清掃，術後の臓器のhypoxia，各種growth factorやサイトカインの関与，術後の腸管麻痺など多岐にわたっているが，術後の腹腔洗浄液上澄み中のt-PA活性からみても，術中の臓器愛護，完全な止血は術後の癒着防止に有効であると考える．

稿を終えるにあたり御指導を賜りました第2外科の深沢学助手に深謝いたします．

なお本論文の要旨は第39・40回日本消化器外科学会総会において発表した．

文　献

1) 脇坂順一，矢野博道：開腹術後の病態生理―損傷漿膜の態度と癒着について―．石山俊次，和田達雄，中村紀夫 編．外科病態生理．上巻．南光堂，東京，1980，p333―348
2) 脇坂順一：腹膜の修復と癒着．日消外会誌 9：677―685，1976
3) Birkenfeld A, Schenker JG: The effect of urokinase in the prevention of intraperitoneal adhesions; role of blood in their formation. Ann Chir Gynaecol 72：246―249，1983
4) Donald M, Harokd E: The role of plasmonogen activator in adhesion prevention. Surg Gynecol Obstet 172：362―366，1991
5) Orita H, Fukasawa M, diZerega GS et al: Inhibition of postsurgical adhesions in a standardized rabbit model: Intraperitoneal treatment with tissue plasminogen activator. Int J Fertil 36：172―177，1991
6) 武田成彰，岡本好司，加藤秀典ほか：手術侵襲に基づく凝固・線溶系の反応様式．日外会誌 91：1191―1195，1990
7) Fukasawa M, Joseph DC, diZerega GS et al: Production of protease inhibitors by postsurgical macrophages. J Surg Res 46：256―261，1989

8) Ranby M, Norrman B, Wallen P: A sensitive assay for tissue plasminogen activator. Thromb Res 27: 743—749, 1982
9) Wiman B, Mellbring G, Ranby M: Plasminogen activator release during venous stasis exercise as determined by a new specific assay. Clin Chim Acta 127: 279—288, 1983
10) Chmielewska J, Ranby M, Wiman B: Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma. Blood 69: 460—466, 1987
11) 上林純一, 森 武貞：組織プラスミノゲン・アクチベーターによる血栓症の治療. 外科治療 65: 193—200, 1991
12) 坂田洋一：t-PA/PAI-1複合体測定の意義. 臨病理 3: 256—260, 1989
13) 山田誠一, 山田利津子, 石井明治：モノクローナル抗体の特徴を生かしたBioimmunoassayによるt-PA活性値の測定. 臨免疫 22: 477—479, 1990
14) Roche PC, Campeau JD, Shaw ST: A rapid and highly sensitive solid phase radioassay for plasminogen activators. Thoromb Res 31: 269—277, 1983
15) Ryan CB, Grobety J, Majno G: Postoperative peritoneal adhesion. Am J Pathol 65: 117—148, 1971
16) 沖野基規, 富恵 博, 兼定博彦ほか：メナテトレノンの腹膜癒着に及ぼす影響—Ryan's Modelを用いて—. 日外会誌 92: 381—386, 1991
17) 深沢 学, 折田博之, 鷲尾正彦ほか：腹膜手術侵襲によるマクロファージの活性化. 日外会誌 92: 374—380, 1991
18) 坂田洋一：t-PA, PAI. 肺と心 37: 329—334, 1990
19) 倉岡節夫, 鷲尾正彦, diZerega GS：多核白血球による術後活性化マクロファージの機能調節. 日外会誌 93: 363—368, 1992
20) Williams RS, Rossi AM, Chegini N et al: Effect of transforming growth factor β on postoperative adhesion formation and intact peritoneum. J Surg Res 52: 65—70, 1992

Postoperative Peritoneal Adhesion and Changes in Fibrinolytic Enzymes —With Special Reference to Postoperative Changes of Plasminogen Activator Activity in Supernatant of the Peritoneal Lavage Fluid—

Masaaki Kobayashi, Osamu Matsumoto, Jin-ichi Kameyama and Masaru Tsukamoto
First Department of Surgery, School of Medicine, Yamagata University

To study the mechanism of postoperative peritoneal adhesion, postoperative changes in fibrinolytic enzymes were measured using rats. After peritoneal adhesion operations, plasma tissue type plasminogen activator activities (t-PAA) (n=10), plasminogen activator inhibitor-1 activities (PAI-1A) (n=10), and t-PAA of supernatant of the peritoneal lavage fluid were measured (n=10). Plasma t-PAA was no remarkable change between preoperative and postoperative levels. Plasma PAI-1A was higher (N.S.) than the preoperative level at 72 and 168 hours. t-PAA of the supernatant of the peritoneal lavage fluid was significantly increased ($p<0.01$), showing peak levels by 24 hours. Then the levels gradually decreased and reached the preoperative level by 168 hours. After exploratory laparotomy, the t-PAA of the supernatant of the peritoneal lavage fluid in the serosal injury groups (n=6) was significantly lower ($p<0.01$) than in the control group at 6 hours. From these results, it was recommended that careful operation is important to prevent postoperative peritoneal adhesion.

Reprint requests: Masaaki Kobayashi First Department of Surgery, Yamagata University School of Medicine
2-2-2 Iida-Nishi, Yamagata, 990-23 JAPAN