HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	生体ブタ全周性食道ESD後狭窄モデルに対するバルーン拡張実験、効率的で安全なバルーン拡張法の検討
Author(s)	木脇, 佐代子
Description	配架番号：2604
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14486号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14486
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96779
Type	doctoral thesis
File Information	Sayoko_Kinowaki.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

生体ブタ全周性食道 ESD 後狭窄モデルに対する バルーン拡張実験、効率的で安全な バルーン拡張法の検討

(Experiment on balloon dilation for esophageal stenosis after endoscopic submucosal dissection in pigs)

2021 年 3 月

北 海 道 大 学

木 脇 佐 代 子

学 位 論 文

生体ブタ全周性食道 ESD 後狭窄モデルに対するバルーン拡張実験、効率的で安全なバルーン拡張法の検討

(Experiment on balloon dilation for esophageal stenosis after endoscopic submucosal dissection in pigs)

2021 年 3 月

北海道大学
木脇　佐代子

目　次

発表論文目録及び学会発表目録 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１頁
要旨 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２頁
略語表 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・５頁
緒言《第１章》・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・６頁
方法《第１章》・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・９頁
結果《第１章》・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１８頁
考察《第１章》・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２６頁
緒言《第２章》・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２８頁
方法《第２章》・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２９頁
結果《第２章》・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３２頁
考察《第２章》・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３５頁
結論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３６頁
謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３７頁
利益相反 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３８頁
引用文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３９頁

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部を以下の論文に発表した。

１．Sayoko Kinowaki、 Yuichi Shimizu、 Masayoshi Ono、 Yang ZiJian、 Ikko Tanaka、 Yoshihiko Shimoda、 Masaki Inoue、 Marin Ishikawa、 Keiko Yamamoto、 Shoko Ono、 Shunsuke Ohnishi、 Naoya Sakamoto
Experiment on balloon dilation for esophageal stenosis after endoscopic submucosal dissection in pigs.
Gastrointestinal Endoscopy 2020
投稿中

本研究の一部は以下の学会に発表した。

１．木脇佐代子、清水勇一、大西俊介
生体ブタ全周性食道 ESD 施行後のバルーン拡張時の病理組織学的検討。
第 99 回 日本消化器内視鏡学会総会 (2020.5.22 金 - 5.24 日）京都
（オンライン開催のため、紙上発表となった）

要　旨

【背景と目的】

内視鏡的粘膜下層剥離術(Endoscopic Submucosal Dissection: ESD)は、早期食道癌に対する有用な治療法であるが、最も重大な有害事象は術後食道狭窄である。狭窄は通常、内視鏡的バルーン拡張術にて治療されるが、しばしば難治性となり、また、穿孔等の合併症も生じる。これらバルーン拡張時の機序や病理組織像は明確にされていない。《第1章》生体ブタ食道狭窄モデルに対するバルーン拡張実験を行い、効率的で安全なバルーン拡張法を明らかにする目的で食道バルーン拡張時や穿孔時、および再狭窄時の組織学的変化を検討した。《第2章》ESD後狭窄予防として効果のある間葉系幹細胞培養上清（mesenchymal stem cell-conditioned medium：MSC-CM）が、バルーン拡張後の再狭窄予防としても効果的であるか検証する。

【対象と方法】

生体ブタの食道に長さ4 cm 全周性のESDを施行する。ESD後day 22を狭窄モデル、ESD時穿孔を穿孔モデルとし作成する。

《第1章》

Study 1：拡張モデル（ESD後day 22バルーン拡張）において、筋層伸展効果の指標として外縦筋の厚さを、熱変性の指標として内輪筋の筋線維束壊死の面積を測定した。

Study 2：再狭窄モデル（ESD後day 22にバルーン拡張、day 43再狭窄）において、再狭窄の指標として線維化叢の厚さを、筋層損傷の修復の指標として筋層の厚さを、熱変性の指標として内輪筋の筋線維束壊死の面積を測定した。

狭窄コントロールモデル（バルーン拡張無し)、ESD術中穿孔コントロールモデルを含め、計12頭のモデルを作成した。

《第2章》

Study 3：MSC-CM投与モデル（ESD後day 22にバルーン拡張・MSC-CMの4日間投与、day 43再狭窄）において開存率、線維化叢の厚さ、筋線維束の壊死面積を測定した。

【結果】

《第 1 章》

Study 1：外縦筋の厚さは狭窄モデル（ESD 後 day 22）では 1307±313 μmであった。筋層非損傷例の周囲部分 1243±322 μm、粘膜下層裂創部直下 803±145 μmであり、筋層裂創例の周囲部分 1248±305 μm、筋層損傷部両側 884±312 μmであった。いずれも周囲部分よりも裂創部で有意に薄くなっていた（P=0.005、P<0.001）。狭窄モデルとは有意差は認めなかった（p=0.444、p=0.513）。筋線維束の壊死面積は狭窄モデル 1.6±2.1×10^3 μ m^2であった。筋層非損傷例の周囲部分 1.4±2.3×10^3 μ m^2、粘膜下層裂創部直下 1.5±1.3×10^3 μ m^2 であり、狭窄モデルと同等であった（p=0.78、p=0.61）。筋層損傷例の周囲部分は 15.5±10.4×10^3 μ m^2、筋層損傷部両側は 40.2±12.9×10^3 μ m^2、穿孔モデルは 57.7±10.9×10^3 μ m^2であり、筋層損傷例では周囲部分よりも損傷部両側は著明に壊死面積が多く（p<0.001）、穿孔例は更に顕著に壊死面積が多かった（p<0.01）。

Study 2：線維化叢の厚さは狭窄モデルでは 1406±167 μm、筋層非損傷例の周囲部分 1359±196 μm 、裂創瘢痕部 1322±136 μm、筋層損傷例では周囲部分 1457±253 μm、裂創瘢痕部 1383±146 μmであった。筋層非損傷例、筋層損傷例の裂創瘢痕部は、ぞれぞれの周囲部分、狭窄コントロールと比較して有意差を認めなかった（p=0.74、0.23 筋層非損傷例、p=0.22、0.063　筋層損傷例）。筋層損傷例の筋層全層の厚さは、周囲部分は 2513±265 μm、裂創瘢痕部 1106.9±212.8 μmであった。裂創瘢痕部では有意に薄くなっていた（p<0.001）。筋線維束壊死面積は狭窄モデルでは 15.8 ±20.6×10^2 μ m^2であった。筋層非損傷例の周囲部分 1.5±3.7×10^2 μ m^2、裂創瘢痕部 2.7±3.5×10^2 μ m^2であり、筋層損傷例の周囲部分 7.4±20.2×10^2 μ m^2、裂創瘢痕部 4.5±7.7×10^2 μ m^2であった。それぞれ周囲部分と裂創瘢痕部では有意差はなかった（p=0.21、p=0.68）。狭窄モデルと筋層損傷例の周囲部分との比較では有意に狭窄例に壊死を多く認めた（p<0.001）。

《第 2 章》

Study 3：いずれの症例も食道径はピンホール状でスコープ通過は不可能であった。MSC-CM 塗布モデルと再狭窄モデルの開存率に差は認めなかった。線維化叢の厚さは筋層非損傷例 1359±196 μm、筋層損傷例 1457±253 μm、MSC-CM 例 1249±407 μmであり、差は認めなかった（p=0.18、0.54）。筋線維束の壊死面積は筋層非損傷例 1.5±3.7×10^2 μ m^2、筋層損傷例 7.4±20.2×10^2 μ m^2、MSC-CM 投与モデル 3.4±7.5×10^2 μ m^2であり、有意差は認めなかった（p=0.15、p=0.94）。

【考察】

《第 1 章》Study 1 でバルーン拡張時の筋層損傷例では、損傷部分内輪筋の筋線維束壊死が有意に多く認められ、穿孔モデルの穿孔部分に近い値であった。筋線維束壊死は ESD 時の熱変性に起因するものと考えられるが、術後 3 週間が経ち、完全瘢痕化しても壊死は残存し、その部分で筋層が脆弱化することが明らかとなった。Study 2 で、筋層損傷部は 6 週間後の再狭窄完成後も回復しておらず、バルーン拡張による筋層損傷は非可逆的になり、脆弱性がその後も持続すると考えられた。筋線維束壊死については、筋層損傷例、筋層非損傷例ともに day 22 で顕著に見られたが、Study 2 の day 43 では全く見られず、筋線維束壊死は ESD 3 週目以降に徐々に吸収、回復すると考えられた。Study 1 でバルーン拡張における伸展効果として、外縦筋は裂創部のみで伸展していた。バルーン拡張時には、粘膜切開などで裂創の数を増やすことが効率的な拡張につながる可能性が考えられた。Study 2 でバルーン拡張後の再狭窄時には、粘膜下層裂創部分の線維化叢は、拡張前と同様の状態に戻っていた。バルーン拡張時には再線維化予防のための何らかの介入が望ましいと考えられた。

《第 2 章》再狭窄予防としてバルーン拡張後に MSC-CM 塗布をおこなったが、線維化叢の厚さ、壊死面積については、バルーンのみ使用した症例と差はなく、開存率も差は認めなかったため、有効性は示せなかった。塗布できる潰瘍面積が狭いことが一因と考えられた。

【結論】

生体ブタ食道 ESD 後拡張実験より、筋層への熱変性は狭窄完成直後まで持続すること、一度、穿孔して損傷した筋層は完全には回復しないことが示された。ESD 時、筋層への熱変性が疑われた場合は、バルーン拡張においても、初期のうちは慎重な対応が必要と考えられた。拡張時、外縦筋は裂創部のみで伸展すること、再狭窄時には線維化叢はバルーン拡張前と同様に戻ることが明らかになった。拡張に加えて何らかの介入が再狭窄予防に必要と考えられた。再狭窄予防として、MSC-CM 投与を試みたが、効果は得られなかった。線維化叢への切開等の追加介入を検討すべきと考えられた。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下のとおりである。

AMSC：amnion-derived mesenchymal stem cell

CM：conditioned medium

CT：Computed Tomography

EBD：endoscopic balloon dilation

EDTA：ethylenediaminetetraacetic acid

EMR：endoscopic mucosal resection

ESD：Endoscopic Submucosal Dissection

FBS：fetal bovine serum

H&E：hematoxylin and eosin

MSC：mesenchymal stem cell

MSC-CM：CM obtained from

MM：muscularis mucosa

QOL：Quality Of Life

SD：standard deviation

《第 1 章》

緒　言

食道は内径の狭い管腔臓器であり、種々の疾患により器質的な狭窄を来たすと、容易に嚥下障害を引き起こし、Quality Of Life (QOL) の低下だけではなく、低栄養や誤嚥を引き起こす原因となる (Takahashi et al.,2019 ; Kobayashi et al.,2014)。食道狭窄をきたす疾患は、逆流性食道炎や好酸球性食道炎、胃癌や食道癌の手術後吻合分狭窄など多岐にわたるが、近年の消化管内視鏡診療技術の向上に伴い、食道癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術 (Endoscopic Submucosal Dissection: ESD) 後の狭窄が増加してきた (Oda et al.,2020 ; Ishihara et al.,2008 ; Katada et al.,2007 ; Tachimori et al.,2019 ; Iizuka et al.,2010 ; Ohara et al.,2016) 。

食道癌は日本での罹患率は男性 31.7 人 (人口 10 万人対)、女性 5.2 人 (人口 10 万人対) であり、男性は増加傾向となっている。全悪性新生物の死亡者数の 3.2%に相当している(国立がん研究センターがん対策情報センター)。

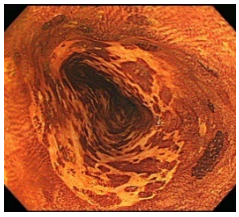
食道癌に対する治療は、内視鏡治療や手術、放射線化学療法が行われる。内視鏡検査、CT、超音波内視鏡で病変の周在性や深達度、周囲リンパ節の評価をおこない、粘膜固有層までの病変が内視鏡治療の絶対適応である。深達度が粘膜筋板(MM)に達したもの、粘膜下層 200 μmまで達したものは内視鏡切除は可能だがリンパ節転移の可能性があり、相対的な適応となる (食道癌診療ガイドライン 2017 年版. 2018)。

内視鏡治療は技術的に難易度が高いが、一括で切除でき、侵襲が少ないことが利点であり、近年の内視鏡技術の進歩により、早期食道癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術(Endoscopic Submucosal Dissection : ESD)は治療の第一選択として大きく広まり(Oda et al.,2020 ; Min YW et al.,2018)、また、デバイスの改良や技術の改善により、サイズの大きな病変に対しても ESD が行われるようになった(Berry MF., 2014 ; Toyonaga et al.,2013 ; Mizushima et al.,2015 ; Kosaka et al., 2014 ; Takahashi et al.,2010)。食道癌に対する ESD は低侵襲で根治性も高く有用な治療であるが、合併症として、出血や穿孔、狭窄が問題となる(Tachimori et al.,2019)。ESD を行う場合、術後の創傷治癒の過程で瘢痕狭窄をきたすが(Iizuka et al.,2010 ; Ohara et al.,2016)、食道は特に管腔が狭いため狭窄をきたしやすい。

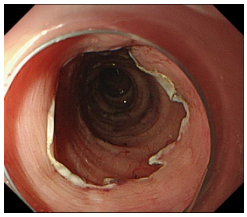
食道癌 ESD 後の狭窄リスクについては、粘膜切除 3/4 周性以上、かつ長軸 30 ㎜以上の切除にて 66～100%に狭窄が起こるとの報告がある(Katada et al.,2003 ; Ono

et al., 2009 ; Miwata et al., 2016)。ESD 後食道狭窄は、QOL を損なうだけでなく、嚥下障害による低栄養や、誤嚥性肺炎といった重篤な合併症の原因となり、最も対応に苦慮する問題点である。ESD 後食道狭窄は、通常、内視鏡的バルーン拡張術にて治療されるが、しばしば難治性となり、複数回のバルーン拡張が必要となる。食道癌 ESD 後の狭窄予防として、切除後潰瘍に対するステロイド局注や、術後ステロイド内服等の有用性が報告されているが、それらの方法を使っても狭窄する症例は少なくはない(Kadota et al.,2016 ; Sato et al., 2013 ; Ezoe et al., 2011 ; Hanaoka et al., 2012 ; Yamaguchi et al., 2011 ; Yu JP et al., 2015)。実際、ESD 後にステロイド局注やステロイド内服を行った症例の 10～30.8%に狭窄を来たしたと報告され、またその場合、多くは再狭窄を来たし、バルーン拡張を繰り返したと報告されている(Hashimoto et al.,2011 ; Hanaoka et al.,2012 ; Nagami et al.,2018 ; Nagami et al.,2017)。

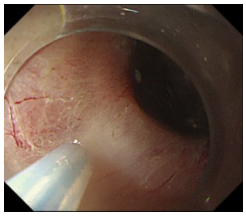
バルーン拡張において一番重要な合併症は食道穿孔であり、その発生率は 1～9%と報告されているが、複数回のバルーン拡張に伴い穿孔のリスクも増大する (Takahashi et al., 2011 ; 竹内ら., 2011 ; 小田ら., 2016)。食道穿孔は縦隔炎等の致死的な病態につながるため、避けなければいけない合併症であるが、これまで食道バルーン拡張による伸展効果や再狭窄時の機序、および穿孔の機序、発症リスクを検討した報告はない。また、バルーン拡張による穿孔は、過大な拡張による筋層の伸展のみならず、ESD 時の手技による筋層損傷も関わっていると考えられるが、この点についての検討も皆無である。今回、生体ブタ食道狭窄モデルに対するバルーン拡張実験を行い、効率的で安全なバルーン拡張法を明らかにする目的で、食道バルーン拡張時や穿孔時、および再狭窄時の組織学的変化を検討した。



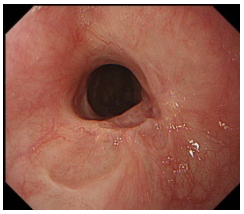
全周性の食道癌



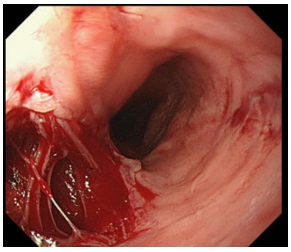
全周性 ESD 後

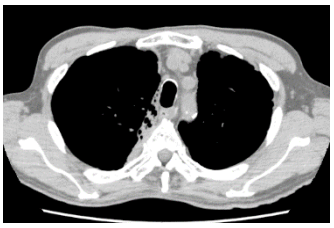


ステロイド局注



狭窄





バルーン拡張による穿孔

図１：食道癌 ESD の実際、拡張による穿孔時の内視鏡・CT 画像

《第 1 章》
方　法

1. 動物

メーカーより以下の動物を購入し実験を行なった。

三元交配ブタ 20kg メス　　(Sankyo Labo Service、Tokyo、Japan)

実験プロトコールは「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則り、北海道大学動物実験委員会の承認を得た。三元交配ブタを室温 24℃に維持された、12 時間明期-12 時間暗期の明暗サイクルの飼育環境のもと不断給餌下で、1 ケージあたり 1 頭のブタを飼育した。

２．食道内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD ; endoscopic submucosal dissection) 後の食道狭窄ブタモデルの作成

試薬及び材料

・Midazolam　　(20 mg、Astellas、Tokyo、Japan)
・Buprenorphine hydrochloride
　　(0.2 mg、Otsuka Pharmaceutical、Tokyo、Japan)
・Sevoflurane　　(Maruishi Pharmaceutical、Osaka、Japan)
・Mucoup　　(Seikagaku Corporation、Tokyo、Japan)
・Glyceol solution　　(Chugai Pharmaceutical、Tokyo、Japan)

ブタに対して、麻酔前投薬として midazolam ; 20 mg、buprenorphine hydrochloride ; 0.2 mg の筋肉内注射を行い鎮静し、続いて 5 %の sevoflurane で吸入麻酔を行なった。引き続き、5 mm (Smiths medical、Tokyo、Japan) の挿管チューブを用いて気管内挿管を行い、3 %の sevoflurane で維持麻酔を行なった。全身麻酔下に ESD を開始し、全身麻酔中は心拍数、心電図、SpO^2 を動物用モニターで監視した (Nihon Kohden、Tokyo、Japan)。全てのブタ実験で上部内視鏡 (GIF-Q240 もしくは GIF-Q240Z、Olympus、Tokyo、Japan) の先端にアタッチメント (Top、Tokyo、Japan) を装着して ESD を施行した。続いて食道 ESD の方法を記す。仮想の病変を作成して ESD を行なった。① 仮想病変の長軸は切歯列から 36～40 cm、全周性と想定し、flush knife BT (Fujifilm、Tokyo、Japan)を用いて、食道粘膜に仮想病変の

マーキングを行なった。② 25-gauge の局注針（Top)を用いて、Mucoup(Seikagaku Corporation、Tokyo、Japan)と Glyceol solution(Chugai Pharmaceutical、Tokyo、Japan)を 1:2 の割合の混合液に Indigo carmine をいれた局注液を、肛門側のマーキング近傍の食道粘膜下層に注入し粘膜下層に膨隆を作り、flush knife BT で全周性に粘膜切開を行なった。③ 引き続き、口側のマーキング近傍から、適宜、局注液を粘膜下層に局注して、flush knife BT で粘膜下層の剥離を行い ESD を終了した。なお、高周波電源装置（ESG-100、Olympus）は以下の設定で手技を行なった。

粘膜切開	Pulse cut slow mode (40 W)
粘膜下層剥離術	Forced coagulation mode (40 W)
止血	Soft coagulation mode (40 W)

全てのブタは ESD 翌日から飲水を開始して、第 2 病日の朝より食事を開始した。

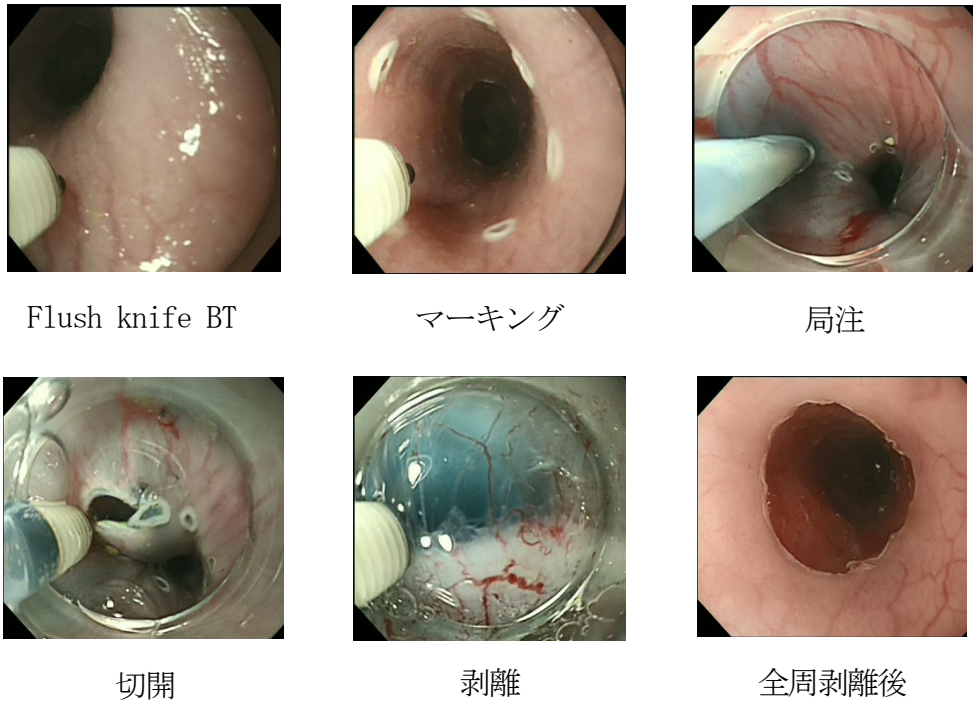


図２：ブタに対する ESD の流れ

３．バルーン拡張

材料

・CRE™ Fixed Wire Balloon Dilators [Esophageal]

(Boston Scientific、Tokyo、Japan)

バルーン拡張モデル作成のため、day 22、瘢痕狭窄が完成した時点でバルーン拡張を行った。バルーンは15 ㎜径、もしくは12 ㎜径を用いた。徐々に最大径まで拡張し、1分間留置した。

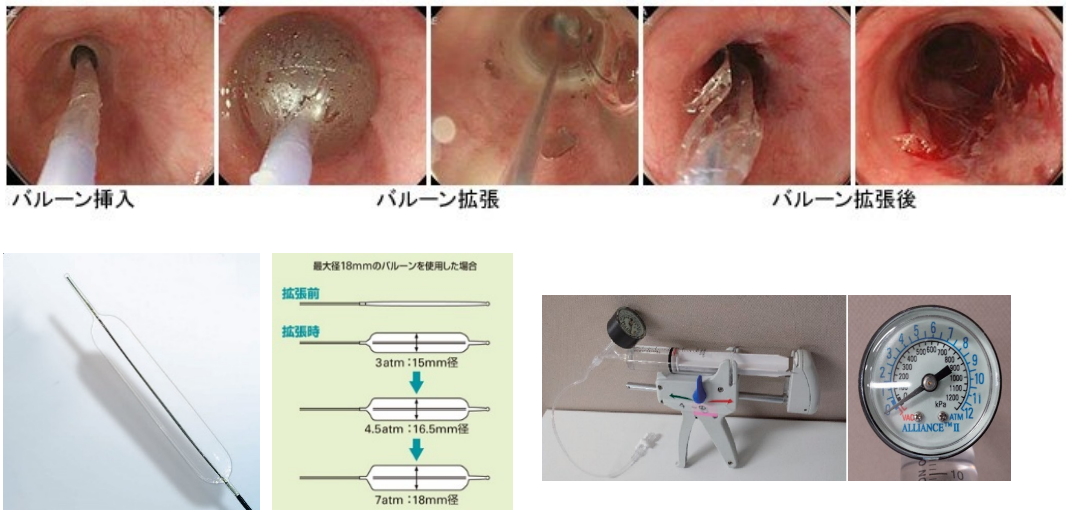


図３：食道狭窄患者に対する内視鏡的バルーン拡張術の実際
https://www.bostonscientific.com/jp-JP/health-conditions/Esophageal-Balloon-Dilation/esophageal-balloon-dilation-05.html　より抜粋

４．食道 ESD 後ブタ狭窄モデルを用いた実験プロトコール

Study 1　食道バルーン拡張時、穿孔時の組織学的検討
Study 2　食道バルーン拡張後、再狭窄時の組織学的検討
とし、下記の４群に分けてモデルを作成した。

① 狭窄コントロールモデル（ESD day 22、バルーン拡張なし）
② 穿孔コントロールモデル（ESD day 1、ESD 穿孔）
③ バルーン拡張モデル　筋層損傷・筋層非損傷
④ 再狭窄モデル　筋層損傷・筋層非損傷

①ESD 後狭窄のコントロールモデル作成のため、ESD を施行した後、瘢痕狭窄が完成するとされる 3 週間後（Honda et al.,2010）の day 22 に食道狭窄を内視鏡で確認し、サクリファイスした。

②筋層損傷コントロールとして ESD 時穿孔のモデル作成のため、ESD 術中に穿孔させて、直後にサクリファイスした。

③バルーン拡張モデル作成のため、day 22 の瘢痕狭窄が完成した時点でバルーン拡張を行い、直後にサクリファイスした。バルーン拡張時、バルーン拡張による穿孔時の組織学的検討(Study 1)のために、筋層非損傷例 2 頭、筋層損傷例 2 頭を作成した。筋層損傷の有無に関しては、術中の内視鏡所見にて判断した。

④バルーン拡張後再狭窄モデル作成のために、ESD 後 day 22 にバルーン拡張を施行した後、さらに 3 週間経過観察する。day 43 に再狭窄が完成した時点で狭窄を内視鏡で確認しサクリファイスした。再狭窄後も粘膜下層裂創部分が同定できるように、バルーン拡張直後に裂創部に点墨を行った。再狭窄時の組織学的検討(Study 2)のために、筋層非損傷例２頭、筋層損傷例２頭を作成した。

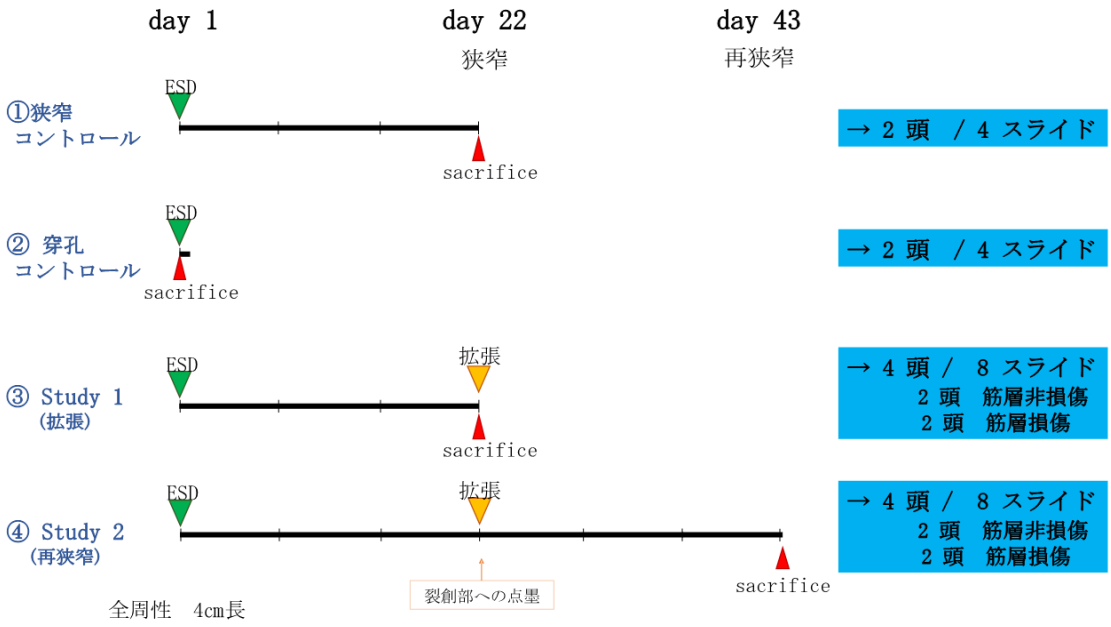


図 4：実験プロトコル。
狭窄コントロールモデル 2 頭（ESD day 22、バルーン拡張なし）、穿孔コントロールモデル 2 頭（ESD day 1、ESD 穿孔）を作成した。バルーン拡張モデルとして ESD 3 週間後の day 22 にバルーン拡張を行い、直後にサクリファイスした。バルーン拡張時、拡張穿孔時の組織学的評価を行うために筋層非損傷 2 例、筋層損傷例 2 例を作成した(Study 1)。day 22 に拡張した後、さらに 3 週間経過観察し、day 43 にサクリファイスした。再狭窄の組織学的評価のため、筋層非損傷 2 例、筋層損傷例 2 例を作成した(Study 2)。

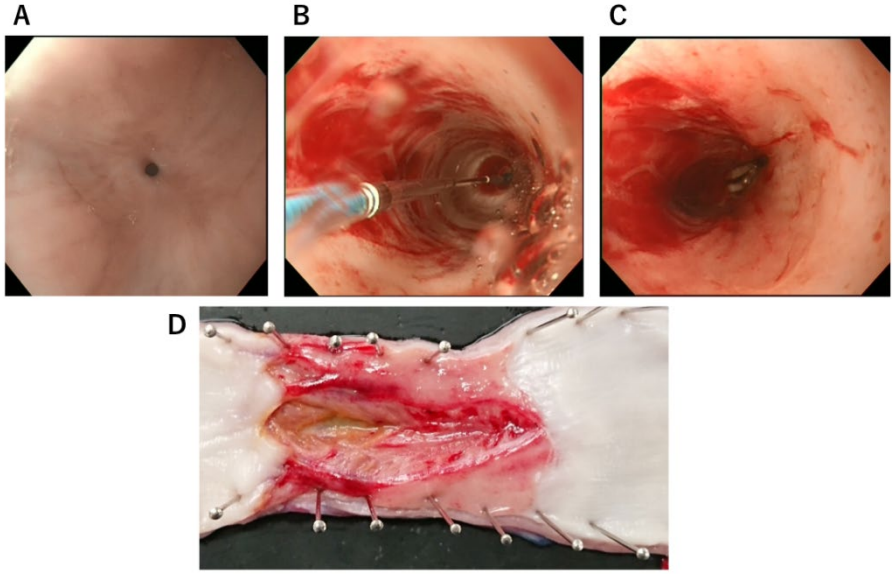


図 5：内視鏡的バルーン拡張の手順（筋層損傷の場合）。
A、ESD 後 day 22 の食道狭窄の内視鏡所見。 B、バルーン最大直径 12 mm の拡張中の内視鏡所見。 C、拡張直後の内視鏡所見。 D、取り出した食道検体。

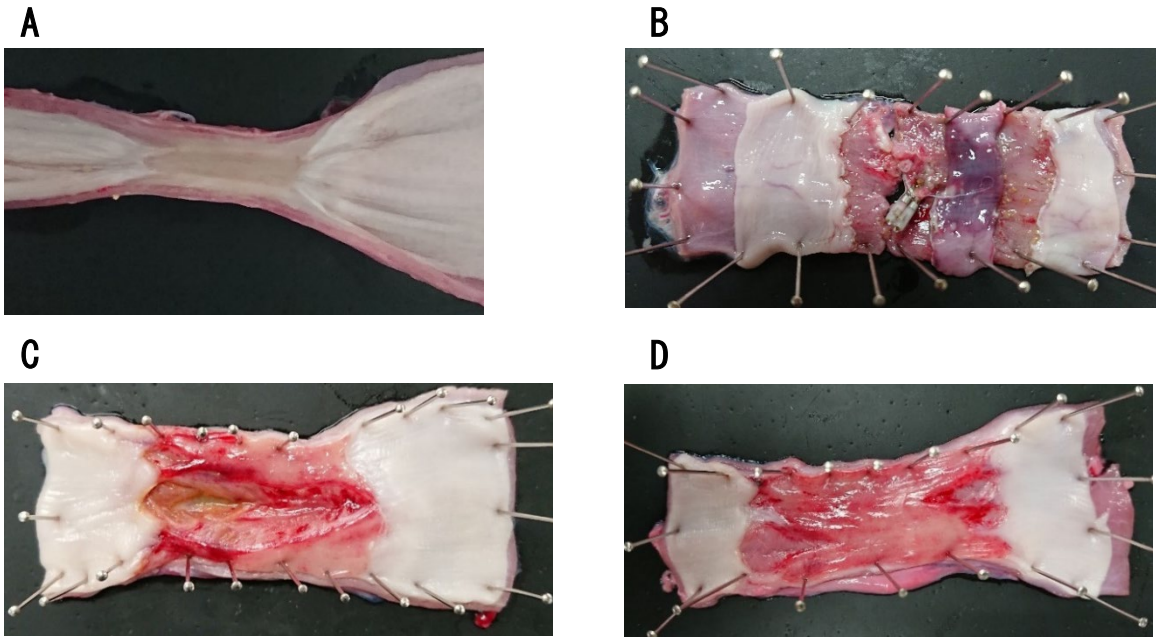


図 6：検体写真。A、狭窄コントロールモデル。B、穿孔コントロールモデル。C、筋損傷例。D、筋層非損傷例。

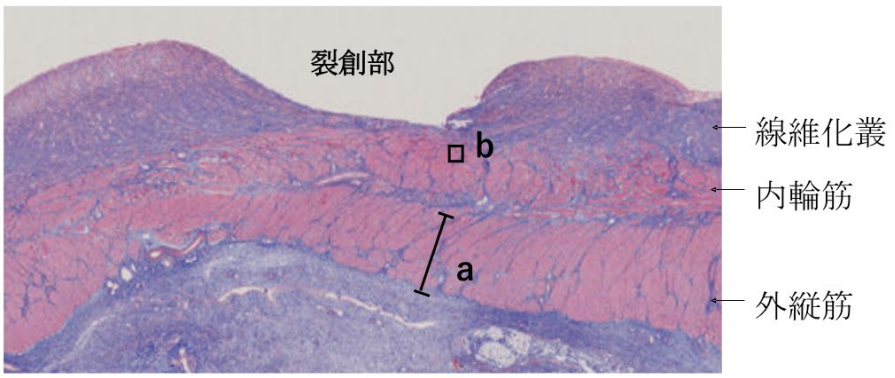
５．計測項目

Study 1　食道バルーン拡張時、穿孔時の組織学的検討

検討 1-1:筋層伸展効果の指標として、筋層の厚さを計測した。内輪筋は EMR 後に萎縮を来たすとの報告があるため（Honda et al.,2010)、外縦筋の厚さを計測した（図 7A-a)。狭窄コントロールモデル（プロトコル①)、拡張モデル（プロトコル③)、いずれも裂創部以外の周囲部分の外縦筋をランダムに 10 か所づつ計測した。さらに、拡張モデル（プロトコル③）の筋層非損傷例は粘膜下層裂創部分の直下を 2 か所、筋層損傷例は筋層裂創部分の両側を計測した。計測値をそれぞれ比較した。

検討 1-2:ESD 手技による筋層ダメージの指標として、400 倍の 1 視野あたりの筋線維束壊死の面積を計測した（図 7A-b)。狭窄コントロールモデル（プロトコル①)、拡張モデル（プロトコル③)、いずれも裂創部以外の周囲部分の内輪筋をランダムに 10 か所計測した。さらに拡張モデル（プロトコル③）について、筋層非損傷例は粘膜下層裂創部分の直下を 2 か所、筋層損傷例は筋層裂創部分の両側の内輪筋部分を計測した。また、穿孔コントロールモデル（プロトコル②）について、穿孔部分の両側の内輪筋部分を計測した。計測値をそれぞれ比較した。

A



B

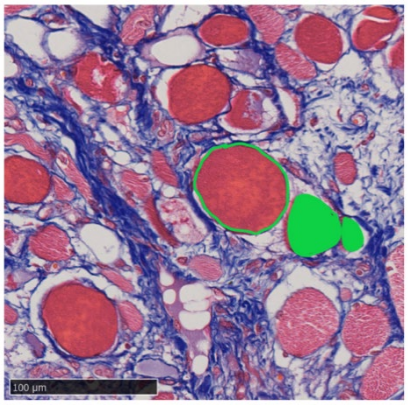


図７：計測位置

A、拡張モデル　a：平滑筋の外側縦層の厚さ（伸展効果の指標)。 b：筋線維束壊死の領域（熱損傷の指標)。

B、ソフトウェアを分析する画像を使用した、1 視野（400 倍）あたりの筋線維束壊死の面積の測定画像。

Study 2　食道バルーン拡張後、再狭窄時の組織学的検討

検討 2-1:再狭窄の評価として、再狭窄モデル（プロトコル④）の線維化叢の厚さを、裂創瘢痕部分 2 か所およびそれ以外の周囲部分をランダムに 10 か所計測し、比較した。(図８a)

検討 2-2:再狭窄モデル（プロトコル④）の筋層損傷例について、筋層損傷回復の評価として、筋層全体の厚みを裂創瘢痕部分 2 か所およびそれ以外の周囲部分をランダムに 10 か所計測し、比較した。(図８b)

検討 2-3:検討 1-2 と同様、筋層ダメージの指標として、400 倍 1 視野あたりの筋線維束壊死の面積を計測した。再狭窄モデル（プロトコル④）の筋層非損傷例、筋層損傷例、それぞれ裂創瘢痕部分の直下を 2 か所計測した。裂創瘢痕部分以外の周囲部分の内輪筋もランダムに 10 か所計測し、比較した。(図８c)

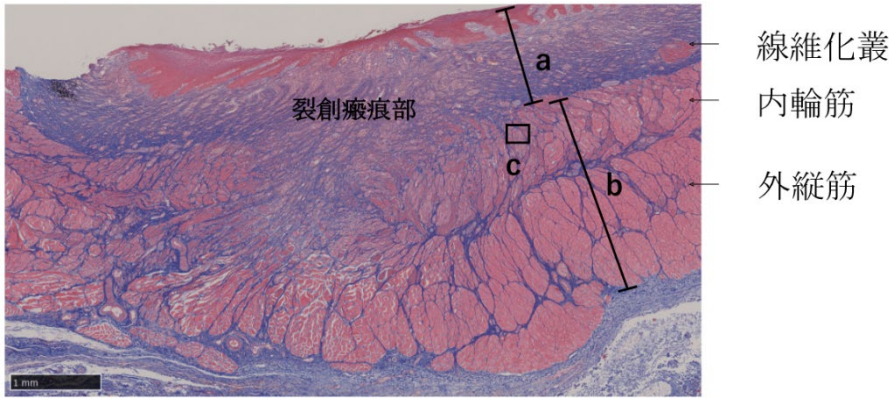


図８：再狭窄モデル、計測位置

a：再狭窄の指標として線維化叢の厚さ（検討 2-1）

b：筋層損傷の修復の指標として筋層全層の厚さ（検討 2-2）

c：熱変性の指標として筋線維束壊死の面積（検討 2-3）

６．組織学的検査

すべてのブタは全身麻酔下に 15 % KCL（テルモ）の 20 mL を静脈注射することにより安楽死させた。頚部および腹部を切開して食道へアプローチした後に食道を抜去した。抜去した食道を長軸方向に切開し、ゴム板に食道を自然に開いた形でピンで固定した。ゴム板に貼付けた標本を 40 g/l formaldehyde saline で固定を行ない、paraffin で包埋し、薄切して 5 μm 厚の切片を作成した。作成する切片は食道の短軸方向の切片とした。組織切片は hematoxylin and eosin (H&E)染色を行い、Masson's trichrome 染色でコラーゲン線維を確認した。各症例に対して適切な 2 つ断面を選択して評価した。それぞれの厚さや面積などは画像閲覧ソフト(NDP. view2 software、Hamamatsu、Japan)を用いて測定した。

７．統計学的解析

この研究は、豚の食道狭窄に対する拡張の効果を評価した最初の研究であるため、事前にサンプルサイズを計算するためのデータがなかった。そこで、まず、合計 12 匹の豚を用いて実験を行い、サンプルサイズを検証する事後の分析を行うことをした。その後、分析の結果、合計 12 匹の豚が十分な数であると推定した。

データは平均値と標準偏差で表した。Mann-Whitney U 検定により、それぞれの群間の差を検定した。$p<0.05$ をもって統計的に有意とした。全ての分析は EZR software (Saitama Medical Center、Jichi Medical University、Saitama、Japan)を用いて行った(Kanda, 2013)。

《第 1 章》

結　果

Study 1 の ESD 後 day 22、Study 2 の day 22、day 43 での内視鏡観察では、いずれも食道径はピンホール状となっており、スコープ通過は不可能であった。

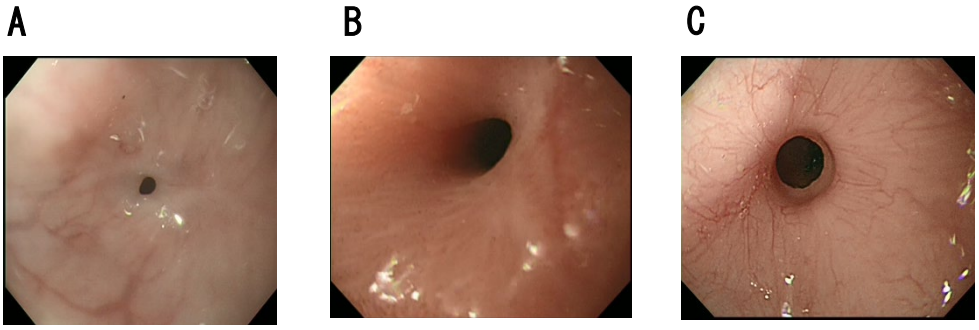


図９：内視鏡像
A、Study 1　day 22。 B、Study 2　day 22。 C、Study 2　day 43。

Study 1　食道バルーン拡張時、および拡張による筋層損傷時の組織学的検討

検討 1-1：外縦筋の厚さ（拡張時の筋層伸展効果の指標）について、狭窄コントロールモデルは 1307±313 μmであった。拡張時筋層非損傷例では周囲部分は 1243±322 μm、粘膜下層裂創部直下は 803±145 μmであった。筋層損傷例では周囲部分は 1248±305 μm、筋層損傷部両側は 884±312 μmであった。

狭窄コントロールモデルと拡張モデルの周囲部分は、筋層非損傷例、損傷例共に有意差を認めなかった（それぞれ $p= 0.44$、$p= 0.51$）。拡張時筋層非損傷例、損傷例共に、外縦筋は周囲部分より裂創部で有意に薄かった（それぞれ $p= 0.005$、$p<0.001$）。

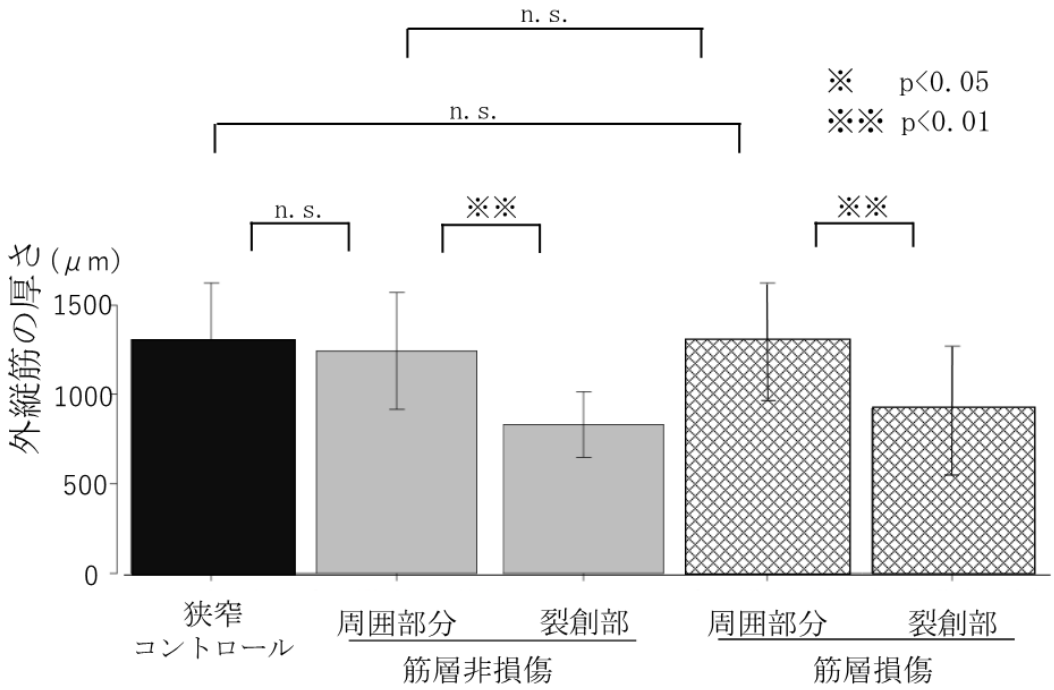


図 9：バルーン拡張による組織学的変化の評価(Study 1　検討 1-1)。外縦筋の厚さをランダムに 10 か所測定した（周囲部分)。筋層非損傷例は粘膜下層裂創部直下 2 か所、筋層損傷例は筋層損傷部両側も加えて測定した（裂創部)。

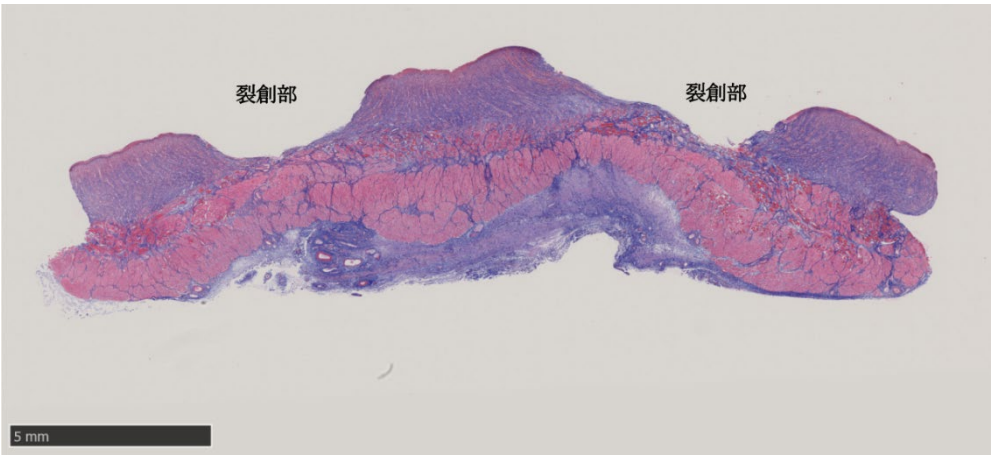


図 10：バルーン拡張直後の食道の組織学的所見。(筋層損傷例、深い裂創（右）と浅い裂創（左)、Masson's trichrome 染色)

検討 1-2：内輪筋内の筋線維束の壊死面積（ESD 手技による筋層ダメージの指標）について、狭窄コントロールモデルは 1.6±2.1×10^3 μ ㎡であった。拡張時筋層非損傷例では周囲部分は 1.4±2.3×10^3 μ ㎡、粘膜下層裂創部直下は 1.5±1.3×10^3 μ ㎡であった。筋層損傷例では周囲部分は 15.5±10.4×10^3 μ ㎡、筋層損傷部両側は 40.2±12.9×10^3 μ ㎡であった。穿孔コントロールモデルでは穿孔部 57.7±10.9×10^3 μ ㎡であった。

狭窄コントロールモデルと拡張時筋層非損傷例の周囲部分、粘膜下層裂創部直下は有意差を認めなかった（p=0.78、p=0.61）。周囲部分と裂創部はそれぞれ、筋層非損傷例よりも筋層損傷例で有意差をもって著明に壊死面積が多くなっていた（p<0.001、p<0.001）。筋層損傷例の筋層損傷部両側は、筋層損傷例の周辺部分との比較でも有意差をもって増えていた（p<0.001）。さらに顕著に壊死面積が多いのは穿孔コントロールモデルであった（筋層損傷例の筋層損傷部両側と比較して p=0.028）。

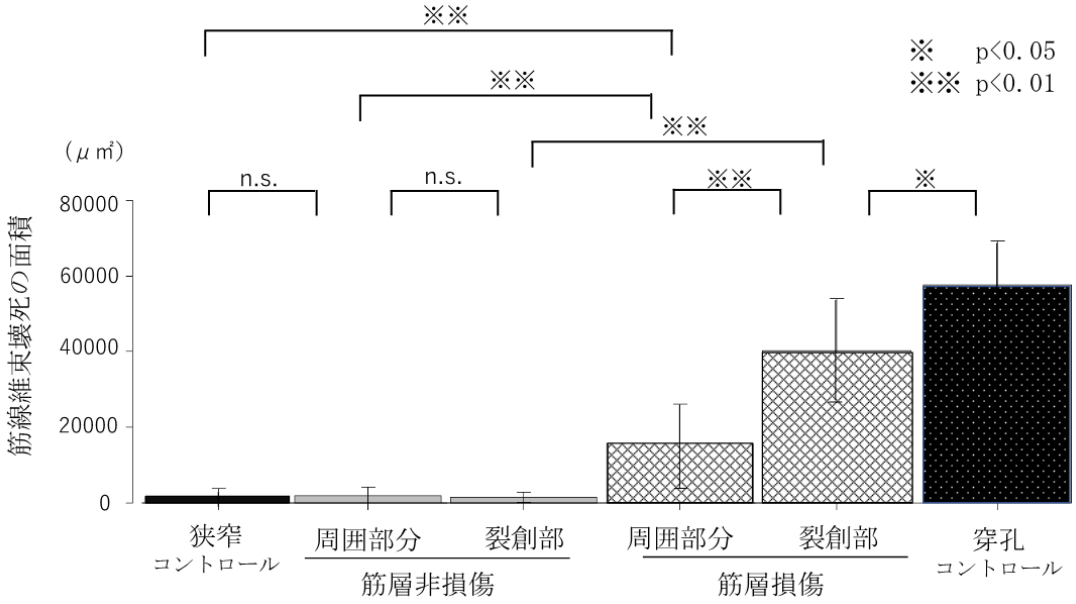


図 11：ESD 後 day 22 の筋層への熱変性の組織学的評価（Study1　検討 1-2）。内輪筋内の筋線維束壊死面積をランダムに 10 か所測定した（周囲部分）。 筋層非損傷例では粘膜下層裂創部直下 2 か所、筋層損傷例では筋層損傷部両側もそれぞれ測定した（裂創部）。

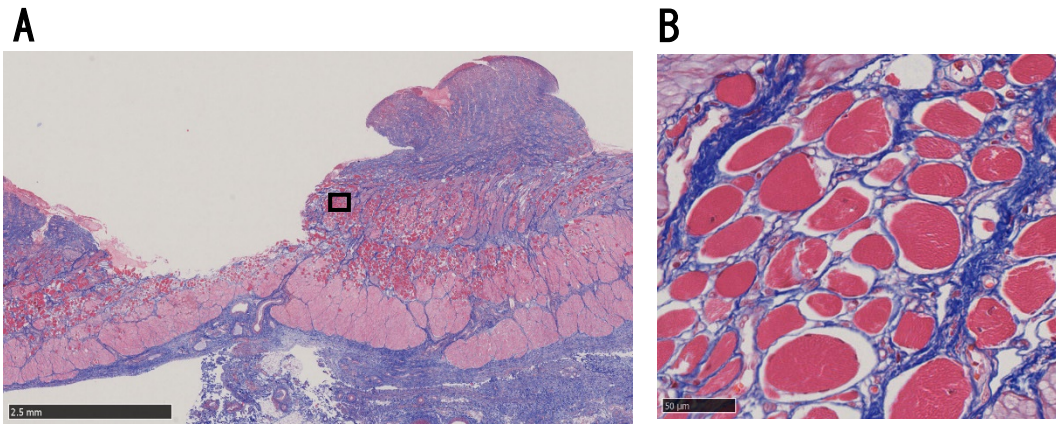


図 12：A、バルーン拡張した直後の食道。筋層損傷例。Masson's trichrome 染色)。B、裂創部両側部の拡大像(x 400)。

Study 2　食道バルーン拡張後、再狭窄時の組織学的検討

検討 2-1：線維化叢の厚さ（再狭窄の評価）について、狭窄コントロールモデルは周囲部分は 1406±167 μmであった。筋層非損傷再狭窄例では周囲部分は 1359±196 μm 、裂創瘢痕部は 1322±136 μmであった。筋層損傷再狭窄例では周囲部分は 1457±253 μm、裂創瘢痕部は 1383±146 μmであった。

筋層非損傷再狭窄例、筋層損傷再狭窄例の裂創部の線維化叢の厚さは、ぞれぞれの周囲部分、狭窄コントロールモデルと比較して有意差を認めなかった（p=0.74、0.23 筋層非損傷例、p=0.22、0.063　筋層損傷例)。

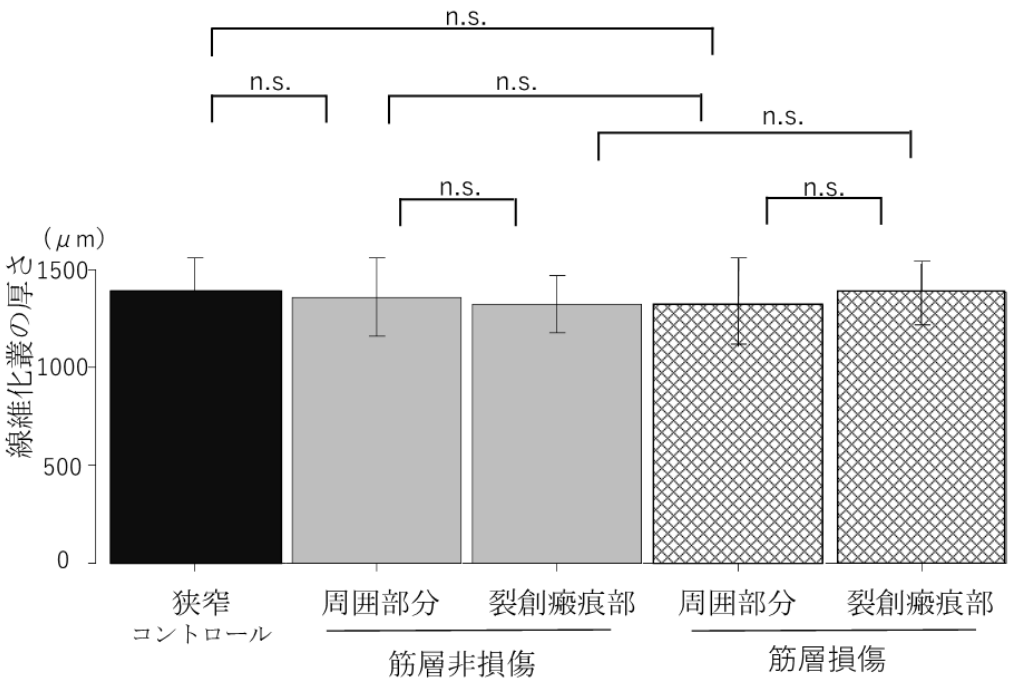


図 13：再狭窄の組織学的評価。(Study 2　検討 2-1)
線維化叢の厚さをランダム 10 か所計した（周囲部分）。裂創瘢痕部 2 か所を計測した。

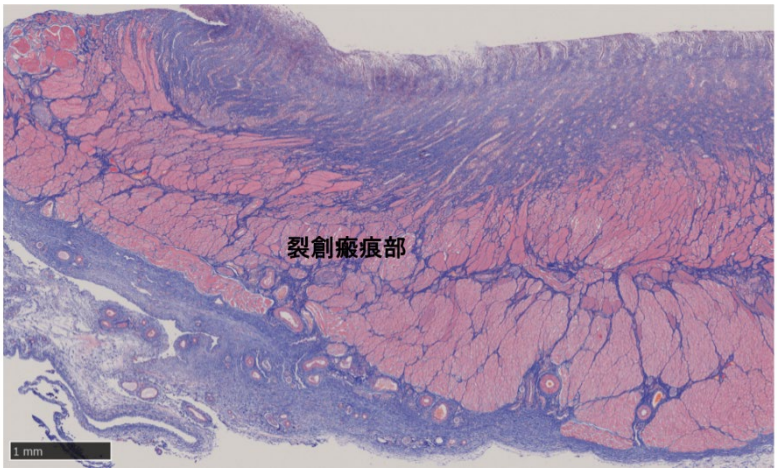


図 14：バルーン拡張後の再狭窄の組織学的評価。筋層非損傷例、Masson’s trichrome 染色。

検討2-2：筋層損傷再狭窄例における再狭窄時の筋層全層の厚み（筋層損傷回復の評価）は周囲部分は2513±265 μm、裂創瘢痕部は1106.9±212.8 μmであった。

裂創瘢痕部では有意に薄くなっていた（p<0.001）。

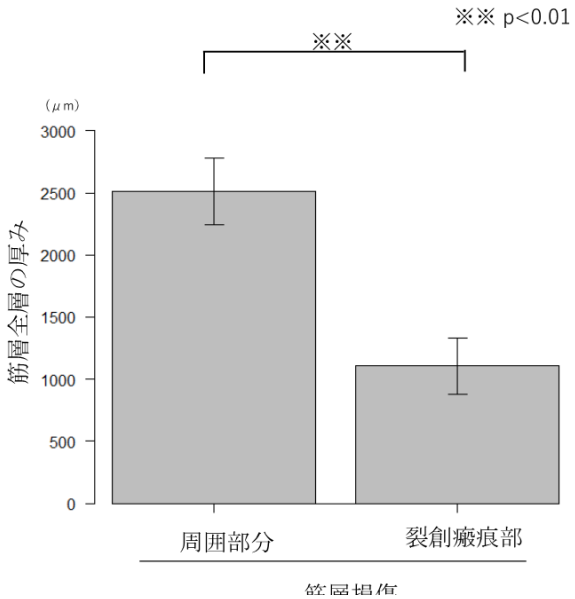


図15：筋層損傷の組織学的評価。（Study 2　検討2-2）
筋層全体の厚さの測定。10か所ランダムに測定した（周囲部分）。裂創形成部も2か所測定した。

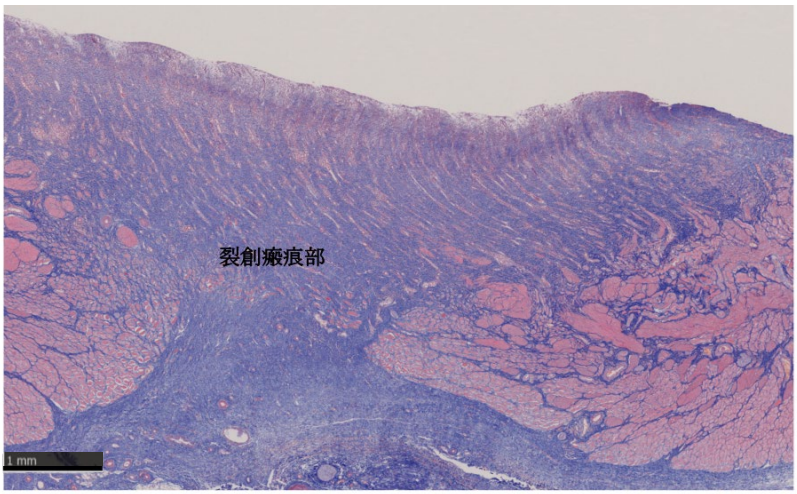


図16：バルーン拡張後の再狭窄の組織学的評価。筋層損傷例。
Masson's trichrome 染色。

検討2-3：内輪筋内の筋線維束壊死面積（ESD手技による筋層ダメージの指標）は、狭窄コントロールモデルでは15.8 ±20.6×10²μ ㎡であった(Study 1検討1-2)。筋層非損傷再狭窄例は周囲部分は1.5±3.7×10²μ ㎡、裂創瘢痕部は2.7±3.5×10²μ ㎡であった。筋層損傷再狭窄例は周囲部分は7.4±20.2×10²μ ㎡、裂創瘢痕部は4.5±7.7×10²μ ㎡であった。

ESD後day 43である筋層非損傷再狭窄例と筋層損傷再狭窄例はそれぞれ、周囲部分と裂創瘢痕部の比較では、有意差は認めなかった（p=0.21、p=0.68）。しかし、ESD後day 22であるコントロール狭窄モデルと筋層損傷例の周囲部分との比較では有意に狭窄モデルに壊死を多く認めた（p<0.001）。

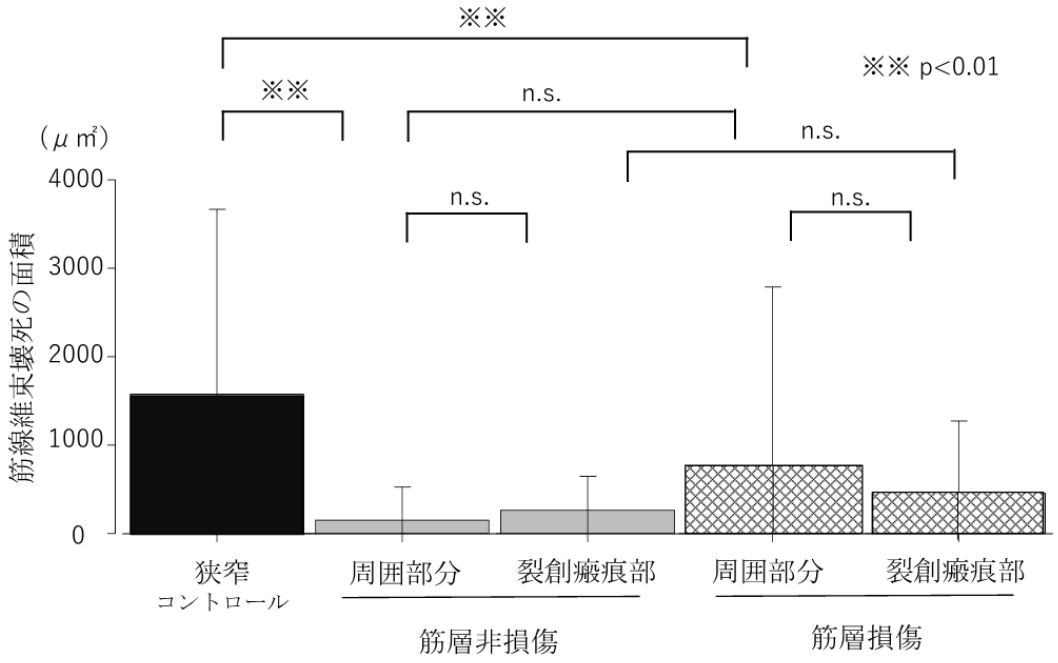


図17：ESD後day 43における筋層の熱変性の組織学的評価（Study 2　検討2-3)。内輪筋の筋線維束壊死の面積、ランダムに10箇所測定した（周囲部分)。裂創形成部2か所も測定した。

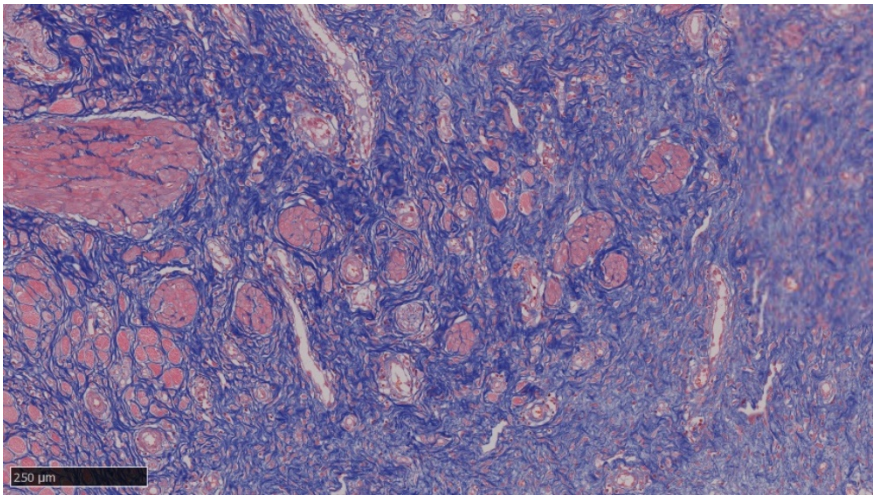


図 18：バルーン拡張後の再狭窄の組織学的評価。筋層損傷例の裂創形成部の拡大像。Masson's trichrome 染色。

結果のまとめ

検討 1-1：外縦筋の厚さの測定。狭窄コントロールモデルと拡張モデルの周囲部分は、筋層非損傷例、損傷例共に有意差を認めなかった。拡張時筋層非損傷例、損傷例共に、外縦筋は周囲部分より裂創部で有意に薄かった。

検討 1-2：内輪筋の壊死面積の測定。狭窄コントロールモデルと拡張時筋層非損傷例の周囲部分、粘膜下層裂創部直下は有意差を認めなかった。周囲部分と裂創部はそれぞれ、筋層非損傷例よりも筋層損傷例で有意差をもって著明に壊死面積が多くなっていた。筋層損傷例の筋層損傷部両側は、筋層損傷例の周辺部分との比較でも有意差をもって増えていた。さらに顕著に壊死面積が多いのは穿孔コントロールモデルであった。

検討 2-1：線維化叢の厚さの測定。筋層非損傷再狭窄例、筋層損傷再狭窄例の裂創部の線維化叢の厚さは、ぞれぞれの周囲部分、狭窄コントロールモデルと比較して有意差を認めなかった。

検討 2-2：筋層全層の厚さの測定。裂創瘢痕部では有意に薄くなっていた。

検討 2-3：内輪筋の壊死面積の測定。ESD 後 day 43 である筋層非損傷再狭窄例と筋層損傷再狭窄例はそれぞれ、周囲部分と裂創瘢痕部の比較では、有意差は認めなかった。しかし、ESD 後 day 22 であるコントロール狭窄モデルと筋層損傷例の周囲部分との比較では有意に狭窄モデルに壊死を多く認めた。

《第 1 章》
考　察

従来、食道癌は予後不良な疾患とされてきたが、早期に発見され、内視鏡治療された場合は良好な予後が望めることが明らかとなっている。最新の多施設共同前向き研究の結果では、食道粘膜内癌内視鏡切除症例330例の5年疾患特異生存割合は99.1 %と報告されている (Oda et al.,2020)。長期生存が可能なため、術後のQOLを保つことは重要であるが、最もQOLを損なう事象は食道狭窄である。近年、デバイスの改良や技術の向上により、サイズの大きな病変に対してもESDが行われるようになったため、術後狭窄のマネージメントは極めて大きな問題となっている(Berry MF., 2014 ; Toyonaga et al.,2013 ; Mizushima et al.,2015 ; Kosaka et al., 2014 ; Takahashi et al.,2010)。

ESD 後食道狭窄は、術後約 3 週間で完成し (Honda et al.,2010)、一般的にバルーン拡張で治療されるが、拡張時の穿孔や筋層損傷は、発症リスクを事前に予測することは困難である。ESD 後食道狭窄の合併症に関して Kishida らは食道癌 ESD 後内視鏡的拡張施行例 121 例の治療成績について、拡張回数中央値 7 回、拡張全期間中央値 86 日で、5 例 (4.1 %) に穿孔を来たし、穿孔発生日中央値は、ESD 後 18 日 (範囲 8 - 29 日) と、比較的早期であったことを報告している(Kishida et al.,2015)。

今回の Study 1 において、バルーン拡張時の筋層損傷例では、損傷部分内輪筋の筋線維束壊死が有意に多く認められ、穿孔モデルの穿孔部周囲に近い値であった。筋線維束壊死は、ESD 時の熱変性に起因するものと考えられる。術後 3 週間が経ち、完全瘢痕化しても壊死は残存し、その部分で筋層が脆弱化することが明らかとなった。また、Study 2 において、筋層損傷部はさらに拡張から 3 週間後の再狭窄完成後も回復していなかった。バルーン拡張時の筋層損傷は非可逆的になり、脆弱性がその後も持続すると考えられた。筋線維束壊死については、筋層損傷例、筋層非損傷例ともに day 22 で顕著に見られたが、Study 2 の day 43 では全く見られなくなっていた。筋線維束壊死は、ESD 3 週目以降に徐々に吸収、回復すると考えられた。したがって、ESD 時の手技により筋層が露出した場合や、壁外からの穿通枝血管を熱凝固処理した場合等、筋層への熱変性が疑われた症例に対しては、その後のバルーン拡張においても、初期のうちは細めの拡張で終了し、6 週以降に太めの拡張を行うのがよいと考えられた。

バルーン拡張における伸展効果として、外縦筋は筋層損傷例、非損傷例共に、裂創部のみで伸展していた。バルーン拡張時には、粘膜切開などで裂創の数を増やすことで筋層伸展部分も増やすことが効率的な拡張につながる可能性が考えられた。食道拡張時における粘膜切開に関しては、Hordijk らは、術後吻合部狭窄症例 62 例をブジー群と粘膜切開群にランダム化し、両者の成績が同等であることを報告し、両者の併用の有用性についても言及している(Hordijk et al.,2009)。また、Liu らは、術後吻合部狭窄など、狭窄長 1-3cm の、比較的狭窄長の短い難治性良性狭窄症例 7 例に対し、粘膜切開と一時的ステント挿入を併用し、良好な成績を報告している(Liu et al.,2015)。ESD 後狭窄のような、狭窄長の長い食道狭窄に対しても、バルーン拡張時に、あらかじめ粘膜切開を行うなど、粘膜下層裂創の箇所を増やすことが有用であると推察された。

バルーン拡張後の再狭窄時には、粘膜下層裂創部分の線維化叢は、拡張前と同様の状態に戻っており、周囲との違いが認められなかった。食道狭窄が難治性となる最大の理由は、拡張後の再狭窄であるが、バルーン拡張後の再狭窄予防について、Hanaoka らは、食道癌術後吻合部狭窄症例 65 例に対し、バルーン拡張時の裂創部ステロイド局注群と生食局注群とのランダム化試験を行い、ステロイド局注の再狭窄予防効果について報告している(Hanaoka et al.,2018)。狭窄長の長い ESD 後狭窄においてもバルーン拡張時には、裂創部へのステロイド局注や、後述する間葉系幹細胞培養上清等、再線維化予防のための何らかの介入が望ましいと考えられた。今後、これらの知見をもとに、生体ブタ食道狭窄モデルに対する追加介入併用のバルーン拡張実験を行う予定である。

結論として、今回の生体ブタ食道 ESD 後拡張実験より、筋層への熱変性は狭窄完成直後まで持続すること、一度、穿孔して損傷した筋層は完全には回復しないことが示され、また、拡張後の再狭窄予防には、狭窄部切開併用、ステロイド局注併用等の追加介入が効果的である可能性が示された。

《第2章》

緒　言

第1章において、ESD狭窄に対するバルーン拡張後の再狭窄時には、粘膜下層裂創部分の線維化叢は、拡張前と同様の状態に戻っており、周囲との違いが認められず、再狭窄予防には粘膜下線維層の切開やステロイドの局注などの追加の処置が必要である可能性が考えられた。しかし、食道狭窄に対する粘膜下線維化叢切開や裂創部へのステロイド局注は、手技的に容易なものではなく、また、それ自体が食道穿孔のリスクを有している。そこで、新たな再狭窄予防としてMSC-CM (mesenchymal stem cell - conditioned medium)の有用性を検討した。

近年、間葉系幹細胞 (MSC ; mesenchymal stem cell) は胚性幹細胞(ES細胞 ; embryonic stem cell)や人工多能性幹細胞(iPS 細胞; induced pluripotent stem cell)とともに、新しい再生医療材料として注目され、MSCを利用した治療は様々な臓器の再生医療において広範囲に研究されてきている。MSC は主に骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などの間葉系の細胞に分化する能力を有する非神経系の組織幹細胞の一つであり (Le Blanc et al.,2012 ; Pittenger et al., 1999 ; Schäffler et al.,2007)、様々な成長因子および抗炎症分子の分泌によって損傷した組織を改善する可能性を有することが報告されている(Uccelli et al.,2008 ; Doorn et al.,2012)。

再生医療材料として骨髄や脂肪由来のものが多く使用されているが、これらの採取には身体への侵襲を伴う上、一度の採取で得られる細胞数は少量であるため、移植に必要な細胞数を確保するには一定の培養期間を要する。また、加齢に伴いMSCの増殖能は低下するため、ドナーが高齢だった場合や、様々な疾患を持った患者から採取する場合などは、治療に必要な量の質の高い細胞を獲得することは難しい可能性がある (Stolzing and Scutt, 2006)。そのため、新たな細胞ソースとして羊膜由来のMSC (AMSC ; amnion-derived MSC) が注目されている。胎児を包む卵膜は、羊膜と絨毛膜から構成されており、特にヒトの羊膜には非常に豊富な MSC が含まれており、より若い細胞を大量に獲得できるという利点がある。また卵膜自体は出産後に医療廃棄物として廃棄されるため、非侵襲的に採取可能であり、倫理的な問題も軽減できる。さらに羊膜は造血細胞や血管が 少なく細胞成分が均一であり、膜状構造であるため、用手的に羊膜と絨毛膜を分離することが可能であり、また、酵素処理を行なうことで容易に MSC を分離、培養することができる。このことから様々な研究がすすんでおり、これまで下肢虚血モデル(Ishikane et al.,2008)、心筋炎モデル

(Ishikane et al.,2010)、糸球体腎炎モデル(Tsuda et al.,2010)、腎虚血再灌流障害モデル(Tsuda aet al., 2014)、腸炎モデル(Onishi et al., 2015 ; Miyamoto et al.,2017)、放射線性直腸炎モデル(Ono et al.,2015)、膵炎モデル(Kawakubo et al.,2016)、肝硬変モデル (Kubo et al.,2015)、非アルコール性肝炎モデル (Ohara et al.,2018) 、硬化性胆管炎モデル (Sugiura et al.,2018) などの疾患動物モデルにおいて、AMSC から放出された分泌因子を介して血管新生促進や抗炎症効果、線維化抑制効果により病態が改善したことが報告されている。また、MSC から分泌される炎症抑制などに関与する様々な液性因子が細胞培養上清(CM ; conditioned medium)に含有され、in vivo での炎症抑制作用が報告されている (Osugi et al.,2012)。

Mizushima らは羊膜由来幹細胞より抽出した MSC-CM が炎症細胞浸潤、線維化を抑制し、ブタの食道 ESD 後モデルに経口摂取させ潰瘍底に塗布することで ESD 後狭窄を抑制することを報告している(Mizushima et al.,2017)。仮にバルーン拡張後の再狭窄が、ESD 後狭窄と類似の組織反応により引き起こされるならば、MSC-CM はバルーン拡張後再狭窄抑制の効果も有していることが期待される。第 1 章の結果より、ESD 後狭窄バルーン拡張に対して追加の処置として、MSC-CM の効果を検討した。

《第 2 章》

方　法

１．動物　　第 1 章と同様
２．ESD 方法　　第 1 章と同様
３．バルーン拡張　　第 1 章と同様

４．羊膜由来間葉系幹細胞の分離･培養

羊膜由来間葉系幹細胞の分離･培養試薬及び材料

・Collagenase　(Nippi、Tokyo、Japan)
・Dispase I　(Wako Pure Chemical Industries、Osaka、Japan)
・羊膜 MSC 培養培地　(KANEKA CORPORATION、Tokyo、Japan)
・羊膜 MSC 基礎培地　(KANEKA CORPORATION、Tokyo、Japan)
・PBS　(Life Technologies、Tokyo、Japan)
・Gentamicin　(MSD、Tokyo、Japan)
・0.5% trypsin-EDTA　(Life Technologies、Tokyo、Japan)

卵膜の採取は北海道大学大学院医学研究科における倫理委員会の承認を得て行った(承認番号：8)。また卵膜を提供して頂いた全ての妊婦の同意を得て行った。帝王切開で胎児を娩出後、剪刃で卵膜を 5 cm 四方に切り、用手的に羊膜と絨毛膜に分けた。羊膜を PBS で洗浄後、collagenase (40 μg/ml)と dispase I (200 PU/ml)を添加し 37 ℃で 1 時間振盪させ、結合組織を消化し細胞を分離した。その後、15 cm uncoated plastic dish に 1.0 × 10^6 cells/cm^2 の細胞数を播種し、羊膜 MSC 培養液を用いて 20 ml を加えて、室温 37 ℃ ・ 湿度 95 %、二酸化炭素濃度 5 %下で培養を行った。

５．ヒト羊膜由来間葉系幹細胞の培養上清 (CM ； conditioned medium) ゲルの作成

試薬及び材料

・FBS (Life Technologies、Tokyo、Japan)
・PBS (Life Technologies、Tokyo、Japan)
・羊膜 MSC 培養液 (KANEKA CORPORATION、Tokyo、Japan)
・羊膜 MSC 基礎培地 (KANEKA CORPORATION、Tokyo、Japan)
・Carboxymethyl cellulose (CMC、Wako Pure Chemical Industries、Osaka、Japan)

3 継代目の AMSC を 15 cm uncoated plastic dish に播種し、羊膜 MSC 培養液 20 ml を用いて 100 % confluent になるまで培養した。その後、上清を吸引除去し、PBS で合計 2 回の洗浄を行い、無血清の羊膜 MSC 基礎培地 20 ml を用いて 48 時間培養を継続した。48 時間後に 15 cm dish から CM を吸引して、50 ml チューブに回収した。回収した CM を 2,500 rpm、室温で 5 分間遠心し、これを CM とした。次に、回収した CM を用いて 5 % 濃度の carboxymethyl cellulose を加えて 4 ℃下で静置させ、これを MSC-CM ゲルとした。

６．実験プロトコル

Study 3　食道バルーン拡張後 MSC-CM 塗布、再狭窄時の組織学的検討

ESD 後狭窄に対してバルーン拡張施行例とバルーン拡張に MSC-CM 塗布を加えたものを比較する。

④ コントロール (第 1 章④再狭窄モデル)

⑤ MSC-CM 塗布

⑤MSC-CM 塗布モデルを作成する。④再狭窄モデルと同様に ESD 施行後狭窄の完成する day 22 にバルーン拡張を行う。拡張後直接 MSC-CM ゲルを塗布した。MSC-CM ゲルの投与は 1 日 2 回、期間は day 22-25 とし、バルーン拡張後は直接塗布、2 回目以降は経口投与とした。day 43 で内視鏡で創部を確認し、サクリファイスした。

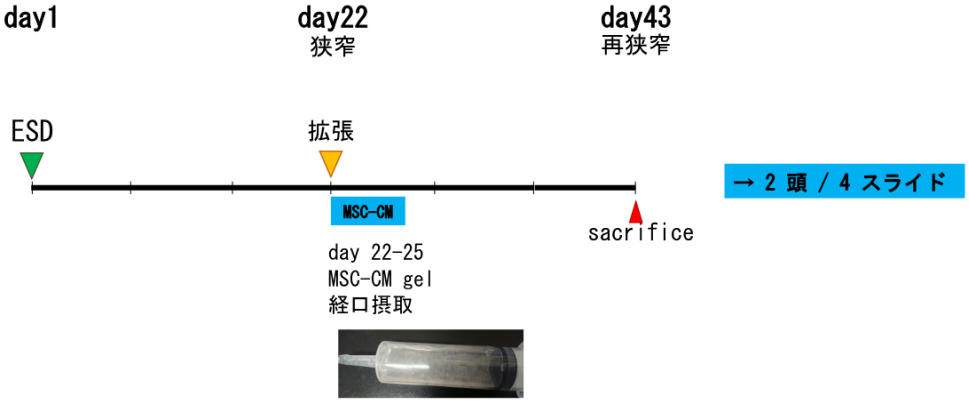


図 19：実験プロトコル。
ESD day 22 にバルーン拡張に加え day 22-25 に MSC-CM を塗布した。その後 3 週間経過観察し、day 43 にサクリファイスした。再狭窄の組織学的評価を行うため 2 例を作成した(Study 3)。

7．計測項目

Study 3　MSC-CM ゲル塗布後再狭窄時の組織学的検討

検討 3-1: 開存率の評価として、
最狭窄部の長さ／狭窄部から 2 cm口側の長さ×100 (%)
を計算して比較する。

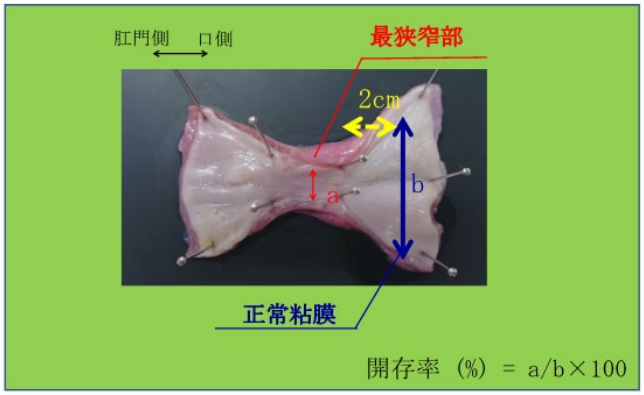


図 20：開存率の計測方法。

検討 3-2: 検討 2-1 と同様に再狭窄の評価として、線維化叢の厚さを周囲部分としてランダムに 10 か所計測し、比較した。

検討 3-3: 検討 2-3 と同様に筋層ダメージの指標として、1 視野あたりの筋線維束壊死の数を計測した。内輪筋を周囲部分としてランダム 10 か所計測し、比較した。

８．組織学的検討　第 1 章と同様
９．統計学的検討　第 1 章と同様

《第 2 章》
結　果

検討 3-1: 内視鏡開存率について day 43 の内視鏡観察では、いずれの症例も食道径はピンホール状となり、通過は不可能であった。開存率は再狭窄モデル 35.1 %、16 %、21.2 %、32.5 %、MSC-CM 塗布モデルは 24.3 %、22.2 %であり、差は認めなかった。

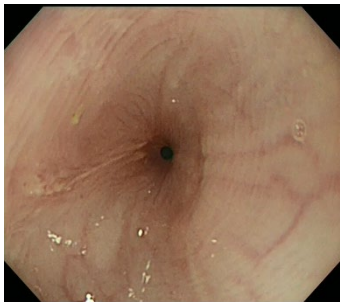
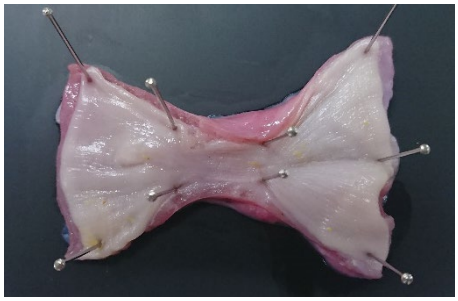



図 21：MSC-CM モデルの day 43 における内視鏡像、検体写真

検討3-2: 線維叢の厚さ（再狭窄の評価）について、拡張時筋層非損傷再狭窄例では周囲部分は1359±196 μm 、筋層損傷再狭窄例では周囲部分は1457±253 μmであった（Study 2 検討2-1)。MSC-CM塗布モデルでは周囲部分は1249±407 μmであった。

線維層の厚さは、再狭窄モデル（筋層非損傷例、筋層損傷例）の周囲部分はMSC-CM塗布モデルの周囲モデルと比較していずれも同等で有意差は認めなかった（p=0.18、0.54)。

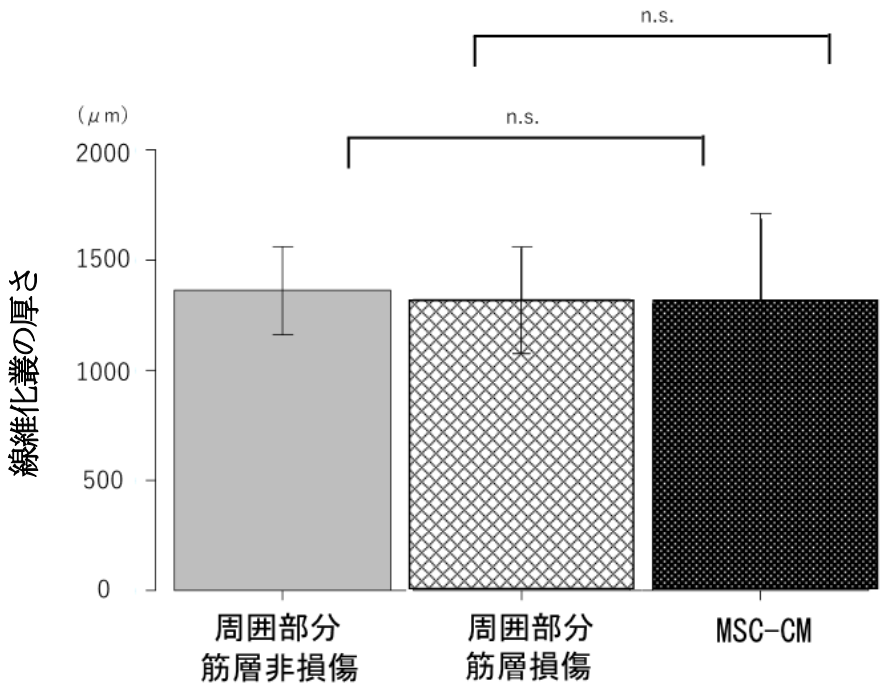


図22：MSC-CM投与時の再狭窄の組織学的評価。
Study 2 検討2-1に準じ、線維化叢をランダムに10か所測定した。Study 2の筋層非損傷例、筋層損傷例の周囲部分と比較した。

検討3-3:内輪筋内の筋線維束壊死面積（筋層ダメージの指標）は再狭窄モデルで拡張時筋層非損傷再狭窄例は周囲部分は1.5±3.7×10²μ ㎡、筋層損傷再狭窄例は周囲部分は7.4±20.2×10²μ ㎡（Study 2 検討 2-3）であった。MSC-CM塗布モデルは3.4±7.5×10²μ ㎡であった。

ESD後day 43である再狭窄モデル（筋層非損傷再狭窄例と筋層損傷再狭窄例）の周囲部分とMSC-CM塗布モデルの比較では有意差は認めなかった（p=0.15、p=0.94）。

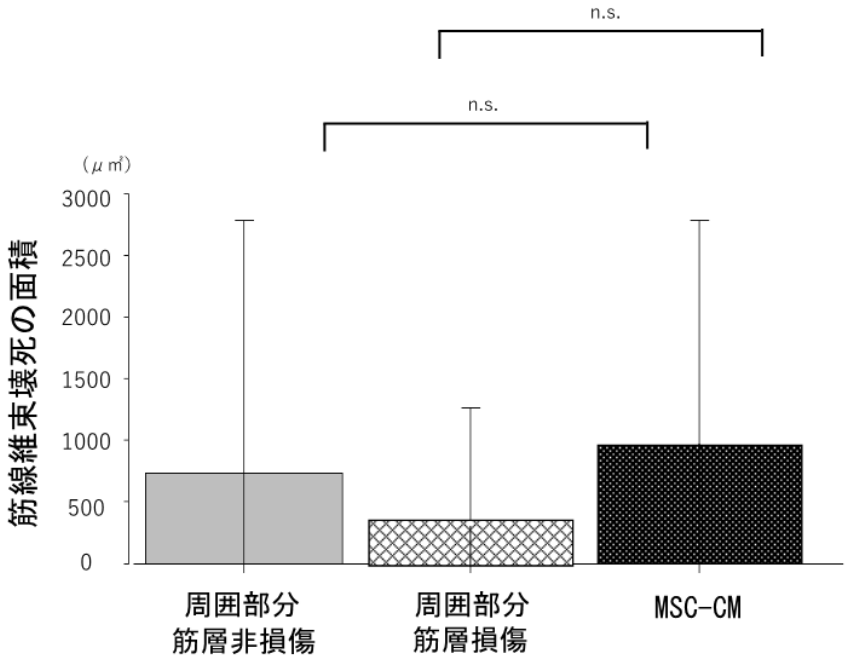


図23：MSC-CM投与時の熱変性の組織学的評価。
Study 2 検討 2-3に準じ、内輪筋の筋線維束の壊死面積を10か所測定した。Study 2の筋層非損傷例、筋層損傷例の周囲部分と比較した。

《第2章》
考　察

第1章では筋層壊死についてはESD後3週目以降で徐々に吸収、回復すると考えられ、バルーン拡張後の再狭窄時には、粘膜下層裂創部分の線維化叢は、拡張前と同様の状態に戻っており、周囲との違いが認められなかった。MSC-CMをバルーン裂創部に塗布、経口投与をしたものでも、筋層壊死の面積、線維化叢の厚さはいずれも第1章Study 2で示した再狭窄モデルと同等であった。

Mizushimaらは、3/4 周性のESD後の潰瘍にMSC-CMを経口摂取、塗布させることで狭窄率、線維化を抑制したが、それに加え、急性期の炎症も抑制できることを確認している(Mizushima et al.,2017)。今回、第1章において、ESD後3週間が経過して狭窄をきたした時点と6週間後の再狭窄時点では線維化叢の厚さに差は認めていない。MSC-CMを塗布した症例においても線維化叢の厚さには差はなく、再狭窄においては筋線維芽細胞の活性低下や線維化抑制には働かなかったと思われる。狭窄の起こる機序と再狭窄が起こる機序としては、同様の過程を経ているとは考えられるが、今回有効でなかったのは、MSC-CMの塗布面積が狭いことが考えられる。ESD直後の潰瘍の場合は、潰瘍底一面にゲルの塗布ができる。4日間にわたる経口摂取中も、潰瘍底の面積は保たれているため、投与期間中は潰瘍底に十分量のMSC-CMが付着することができたと考えられる。MSC-CMの効果を得るには、炎症が起こる部位にとどまることが必要と思われるが、今回はバルーン拡張でできる裂創部は周在の一部であり、MSC-CMがとどまることができる面積が少ない上、裂創ができていない線維化叢の面ではMSC-CMの効果が得られなかったため、再狭窄予防としての効果が少なかったと考えられる。

第1章で再狭窄予防の方法としてバルーン拡張時に、あらかじめ粘膜切開を行うなど、粘膜下層裂創の箇所を増やすことが有用である可能性について述べたが、MSC-CMを使用する場合も、塗布面積が増えるような切開処置を加えることで効果が向上することも想定される。また、バルーン拡張や拡張後ステロイド局注においても、繰り返し処置をすることで治療効果が得られており、MSC-CM投与も同様に繰り返し投与することで効果が得られる可能性も考えられる。今後、追加の検討を行っていく予定である。

結　論

・ESD 施行中の熱変性により筋線維束壊死が起こる。
・ESD 術後 3 週間が経ち、完全瘢痕化しても壊死は残存し、その部分で筋層が脆弱化する。
・筋層損傷部は ESD 6 週後の再狭窄完成後も回復せず、バルーン拡張時の筋層損傷は非可逆的になり、脆弱性がその後も持続する。
・筋線維束壊死は、ESD 3 週目以降に徐々に吸収、回復する。
・バルーン拡張における伸展効果として、外縦筋は粘膜下層裂創部のみで伸展する。
・バルーン拡張後の再狭窄時には、粘膜下層裂創部分の線維化叢は拡張前と同様の状態に戻る。
・バルーン後再狭窄の予防として、我々の投与方法では MSC-CM の塗布では効果が得られなかった。

実臨床でバルーン拡張を行う際には、ESD 時の熱変性の程度、バルーン拡張の時期によって、慎重に対応していく必要性があることが示唆された。バルーン拡張のみでは線維化叢は拡張前と同様の状態に戻るため、拡張後の再狭窄予防には、バルーン拡張だけではなく狭窄部切開併用、ステロイド局注併用、もしくはその両方が必要である可能性が示された。今後、バルーン拡張だけではなくステロイド併用、切開併用の有用性を確認する実験を行っていきたい。また、Study 3 における MSC-CM の投与方法では再狭窄予防の効果が得られなかったが、塗布面積を増やすために切開を加える、回数を増やすこと等で効果が得られるかどうかについても検討していきたい。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、御指導・御助言をいただいた、北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野　坂本直哉教授に深く感謝申し上げます。

研究に対して素人であった私に、本研究の機会を与えて下さるとともに実験方法、データ解析、論文作成などあらゆる面において御指導・御援助を賜りました、北海道大学病院　光学医療診療部　清水勇一准教授に心より感謝申し上げます。

本研究の機会を与えて下さり、実験にあたり御指導、御助言をいただきました、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室　大西俊介准教授に深く感謝申し上げます。

本実験において、御指導・御協力いただいた北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室　大野正芳助教、楊子健先生、北海道大学病院先進消化器がん分子標的治療・予防学研究部門　山本幸司特任助教、独立行政法人国立病院機構 函館病院　津田桃子先生に深く感謝申し上げます。

また、本研究を支えて下さった消化器内科学分野の皆様に感謝申し上げます。

最後に、本研究に尊い生命を提供していただきました実験動物諸霊に深く感謝いたします。

利益相反

この研究で使用した食道拡張用バルーン CRE™ Fixed Wire Balloon Dilators ［Esophageal］は Boston Scientific 社から提供を受けたものである。

第 2 章で使用した羊膜 MSC 培養液、羊膜 MSC 基礎培地は株式会社カネカより提供を受けたものである。

引用文献リスト

Berry, M.F. (2014). Esophageal cancer: staging system and guidelines for staging and treatment. J Thorac Dis. *6*, 289-297.

Doorn, J., Moll, G., Le Blanc, K., van Blitterswijk, C., and de Boer, J. (2012). Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. Tissue Eng Part B Rev. *18*, 101-115.

Ezoe, Y., Muto, M., Horimatsu, T., Morita, S., Miyamoto, S., Mochizuki, S., Minashi, K., Yano, T., Ohtsu, A., and Chiba, T. (2011). Efficacy of preventive endoscopic balloon dilation for esophageal stricture after endoscopic resection. J Clin Gastroenterol. *45*, 222-227.

Hanaoka, N., Ishihara, R., Motoori, M., Takeuchi, Y., Uedo, N., Matsuura, N., Hayashi, Y., Yamada, T., Yamashina, T., Higashino, K., et al. (2018). Endoscopic Balloon Dilation Followed By Intralesional Steroid Injection for Anastomotic Strictures After Esophagectomy: A Randomized Controlled Trial. Am J Gastroenterol. *113*, 1468-1474.

Hanaoka, N., Ishihara, R., Takeuchi, Y., Uedo, N., Higashino, K., Ohta, T., Kanzaki, H., Hanafusa, M., Nagai, K., Matsui, F., et al. (2012). Intralesional steroid injection to prevent stricture after endoscopic submucosal dissection for esophageal cancer: a controlled prospective study. Endoscopy. *44*, 1007-1011.

Hashimoto, S., Kobayashi, M., Takeuchi, M., Sato, Y., Narisawa, R., and Aoyagi, Y. (2011). The efficacy of endoscopic triamcinolone injection for the prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection. Gastrointest Endosc. *74*, 1389-1393.

Honda, M., Nakamura, T., Hori, Y., Shionoya, Y., Nakada, A., Sato, T., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., et al. (2010). Process of healing of mucosal defects in the esophagus after endoscopic mucosal resection: histological evaluation in a dog model. Endoscopy. *42*, 1092-1095.

Hordijk, M.L., van Hooft, J.E., Hansen, B.E., Fockens, P., and Kuipers, E.J. (2009). A randomized comparison of electrocautery incision with Savary bougienage for relief of anastomotic gastroesophageal strictures. Gastrointest Endosc. *70*, 849-855.

Iizuka, H., Kakizaki, S., Sohara, N., Onozato, Y., Ishihara, H., Okamura, S., Itoh, H., and Mori, M. (2010). Stricture after endoscopic submucosal dissection for early gastric cancers and adenomas. Dig Endosc. *22*, 282-288.

Ishihara, R., Tanaka, H., Iishi, H., Takeuchi, Y., Higashino, K., Uedo, N., Tatsuta, M., Yano, M., and Ishiguro, S. (2008). Long-term outcome of esophageal mucosal squamous cell carcinoma without lymphovascular involvement after endoscopic resection. Cancer. *112*, 2166-2172.

Ishikane, S., Ohnishi, S., Yamahara, K., Sada, M., Harada, K., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Kitamura, S., Nagaya, N. et al. (2008). Allogeneic injection of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells induces therapeutic angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. Stem Cells. *26*, 2625-2633.

Ishikane, S., Yamahara, K., Sada, M., Harada, K., Kodama, M., Ishibashi-Ueda, H., Hayakawa, K., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., et al. (2010). Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. J Mol Cell Cardiol. *49*, 753-761.

Kadota, T., Yano, T., Kato, T., Imajoh, M., Noguchi, M., Morimoto, H., Osera, S., Yoda, Y., Oono, Y., Ikematsu, H., et al. (2016). Prophylactic steroid administration for strictures after endoscopic resection of large superficial esophageal squamous cell carcinoma. Endosc Int Open. *4*, E1267-E1274.

Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. Bone Marrow Transplant. *48*, 452-458.

Katada, C., Muto, M., Manabe, T., Boku, N., Ohtsu, A., and Yoshida, S. (2003). Esophageal stenosis after endoscopic mucosal resection of superficial esophageal lesions. Gastrointest Endosc. *57*, 165-169.

Katada, C., Muto, M., Momma, K., Arima, M., Tajiri, H., Kanamaru, C., Ooyanagi, H., Endo, H., Michida, T., Hasuike, N., et al. (2007). Clinical outcome after endoscopic mucosal resection for esophageal squamous cell carcinoma invading the muscularis mucosae--a multicenter retrospective cohort study. Endoscopy. *39*, 779-783.

Kawakubo, K., Ohnishi, S., Fujita, H., Kuwatani, M., Onishi, R., Masamune, A., Takeda, H., and Sakamoto, N. (2016). Effect of Fetal Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Rats With Acute and Chronic Pancreatitis. Pancreas. *45*, 707-713.

Kishida, Y., Kakushima, N., Kawata, N., Tanaka, M., Takizawa, K., Imai, K., Hotta, K., Matsubayashi, H., and Ono, H. (2015). Complications of endoscopic dilation for esophageal stenosis after endoscopic submucosal dissection of superficial esophageal cancer. Surg Endosc. *29*, 2953-2959.

Kobayashi, S., Kanai, N., Ohki, T., Takagi, R., Yamaguchi, N., Isomoto, H., Kasai, Y., Hosoi, T., Nakao, K., Eguchi, S., et al. (2014). Prevention of esophageal strictures after endoscopic submucosal dissection. World J Gastroenterol. *20*, 15098-15109.

Kosaka, T., Endo, M., Toya, Y., Abiko, Y., Kudara, N., Inomata, M., Chiba, T., Takikawa, Y., Suzuki, K., and Sugai, T. (2014). Long-term outcomes of endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer: a single-center retrospective study. Dig Endosc. *26*, 183-191.

Kubo, K., Ohnishi, S., Hosono, H., Fukai, M., Kameya, A., Higashi, R., Yamada, T., Onishi, R., Yamahara, K., Takeda, H., et al. (2015). Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Liver Fibrosis in Rats. Transplant Direct. *1*, e16.

Le Blanc, K., and Mougiakakos, D. (2012). Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. Nat Rev Immunol. *12*, 383-396.

Liu, D., Tan, Y., Wang, Y., Zhang, J., Zhou, J., Duan, T., and Wang, X. (2015). Endoscopic incision with esophageal stent placement for the treatment of refractory benign esophageal strictures. Gastrointest Endosc. *81*, 1036-1040.

Min, Y.W., Lee, H., Song, B.G., Min, B.H., Kim, H.K., Choi, Y.S., Lee, J.H., Hwang, N.Y., Carriere, K.C., Rhee, P.L., et al. (2018). Comparison of endoscopic submucosal dissection and surgery for superficial esophageal squamous cell carcinoma: a propensity score-matched analysis. Gastrointest Endosc. *88*, 624-633.

Miwata, T., Oka, S., Tanaka, S., Kagemoto, K., Sanomura, Y., Urabe, Y., Hiyama, T., and Chayama, K. (2016). Risk factors for esophageal stenosis after entire circumferential endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal squamous cell carcinoma. Surg Endosc. *30*, 4049-4056.

Miyamoto, S., Ohnishi, S., Onishi, R., Tsuchiya, I., Hosono, H., Katsurada, T., Yamahara, K., Takeda, H., and Sakamoto, N. (2017). Therapeutic effects of human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation and

conditioned medium enema in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. Am J Transl Res. *9*, 940-952.

Mizushima, T., Kato, M., Iwanaga, I., Sato, F., Kubo, K., Ehira, N., Uebayashi, M., Ono, S., Nakagawa, M., Mabe, K., et al. (2015). Technical difficulty according to location, and risk factors for perforation, in endoscopic submucosal dissection of colorectal tumors. Surg Endosc. *29*, 133-139.

Mizushima, T., Ohnishi, S., Hosono, H., Yamahara, K., Tsuda, M., Shimizu, Y., Kato, M., Asaka, M., and Sakamoto, N. (2017). Oral administration of conditioned medium obtained from mesenchymal stem cell culture prevents subsequent stricture formation after esophageal submucosal dissection in pigs. Gastrointest Endosc. *86*, 542-552.

Nagami, Y., Ominami, M., Shiba, M., Sakai, T., Fukunaga, S., Sugimori, S., Otani, K., Hosomi, S., Tanaka, F., Taira, K., et al. (2018). Prediction of esophageal stricture in patients given locoregional triamcinolone injections immediately after endoscopic submucosal dissection. Dig Endosc. *30*, 198-205.

Nagami, Y., Shiba, M., Ominami, M., Sakai, T., Minamino, H., Fukunaga, S., Sugimori, S., Tanaka, F., Kamata, N., Tanigawa, T., et al. (2017). Single Locoregional Triamcinolone Injection Immediately After Esophageal Endoscopic Submucosal Dissection Prevents Stricture Formation. Clin Transl Gastroenterol. *8*, e75.

Oda, I., Shimizu, Y., Yoshio, T., Katada, C., Yokoyama, T., Yano, T., Suzuki, H., Abiko, S., Takemura, K., Koike, T., et al. (2020). Long-term outcome of endoscopic resection for intramucosal esophageal squamous cell cancer: a secondary analysis of the Japan Esophageal Cohort Study. Endoscopy. *52*, 967-975.

Ohara, M., Ohnishi, S., Hosono, H., Yamamoto, K., Yuyama, K., Nakamura, H., Fu, Q., Maehara, O., Suda, G., and Sakamoto, N. (2018). Extracellular

Vesicles from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Inflammation and Fibrosis in Rats. Stem Cells Int. *2018*, 3212643.

Ohara, Y., Toyonaga, T., Tanaka, S., Ishida, T., Hoshi, N., Yoshizaki, T., Kawara, F., Lui, K.L., Tepmalai, K., Damrongmanee, A., et al. (2016). Risk of stricture after endoscopic submucosal dissection for large rectal neoplasms. Endoscopy. *48*, 62-70.

Onishi, R., Ohnishi, S., Higashi, R., Watari, M., Yamahara, K., Okubo, N., Nakagawa, K., Katsurada, T., Suda, G., Natsuizaka, M., et al. (2015). Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Severe Colitis in Rats. Cell Transplant. *24*, 2601-2614.

Ono, M., Ohnishi, S., Honda, M., Ishikawa, M., Hosono, H., Onishi, R., Nakagawa, K., Takeda, H., and Sakamoto, N. (2015). Effects of human amnion-derived mesenchymal stromal cell transplantation in rats with radiation proctitis. Cytotherapy. *17*, 1545-1559.

Ono, S., Fujishiro, M., Niimi, K., Goto, O., Kodashima, S., Yamamichi, N., and Omata, M. (2009). Predictors of postoperative stricture after esophageal endoscopic submucosal dissection for superficial squamous cell neoplasms. Endoscopy. *41*, 661-665.

Osugi, M., Katagiri, W., Yoshimi, R., Inukai, T., Hibi, H., and Ueda, M. (2012). Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. Tissue Eng Part A. *18*, 1479-1489.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. *284*, 143-147.

Sato, H., Inoue, H., Kobayashi, Y., Maselli, R., Santi, E.G., Hayee, B., Igarashi, K., Yoshida, A., Ikeda, H., Onimaru, M., et al. (2013). Control of severe strictures after circumferential endoscopic submucosal dissection for esophageal carcinoma: oral steroid therapy with balloon dilation or balloon dilation alone. Gastrointest Endosc. *78*, 250-257.

Schäffler, A., and Büchler,C. (2007). Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. Stem Cells. *25*, 818-827.

Stolzing, A., and Scutt, A. (2006). Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. Aging Cell. *5*, 213-224.

Sugiura, R., Ohnishi, S., Ohara, M., Ishikawa, M., Miyamoto, S., Onishi, R., Yamamoto, K., Kawakubo, K., Kuwatani, M., and Sakamoto, N. (2018). Effects of human amnion-derived mesenchymal stem cells and conditioned medium in rats with sclerosing cholangitis. Am J Transl Res. *10*, 2102-2114.

Tachimori, Y., Ozawa, S., Numasaki, H., Ishihara, R., Matsubara, H., Muro, K., Oyama, T., Toh, Y., Udagawa, H., Uno, T., et al. (2019). Comprehensive registry of esophageal cancer in Japan, 2012. Esophagus. *16*, 221-245.

Takahashi, H., Arimura, Y., Masao, H., Okahara, S., Tanuma, T., Kodaira, J., Kagaya, H., Shimizu, Y., Hokari, K., Tsukagoshi, H., et al. (2010). Endoscopic submucosal dissection is superior to conventional endoscopic resection as a curative treatment for early squamous cell carcinoma of the esophagus (with video). Gastrointest Endosc. *72*, 255-264.

Takahashi, H., Arimura, Y., Okahara, S., Uchida, S., Ishigaki, S., Tsukagoshi, H., Shinomura, Y., and Hosokawa, M. (2011). Risk of perforation during dilation for esophageal strictures after endoscopic resection in patients with early squamous cell carcinoma. Endoscopy. *43*, 184-189.

Takahashi, K., Fujiya, M., Ueno, N., Saito, T., Sugiyama, Y., Murakami, Y., Iwama, T., Sasaki, T., Ijiri, M., Tanaka, K., et al. (2019). White coat status is a predictive marker for post-esophageal endoscopic submucosal dissection stricture: a retrospective study. Esophagus. *16*, 258-263.

Toyonaga, T., Man-i, M., East, J.E., Nishino, E., Ono, W., Hirooka, T., Ueda, C., Iwata, Y., Sugiyama, T., Dozaiku, T., et al. (2013). 1,635 Endoscopic submucosal dissection cases in the esophagus, stomach, and colorectum: complication rates and long-term outcomes. Surg Endosc. *27*, 1000-1008.

Tsuda, H., Yamahara, K., Ishikane, S., Otani, K., Nakamura, A., Sawai, K., Ichimaru, N., Sada, M., Taguchi, A., Hosoda, H., et al. (2010). Allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells contribute to renal repair in experimental glomerulonephritis. Am J Physiol Renal Physiol. *299*, F1004-1013.

Tsuda, H., Yamahara, K., Otani, K., Okumi, M., Yazawa, K., Kaimori, J.Y., Taguchi, A., Kangawa, K., Ikeda, T., Takahara, S., et al. (2014). Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. Cell Transplant. *23*, 889-899.

Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol. *8*, 726-736.

Yamaguchi, N., Isomoto, H., Nakayama, T., Hayashi, T., Nishiyama, H., Ohnita, K., Takeshima, F., Shikuwa, S., Kohno, S., and Nakao, K. (2011). Usefulness of oral prednisolone in the treatment of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal squamous cell carcinoma. Gastrointest Endosc. *73*, 1115-1121.

Yu, J.P., Liu, Y.J., Tao, Y.L., Ruan, R.W., Cui, Z., Zhu, S.W., and Shi, W. (2015). Prevention of Esophageal Stricture After Endoscopic Submucosal Dissection: A Systematic Review. World J Surg. *39*, 2955-2964.

小田一郎, 阿部清一郎, 野中哲, 鈴木晴久, 吉永繁高, 斎藤豊. (2016). 食道癌治療後良性狭窄に対する内視鏡治療のコツ. 日本消化器内視鏡学会雑誌 *58*, 1250-8.

竹内学, 橋本哲, 小林正明, 佐藤祐一, 成澤林太郎, 青柳豊. (2011). 食道 ESD 後の狭窄対策. 日本消化器内視鏡学会雑誌 *53*, 3064-72.

日本食道学会. (2018). 内視鏡治療. 食道癌診療ガイドライン 2017 年版, 非特定非営利活動法人　日本食道学会編. (東京, 日本 : 金原出版株式会社), pp41-45.

国立がん研究センターがん対策情報センターがん情報サービス
(https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/index.html　2020.10.1)