

令和 6 年 6 月 2 9 日現在

機関番号：3 2 6 4 3

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：1 8 K 0 9 4 9 4

研究課題名（和文）吸引脂肪組織の酸素化による生着率の高い新規脂肪注入移植法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel autologous fat grafting method with high engraftment rate by oxygenation of aspirated adipose tissue.

研究代表者

堂後 京子（佐々木京子）（Dogo, Kyoko）

帝京大学・医学部・病院准教授

研究者番号：0 0 6 2 2 2 9 2

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：自家脂肪注入移植による組織増大法は優れた方法であるが、脂肪細胞は虚血により障害されやすいため生着率が低く治療効果が不安定である。脂肪壊死に伴う石灰化等の問題も存在する。本研究では、移植前に吸引脂肪組織を酸素化することで細胞死を抑制し、生着率が高く長期間安定な新たな脂肪注入移植法の開発を目指した。

ヒトから採取した吸引脂肪組織を高濃度酸素化液体に浸漬し、組織酸素分圧の向上が確認され、ヌードマウスへの移植実験では、移植後3ヶ月の経過観察期間において有害性は認められなかったが、移植脂肪の生着率に有意差が認められず酸素化の有効性は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、液体による組織への高度酸素供給技術の有効性を検証するものである。研究成果として、高い酸素溶解能を持つパーフルオロケミカル（PFC）のほか、生理食塩水および乳酸化リンゲル液等の細胞外液補充液でも高濃度酸素化が可能であることが示された。

この技術が実用化すれば、血流を介さずに効率的に酸素を供給できるため、血流障害のある組織・臓器や、血流が断たれた遊離組織・臓器の酸素化が可能となる。臨床応用として、組織・臓器移植や保存、創傷治癒、虚血性疾患、難治性潰瘍の治療に関連する新規治療法や医療機器の開発に発展する可能性がある。また、再生医療や細胞生物学、組織工学の分野での基礎研究への応用も見込まれる。

研究成果の概要（英文）：Autologous fat grafting for tissue augmentation is an excellent method, but the low engraftment rate due to the susceptibility of adipocytes to ischemic damage results in unstable therapeutic effects. In addition, calcification associated with fat necrosis is also a problem. This study aimed to develop a new fat grafting method that suppresses cell death and achieves a high and stable long-term engraftment rate by oxygenating the aspirated fat tissue before transplantation.

Aspirated fat tissue obtained from humans was immersed in a highly oxygenated liquid, and an increase in tissue oxygen partial pressure was confirmed. In transplantation experiments with nude mice, no adverse effects were observed during a three-month follow-up period post-transplantation. However, no significant difference in engraftment rates was observed, and the efficacy of oxygenation could not be confirmed.

研究分野：形成外科学

キーワード：脂肪注入移植 吸引脂肪 パーフルオロケミカル 酸素化 酸素供給 移植 脂肪注入移植モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

自家脂肪注入移植による軟部組織増大術は、免疫反応や異物反応がなく、低侵襲に反復して施行できる優れた方法である。しかし、脂肪細胞は虚血により障害されやすいため生着率が50%前後と低く治療効果が不安定である上に、脂肪壊死に伴う石灰化、硬化、嚢胞形成を生じることが依然として問題となっている。そこで、移植前の低酸素状態にある吸引脂肪組織を酸素化することにより細胞死を抑制し、生着率の向上が期待できると考えた。

生体組織の酸素化の役割を担っているのは血液中のヘモグロビンであるが、その代替物質として古くから注目されてきたのがパーフルオロカーボン (Perfluorocarbon: PFC) である。PFC は有機フッ素化合物で無色透明無臭の液体、酸素溶解能が水の20倍と非常に高く、化学的に不活性で安定していることから、1960年代以降、人工血液や液体呼吸技術として多くの臨床研究が行われてきた。PFC の一種である Alcon 社のパーフルオロン®は、本邦でも現在、網膜硝子体手術における一時的充填材料として注入が認められ保険適応となっている。

先行研究において、独自に製作した酸素加圧タンク (日東金属工業株式会社) を用いて PFC を酸素加圧して作成した高濃度酸素化 PFC にラットの組織を直接浸漬させることで、皮膚欠損部の局所組織を酸素化できることを確認した。さらに、組織移植において組織保存能と生着率の向上、創傷治癒促進効果を示すことを明らかにした (挑戦的萌芽研究 2012-2015 課題番号 24659788)。この液体浸漬による組織酸素化技術を応用し、移植前の吸引脂肪組織を高濃度酸素化液体と混合して酸素化したのちに注入移植する手法によって生着率が向上すれば、脂肪壊死に伴う合併症を軽減し、長期間安定な脂肪注入移植法が確立できると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

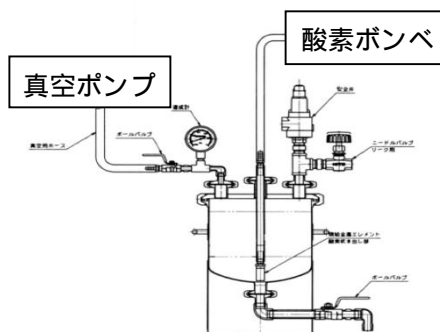
研究の目的は、吸引脂肪組織を高濃度酸素化溶液と混合して酸素化させることにより、細胞死が抑制し、生着率が高く長期間安定な新たな脂肪注入移植法を開発することである。

本研究では、ヒトから採取した脂肪組織を用いて、高濃度酸素化液体への浸漬、酸素化により細胞死が抑制されることを確認し、移植の至適条件を決定する。次に、脂肪移植モデル動物を作成し、酸素化脂肪注入移植による生着率を定量的に評価し、長期経過観察により有効性と有害性について確認する。

3. 研究の方法

(1) 高濃度酸素化溶液の作成

高濃度酸素化溶液は、パーフルオロカーボン (PFC)、生理食塩水 (Normal Saline: NS)、および乳酸化リンゲル液 (Lactate ringer solution: LRS) を各々酸素加圧タンクに封入し、5気圧5分間酸素加圧して作成した。液体の酸素分圧はニードル式酸素濃度計 (Microx TX3; Presens Co.) を用いて測定した。作成した高濃度酸素化溶液を密閉容器に封入し、4℃で24時間および48時間保存後の酸素分圧を測定した。また、0.22μmミリポアメンブレンフィルター (メルク SLGS03355) で濾過滅菌した後の酸素分圧も測定した。これにより、移植に用いる吸引脂肪組織の酸素化に適合する高濃度酸素化溶液を検討した。



< 酸素加圧タンク >

(2) 液体浸漬によるヒト吸引脂肪組織の酸素化とその影響の評価

ヒト吸引脂肪組織は、帝京大学倫理委員会の承認 (帝倫19-294) を受け、承諾を得た患者ボランティアから採取された脂肪組織 (吸引脂肪注入移植手術時に採取された吸引脂肪組織の余剰分) を使用した。脂肪組織を高濃度酸素化PFC (PFC-O₂)、高濃度酸素化LRS (LRS-O₂)、および高濃度酸素化NS (NS-O₂) と混合し、1時間、4時間、24時間の時間条件で浸漬させた。その後、700gで3分間の低速遠心により精製を行った。対照群としては、高濃度酸素化溶液での浸漬処理を行わず、同様に700gで3分間の低速遠心により精製した吸引脂肪組織を使用した。

各々の組織酸素分圧をニードル式酸素濃度計で測定し、細胞の生存状況および組織障害性については、組織標本の形態的变化 (HE染色)、およびin situ hybridizationを用いたネクローシス・アポトーシスの検出 (TUNEL法) により評価した。

(3) 脂肪注入移植モデルマウスへの酸素化ヒト吸引脂肪注入移植における生着率と長期経過の検証

脂肪注入移植モデルマウスを作成し、高濃度酸素化溶液と混合して酸素化させたヒト吸引脂肪組織をヌードマウスの皮下に注入移植した。移植後4週、3ヶ月の移植脂肪を摘出し、重量の測定および免疫組織学的に生着状況を比較し、酸素化の効果を評価した。また、PFC等の溶媒への浸漬あるいは高濃度酸素 (活性酸素) に関連する長期経過での有害事象発生がないかを確認するために剖検を行った。

酸素化ヒト吸引脂肪組織の作成

高濃度酸素化溶液は、使用前日にPFCとLRSを5気圧5分間酸素加圧して作成したPFC-O₂とLRS-O₂を4で保管し、使用時に0.22μmミリポアメンブレンフィルター（メルク SLGS03355）で濾過して滅菌溶液とした。帝京大学倫理委員会の審査で承認され（帝倫19-294）、患者ボランティア（n=3）の承諾を経て採取されたヒト吸引脂肪組織を速やかにPFC-O₂およびLRS-O₂と混合し、2時間氷冷で浸漬させたのちに700g×3minの低速遠心により精製した。高濃度酸素化溶液への浸漬処理をせずに低速遠心精製した吸引脂肪組織を対照とした（CONT）。

免疫不全マウスへの脂肪注入移植（n=14）

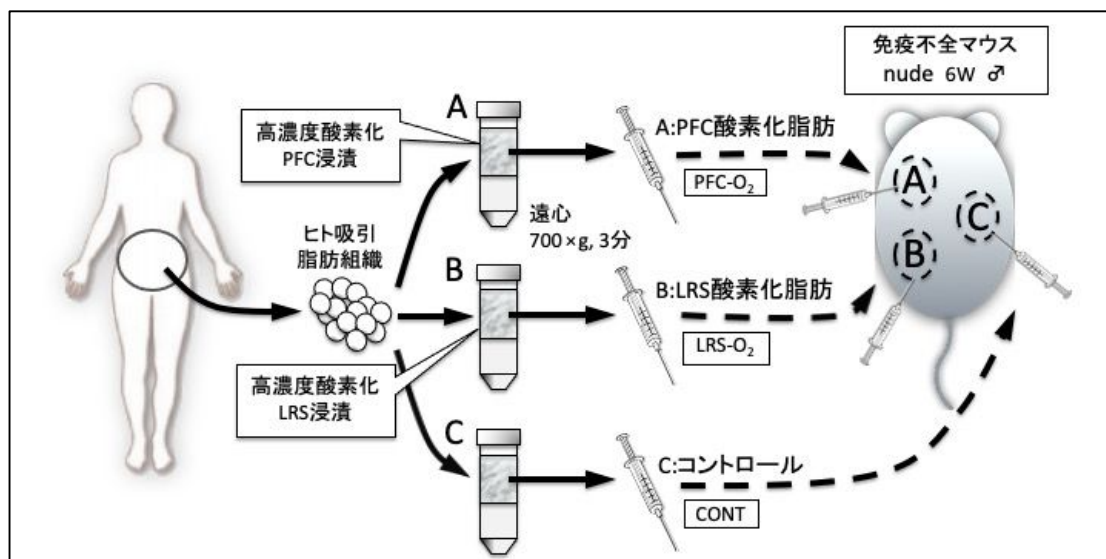
6週齢オスのヌードマウス（Crlj:CD1-Foxn1^{nu}）の背部の脊柱を挟んだ左右の皮筋層下3カ所にA: PFC-O₂ B: LRS-O₂ C: CONT の脂肪組織を各々0.6mlずつ18G針付きシリンジで注入移植した。

移植組織の生着確認群（n=7）

移植後4週間で、安楽死後に皮膚切開して移植組織を摘出した。摘出した移植組織の重量の測定および組織標本を作成してHE染色、免疫染色（CD31、perilipin）により移植脂肪の生着状況を比較し、酸素化の効果を評価した。

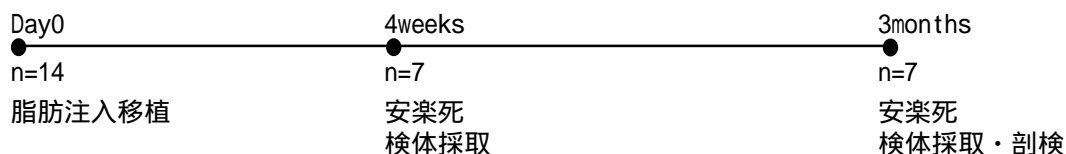
長期経過観察群（n=7）

移植後3カ月で、安楽死後に皮膚切開して移植組織を摘出した。摘出した移植組織の重量の測定および組織標本を作成してHE染色、免疫染色（CD31、perilipin）により移植脂肪の生着状況を比較し、酸素化の効果を評価した。さらに、PFC等への浸漬あるいは高濃度酸素（活性酸素）に関連する有害所見がないか確認するために剖検を行った。視触診で組織傷害、変性、腫瘍形成等の異常所見の有無を確認し、所見があった場合は検体を採取し病理組織学的・免疫学的検討を行うこととした。



タイムスケジュール

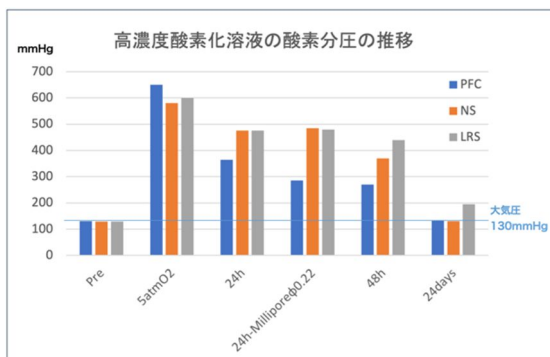
6週齢オスのnudeマウス n=14



4. 研究成果

（1）高濃度酸素化溶液の作成

5気圧5分間の酸素加圧処理により、PFC、NS、LRSのいずれにおいても酸素分圧600mmHg前後の高濃度酸素化溶液を得られた。密封容器4で保存した場合、酸素分圧は時間経過とともに低下するものの、48時間経過後でも270mmHg以上の酸素分圧が維持された。また、0.22μmミリポアメンブレンフィルターを通過させても酸素分圧の低下はほとんど見られず、フィルターによる濾過滅菌が可能であることが確認された。



NS および LRS といった細胞外液補充液（等張電解質輸液）においても、PFC と同等の高濃度酸素化が可能であることが示された。これにより、ヒト組織に対する *ex vivo* アプローチが安全かつ容易になるだけでなく、*in vivo* アプローチの可能性も大いに高まった。さらに、作成した高濃度酸素化溶液は 0.22 μm ミリポアメンブレンフィルターによる濾過滅菌が可能であり、臨床使用にも適合することが確認された。

（２）液体浸漬によるヒト吸引脂肪組織の酸素化とその影響の評価

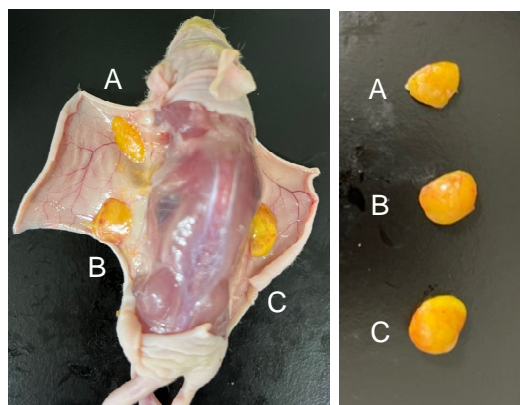
ヒト吸引脂肪組織は、高濃度酸素化溶液（PFC-02、NS-02、LRS-02）のいずれに浸漬しても、コントロールと比較して組織酸素分圧が 2～3 倍上昇することが確認された。しかし、組織標本における組織生存率および組織障害性に関しては、いずれの検体においても組織学的に明らかな差異は認められなかった。また、TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出（TUNEL 陽性細胞）はごく僅かであり、評価が困難であった。陽性陰性コントロールが示されるようなアッセイ系の見直しが必要と思われる。

この結果から、高濃度酸素化溶液による組織酸素分圧の向上は可能であるものの、細胞死の抑制効果や生存率の改善効果といった有効性に結びつく所見は得られなかった。一方、高濃度酸素化溶液浸漬による明らかな有害性も認められなかった。

（３）脂肪注入移植モデルマウスへの酸素化ヒト吸引脂肪注入移植における生着率と長期経過

移植後 4 週、3 ヶ月の移植脂肪を摘出し、重量の測定および組織学的評価を行なった。移植脂肪の生着率はコントロール（酸素化処理を行っていない通常の脂肪）と比較して有意な差がなく、組織壊死や血管新生等組織学的にも明らかな相違がなかったため、酸素化による有効性は証明できなかった。移植後 3 ヶ月の経過観察期間においては有害事象の発生はなく、剖検でも異常所見は認めなかった。

この結果については、移植実験の際にマウスへの吸引脂肪組織の加工処理・準備に時間を要し、技術的要因に伴う組織障害を起こしていた可能性が否定できず、今後、手順や実験器具を含め改善する余地があると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 1. 堂後京子 | 4. 巻 64(増刊) |
| 2. 論文標題 ヒト脂肪組織由来幹細胞の発見 -形成外科における再生医療の夜明け- (形成外科専攻医への推奨論文166選 原典に触れる) | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 形成外科 | 6. 最初と最後の頁 S94-S94 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 堂後京子、大河内 真之、小室 裕造 |
| 2. 発表標題 自家組織、人工物、脂肪注入を併用したハイブリット型乳房再建法の実践と展望. |
| 3. 学会等名 第49回日本マイクロサージャリー学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堂後京子、大河内 真之、藤井 麻紀、田巻 恵、 杉本 弘美、山門 希実、奥村 英雅、小室 裕造 |
| 2. 発表標題 遺伝性乳癌卵巣癌症候群（HBOC）患者に対する乳房再建計画についての検討 |
| 3. 学会等名 第10回日本乳房オンコプラスチックサージャリー学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堂後京子 |
| 2. 発表標題 吸引脂肪組織の酸素化による生着率の高い新規脂肪注入移植法の開発 |
| 3. 学会等名 第5回帝京大学研究交流シンポジウム |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1．発表者名 堂後京子 |
| 2．発表標題 乳房再建における脂肪注入術の長期成績と標準化に向けての考察.(シンポジウム1 保険適用を目指す安全確実な脂肪注入術). |
| 3．学会等名 第64回日本形成外科学会総会・学術集会 |
| 4．発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1．発表者名 堂後京子 |
| 2．発表標題 吸引脂肪からのヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)培養系の標準化：吸引法による相違についての検討. |
| 3．学会等名 第29回日本形成外科基礎学術集会 |
| 4．発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1．発表者名 堂後京子 |
| 2．発表標題 脂肪注入併用による乳房インプラント再建の適応拡大の可能性について(シンポジウム18 乳房インプラントの適応と限界). |
| 3．学会等名 第63回日本形成外科学会総会・学術集会 |
| 4．発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1．発表者名 堂後京子 |
| 2．発表標題 糖尿病性足潰瘍に対するヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)治療：吸引脂肪からのヒトASC培養系の標準化(シンポジウム1 次世代の潰瘍治療). |
| 3．学会等名 第12回日本創傷外科学会総会 |
| 4．発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1．発表者名 堂後京子 |
| 2．発表標題 乳房切除後乳房再建における自家脂肪注入と局所再発についての検討． |
| 3．学会等名 第27回日本乳癌学会 |
| 4．発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1．発表者名 Kyoko Dogo |
| 2．発表標題 Middle or long-term result of autologous fat grafting for breast reconstruction. |
| 3．学会等名 ORBS (Oncoplastic Reconstructive Breast Surgery) International Scientific Meeting 2019 (国際学会) |
| 4．発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1．発表者名 堂後京子 |
| 2．発表標題 当院における乳房再建に対する脂肪注入の実際と長期経過． |
| 3．学会等名 第7回日本乳房オンコプラスチックサージャリー学会 |
| 4．発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1．発表者名 堂後京子 |
| 2．発表標題 乳房切除後の自家脂肪注入と局所再発についての検討 |
| 3．学会等名 第6回日本乳房オンコプラスチックサージャリ 学会 |
| 4．発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|---|--------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 大河内 真之 (Okochi Masayuki) (40313796) | 帝京大学・医学部・教授 (32643) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|