

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年度～2011 年度

課題番号：22791723

研究課題名（和文） 静脈奇形の脂肪酸解析～静脈奇形研究モデルの確立を目指して～

研究課題名（英文） Lipid analysis of venous malformation

研究代表者

江尻 浩隆 (EJIRI HIROTAKA)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：70529552

研究成果の概要（和文）：

静脈奇形は、一部の静脈が拡張した構造異常で、増大していくことが大きな問題のひとつである。一方、細胞膜は二重構造で、ほとんどがリン脂質脂肪酸で構成されており、このリン脂質脂肪酸が細胞の機能に大きく関与することが分かってきている。そこで、静脈奇形と正常静脈、正常動脈などの脂肪酸組成を解析し、比較した。静脈奇形と正常静脈の脂肪酸組成に明らかな差を認めなかったが、これらと正常動脈との間には違いを認めた。

研究成果の概要（英文）：

A venous malformation has a problem that it grows bigger. Meanwhile, most component of cell membranes is a phospholipid fatty acid, and recent studies showed that phospholipid fatty acids influence functions of a cell. So we analyzed fatty acid compositions of venous malformations, normal veins, normal arteries, and so on. This analyses revealed no remarkable difference in fatty acid compositions between venous malformations and normal veins, but revealed a difference in fatty acid compositions between both of them and normal arteries.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：組織培養・移植学、静脈奇形

## 1. 研究開始当初の背景

静脈奇形とは、胎生 4～10 週の末梢血管系形成期の異常により、一部の静脈が拡張した構造異常で、先天奇形のひとつである。大きさ・分布は多様で、緩徐に増大していき、周囲組織の圧迫、特に神経の圧迫による疼痛、

外傷による出血、血栓形成による疼痛などを生じる。また、著明な増大により機能的及び整容的な問題が発生する。治療法としては主に摘出術と硬化療法が挙げられるが、どちらも無効な症例や問題点があり、治療法の改良及び新たな治療法の開発が期待されている。

これまでに静脈奇形の組織学的研究などはなされているが、動物発症モデルが存在しないため、あまり研究は進んでおらず、増大機序など多くのことが判明していない。

一方、細胞膜の二重構造はほとんどがリン脂質脂肪酸で構成されており、タンパク質のみならず、このリン脂質脂肪酸が細胞の機能に大きく関与することが分かってきている。当研究組織ではこれまでに、皮膚や口腔粘膜機能の維持において脂肪酸が関与することを報告してきた。特に、線維芽細胞の増殖能と脂肪酸解析の結果から、細胞膜リン脂質脂肪酸組成が細胞の増殖能に関与している可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

正常血管（静脈、動脈）および静脈奇形それぞれの脂肪酸解析を行い、脂肪酸組成の違いが存在するの否か、違いが存在するとしたら、どのような違いが静脈奇形の増大機序に関与しているのかを考察する。

## 3. 研究の方法

### ●サンプリング

購入した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞および正常ヒト冠状動脈内皮細胞を培養したものを利用した。それぞれの細胞に対する専用培地が存在するが、今までの研究から培地の違いにより脂肪酸組成が大きく変化することが分かっていたため、それぞれの細胞に対して2種類ずつの培地（正常ヒト臍帯静脈内皮細胞専用培地および正常ヒト冠状動脈内皮細胞専用培地）で培養を行った。

また、形成外科で行われる手術において、マイクロサージャリーでの残余正常静脈・正常動脈と、摘出された静脈奇形の一部も利用した。利用にあたっては患者の同意を得るために、大学の倫理委員会の承認を得たのち、十分なインフォームド・コンセントを行った。それぞれ顕微鏡下で血管成分以外（血液、脂

肪など）を取り除き、残った血管成分全体を利用した。

### ●脂肪酸組成解析方法

Folch 抽出法により脂肪酸成分を取り出し、細胞膜脂肪酸を解析するための薄層クロマトグラフィーに供する群と全組織内脂肪酸を解析する群に分け、それぞれについてガスクロマトグラフィーで脂肪酸の解析を行った。脂肪酸は代表的な 23 種類について検討した。詳細な手順は以下の通り。

1. 各サンプルを Folch 抽出法で、脂質成分、蛋白質、DNA 成分に分ける。
2. 蛋白質成分は、Lowry 法により分離し分光光度計で測定する。
3. DNA 成分は、Burton 法により分離し分光光度計で測定する。
4. 脂質成分は、細胞膜成分を得るために、薄層クロマトグラフィーに供する。
5. 掻き出し後 100  $\mu$ l 23:0 を internal standard として加え、6%塩酸/メタノール、80  $^{\circ}$ C、3.5 時間でメチル化 (FEME=Fatty Acid MethylEster) する。
6. 石油エーテルでメチル化した脂肪酸を再度抽出し、溶媒を N<sub>2</sub> ガスで蒸散させ、ベンゼンを適量加えてガスクロマトグラフィーに供するまで -20  $^{\circ}$ C 保存する。
7. 島津社製キャピラリーガスクロマトグラフ GC-14B を用い、脂肪酸を分析する。
8. 分析そのものは、同社製のクロマトパックを使用する。この際のスタンダードは、人体内に存在する炭素数 14 から 24 までの 23 種の脂肪酸とする。
9. それぞれのサンプル間で比較検討する。

## 4. 研究成果

●正常ヒト臍帯静脈内皮細胞および正常ヒト冠状動脈内皮細胞の脂肪酸解析 (in vitro)  
2 検体に対して行った。結果を図 1、図 2 に示す。

図 1

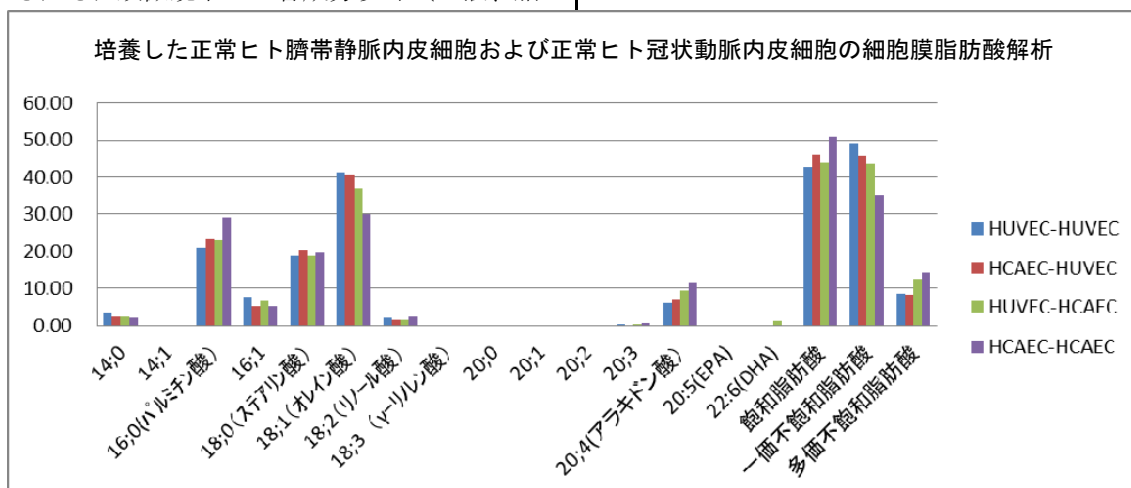
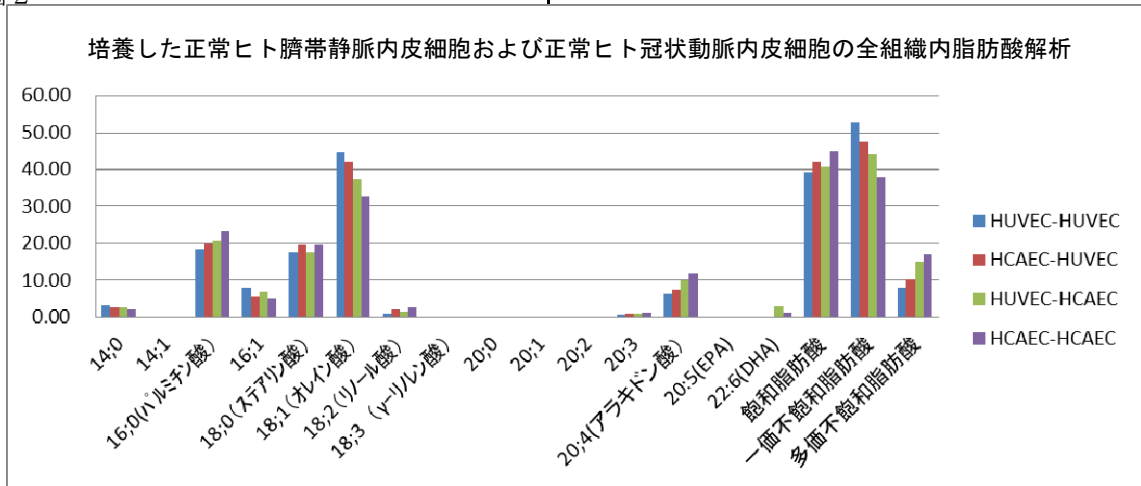


図 2



図内の略語は図 1 と同様

● 正常静脈、正常動脈、静脈奇形の脂肪酸解析 (in vivo)

手術で得られた正常動脈 4 検体、正常静脈 3 検体、静脈奇形 2 検体に対して行った。結果を図 3、図 4 に示す。

図 3

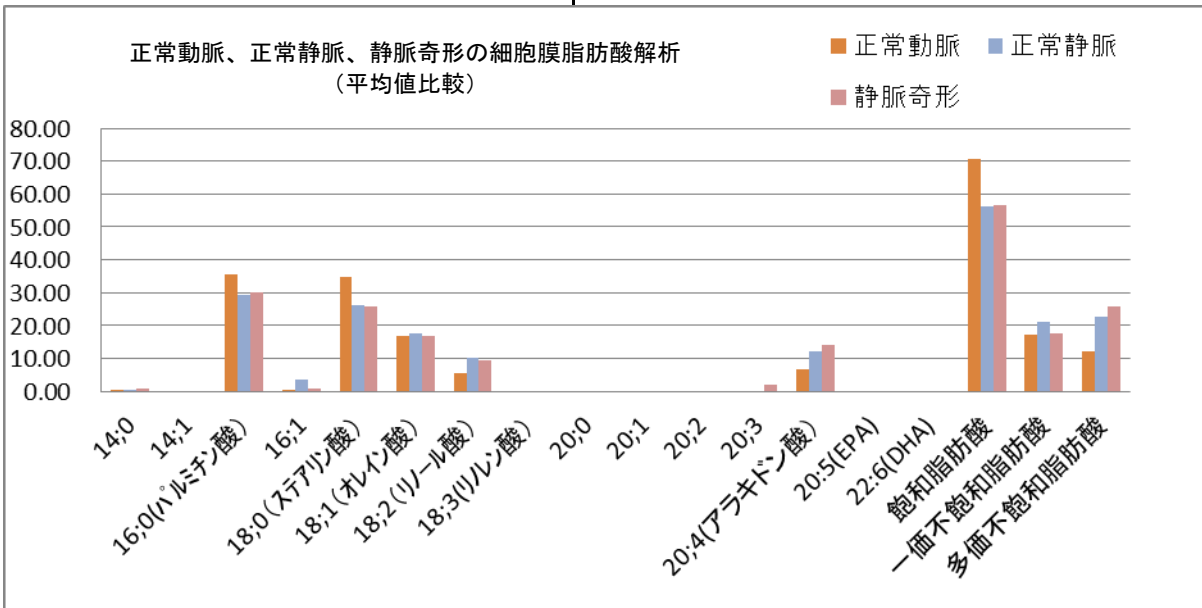
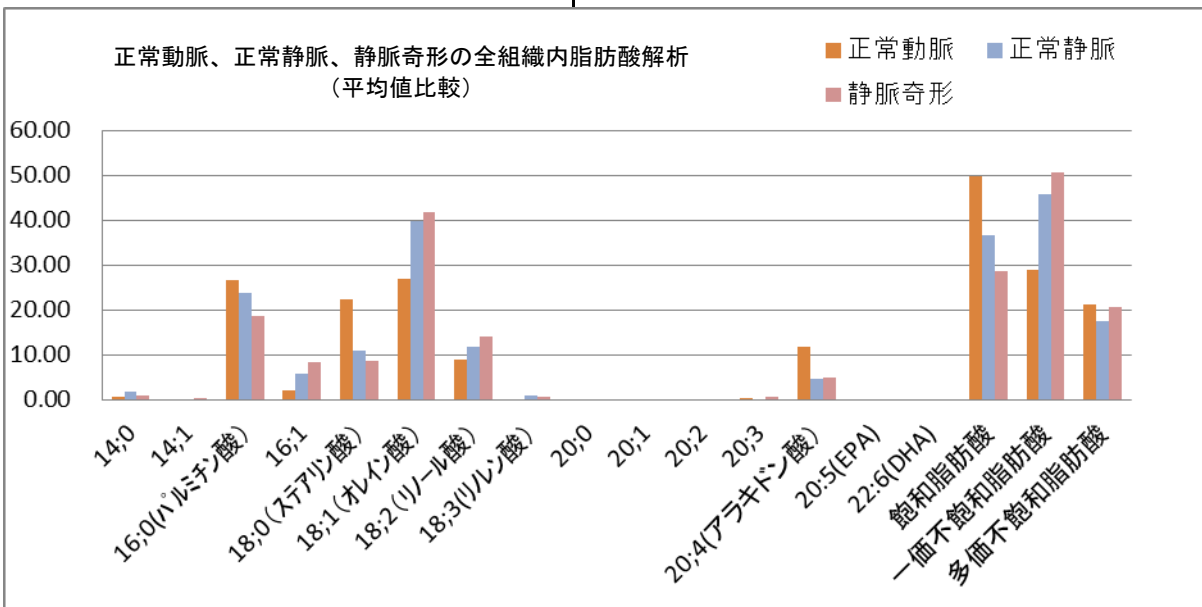


図 4



## ●考察

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞および正常ヒト冠状動脈内皮細胞の脂肪酸解析結果からは、①正常ヒト冠状動脈内皮細胞専用培地での培養細胞のほうが、必須脂肪酸含有率が高くなる、②正常ヒト臍帯静脈内皮細胞よりも正常ヒト冠状動脈内皮細胞のほうが必須脂肪酸含有率が高くなる、以上の傾向がみられた。培地にはウシ胎児血清濃度とヘパリン添加の有無という2点の違い（正常ヒト冠状動脈内皮細胞専用培地のほうがウシ胎児血清濃度が高く、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞専用培地にはヘパリンが添加されている）がある。ウシ胎児血清には脂肪酸が含まれており、ウシ胎児血清濃度が高い培地で必須脂肪酸含有率が高くなったことはこのことが関与していると思われた。②からは同じ内皮細胞でも血管の種類によって脂肪酸組成が異なることが示唆された。これは脂肪酸組成が血管の形態・機能に大きな影響を及ぼしている可能性を示唆することとなり、重要な結果といえる。

正常静脈、正常動脈、静脈奇形の脂肪酸解析結果からは、①正常静脈と静脈奇形では、脂肪酸組成に大きな差を認めない、②正常動脈は、細胞膜脂肪酸組成において、正常静脈と静脈奇形と比べて、大きな差を認めない、③正常動脈は、全組織内脂肪酸組成において、正常静脈と静脈奇形と比べて、ステアリン酸、飽和脂肪酸、アラキドン酸が多く、オレイン酸、単不飽和脂肪酸が少ない、以上の傾向がみられた。正常静脈と静脈奇形が、血管成分全体の脂肪酸組成に、大きな差がない可能性が示唆された。本研究は、正常静脈と静脈奇形の増殖能の差が、脂肪酸組成の差と関連があるのではないかという疑問から始まっているため、このことは重要な結果といえる。また、培養血管内皮細胞の脂肪酸解析結果と同様に、動脈と静脈は脂肪酸組成が異なることが示唆された。

in vitro、in vivo ともに検体数がまだ少ないこと、in vivo において血管成分全体で解析を行っていることから、まだ正確な結論を導き出すことは難しい。今後は、検体数を増やし、また in vivo では血管成分を分離させた上での解析を行い、検討していきたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 江尻浩隆、橋川和信、丹生健一、特集：小児の耳鼻咽喉科108の疑問 顔面・頸部疾患 4. 顔面の血管腫はどのように治療

すべきか?、JOHNS、査読無、28巻、2012、513-515

[学会発表] (計3件)

- ① 江尻浩隆、橋川和信、永田育子、野村正、田原真也、Focal type の静脈奇形は infiltrative type よりも硬化療法が効きやすいか? ~同一術者、硬化剤による検討~、第55回日本形成外科学会総会・学術集会、2012年4月11日、東京
- ② 江尻浩隆、小川晴生、橋川和信、田原真也、手足の静脈奇形に対するインドシアニングリーン蛍光造影併用硬化療法の検討、第54回日本形成外科学会総会・学術集会、2011年4月13日、徳島
- ③ 江尻浩隆、表在性血管病変に対するレーザー治療 ~従来型ダイレーザーとVビームの治療の違いについて~、第54回日本形成外科学会総会・学術集会、2011年4月13日、徳島

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

江尻 浩隆 (EJIRI HIROTAKA)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：70529552

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

寺師 浩人 (TERASHI HIROTO)

神戸大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80217421