

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462786

研究課題名(和文) 超微細血管吻合を用いた新しい小臓器・複合組織移植実験モデルの技術確立と機能解析

研究課題名(英文) Development and technical refinement of supermicrosurgical composite tissue allograft and small organ transplant model

研究代表者

飯田 拓也 (Iida, Takuya)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00398603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：超微細血管吻合技術を用いて種々の小臓器移植モデルを作成し手法を改良した。ラットを用いた眼球移植モデルでは、血管柄付き末梢神経移植を中心に、手術手技の確立と評価を行った。末梢神経のドナーは正中神経と顔面神経を用いた。網膜への直接の神経縫合は技術的に困難であったため、強膜の小切開から神経断端を網膜下に差し込み、神経を埋入した。神経の伸長は認められたものの再生率は低かった。また血管吻合技術の改良をではレシipient側とドナー側の血管口径差を解消するために小口径動脈の側端吻合を開発した。またカニクイザルを用いた子宮移植モデルでは、血管吻合の腰式に改良を加え、術式の単純化を図った。

研究成果の概要(英文)：Several types of small organ transplantation model using supermicrosurgical technique have been developed and technically refined. In eye transplant model, vascularized peripheral nerve graft using median and facial nerve was inserted into sclera from a stub incision. Although a small number of nerve were regenerated, the rate was low. Side-to-end anastomosis in small arteries has also been developed to match size discrepancy between small vascular pedicle in organs and relatively large recipient vessels. Good patency rates were observed. In uterus transplantation model, improvements in microvascular anastomosis were developed including the location of anastomosis and selection of the pedicle.

研究分野：再建外科

キーワード：超微小血管吻合 同種複合組織移植

1. 研究開始当初の背景

形成外科では従来より微小血管吻合技術 (Microsurgery) を用いた自家組織移植術により、がん切除後の組織欠損の再建を行ってきた。しかし複雑な形態・機能を持つ部位ではこうした技術をもってしても十分な再建は困難で、失声、失明、顔面変形などは生命を救うための犠牲として諦められてきたのが現状である。

近年、免疫抑制剤の進歩により、同種間の皮膚・皮下組織・筋肉・骨などを含んだ同種複合組織移植 (CTA: Composite Tissue Allograft) が可能となった。CTA は“顔面移植”や“手移植”など、将来形成外科において最も発展が期待されている分野であるが、われわれはCTA はがん切除後の欠損を修復するブレイクスルーになる可能性を秘めていると考えている。さらに本邦においては脳死移植は立ち遅れていたが、2010年7月に改正臓器移植法が施行されて以降、脳死移植ドナーが急増しており、将来的にCTAの普及も期待される。

一方、近年、超微小血管吻合技術 (Supermicrosurgery) の発達に伴い、従来は不可能であった微小血管 (0.3mm ~) の吻合が可能となった。当科では Supermicrosurgery 技術を用いて、指尖部再接着やリンパ管静脈吻合などに応用している。同時にまた日常的に移植外科 (脳死・生体肝移植) や耳鼻咽喉科・脳外科・口腔外科 (頭頸部再建)、食道外科、整形外科、皮膚科、などと合同で多くの再建手術を行っている。

このように日常的に臨床で携わっている移植医療に、当科が持つ超微細血管吻合技術を融合させることで、過去に行われていない新しい小臓器 (子宮、眼球、中枢神経など) の移植モデルを作成する。

2. 研究の目的

超微細血管吻合技術を用いてカニクイザルを用いた子宮移植モデルや、ラットを用いた眼球移植モデルを作成し実験手法を確立、改良する。

同種複合組織・小臓器移植に必要な条件としては、臓器血流の維持、拒絶反応の抑制、神経の再生、が挙げられる。まず初めに、超微細血管吻合技術を用いて、技術的に可能であるかを検討し、技術面での refinement や新しいモデルの開発を行う。続いて臨床応用に向けて最も重要と考えられるを組織学的に評価する。

子宮移植モデルにおいてはカニクイザルを用いた子宮他家移植の血管吻合法や手順について改良を加える。吻合血管の候補として、グラフト側には左右の深子宮動脈、卵巣動脈があり、レシピエント側には外腸骨、内腸骨、深子宮、卵巣動脈などがある。すべてを吻合

する必要はないが、どの程度で十分な灌流が得られるかを知ることで、術式の単純化が図れると考えられる。

眼球移植モデルでは、ラットを用いた実験モデルを作成し、神経の再生を組織学的に検討する。また神経縫合法、用いる血管柄付き神経、血管吻合法に関してより安全で簡便な方法を確立する。

食道がん切除後の迷走神経臍吻合モデルでは、ラットを用いて食道近傍で切断した迷走神経を胃壁につないで再支配が生じるかを検討するモデルを作成する。

3. 研究の方法

これまでに行ってきた大動物 (ブタ、サル) および小動物 (ラット、マウス) を用いた眼球、顔面、喉頭、後足、肛門、卵巣、子宮等の自家移植予備実験に基づいて、カニクイザルを用いた子宮移植およびウサギ、ラットを用いた眼球移植モデルを作成・改良を加えた。

眼球モデルは血管吻合 (眼動脈、渦静脈) による血流の再開は可能であることが分かったが、視神経の縫合をどこに行うべきかが未確定である為、他家移植ではなく、まずは自家眼球・神経移植モデルを中心に実験を進めた。

眼球移植における最大の問題点は、移植した眼球を如何にして機能させるかにある。視神経は末梢神経ではなく中枢神経であり、軸索周囲は Schwann 細胞ではなく oligodendroglia によりミエリン化されているため、哺乳類においてはほとんど再生が見られない。しかし中枢神経細胞自体は再生能力があることは知られており、周囲の再生を妨げる環境 (glial scar, Nogo 等) を除去し、成長に適した環境を移植することで再生は可能であると推測されている。

動物実験モデルにおいて、「末梢神経」を中枢神経である視神経切断部に移植することで視神経の軸索再生が得られたとする報告が1985年、Soらによってなされて以来、脊髄など中枢神経への末梢神経移植の研究が多く報告されている (Chen, Science, 1996)。しかし過去の報告では軸索形成率が低いことが指摘されており、これは神経組織の酸素要求性が高いために血流を有しない遊離神経移植では、生着する Schwann 細胞数が多くないことが一因と考えられる。我々は血管柄付き神経移植により軸索形成率の向上が期待できると考え、ラットを用いて血管柄付顔面神経、正中神経を眼球強膜内に埋入する実験モデルを作成した。

また、子宮移植に関しては、滋賀医科大学動物実験センターにてカニクイザルを用いた同種子宮移植実験を慶応大学産婦人科と合同で行った。また食道癌切除後の迷走神経再生モデルを当院胃食道外科と合同で作成した。

4. 研究成果

眼球移植における血管柄付き末梢神経移植を中心に、手術手技の確立と評価を行った。動物は主としてラットを用い、末梢神経のドナーは正中神経と顔面神経を用いた。網膜への直接の神経縫合は技術的に困難であったため、強膜の小切開から神経断端を網膜下に差し込み、神経周膜を強膜に 10-0、11-0 ナイロンで縫い付けることで神経を埋入した。スリットをあける際に網膜が穿孔し硝子体が流出しやすかったため、神経断端に割をいれて開くことで断端を大きくし神経再生を促進する、神経弁を島状皮弁として移動性を増す等の手技的な改善を行った。またドナー神経の選択、挙上に関しても改善を行った。結果、ラット眼球移植に関しては神経の再生が見られたものの再生率は低かった。網膜に移植神経がきれいに接合することが再生にとって重要であるが、網膜は非常に薄いため神経との接着面が狭く、神経の伸長が起こりにくかったと考えられる。移植神経の切断面をさらに工夫し接着面を多くするようにすることが必要と考えられる。

一方、視機能の評価法としては対光反射が考えられるが、これには視神経だけでなく、縮瞳させるためには動眼神経の縫合が必要となる。しかし動眼神経の露出は頭蓋底での剥離が必要なため、予備実験を行ったが、sacrifice せずに生存させて神経の伸長の長期経過を見るのは困難であった。

また血管吻合技術の改良を行った。小臓器移植において超微小血管吻合の際に、レシピエント側とドナー側の血管口径差が問題となる場合が多い。静脈に関しては血管の拡張性が高く、また血流が細太のため血栓を生じにくいのに対し、動脈は拡張性が低い上に太細への血流となるため血栓を生じやすい。同程度の口径の血管が術野に見つからないことも多く、存在しても剥離のため攣縮や損傷のリスクがある。動脈側端吻合法はこうした問題を解消できる方法ではあるが、過去の報告は大口径の血管についてのみの報告で、0.8mm 以下の小口径動脈に関する報告はなかったが、ラット大腿動脈に下腹壁動脈を 11-0、12-0 ナイロンにて側端吻合し、良好な開存性を保つことを確認した。本法は小臓器移植の血管吻合において有用な技法のひとつになると考えられた。

以上、小臓器移植としての眼球移植は視機能再建は困難であるものの、血流維持・生着という観点では手技的に可能であると考えられた。

一方、カニクイザルを用いた子宮移植モデルでは、血管吻合部やその他の部位からの出血が多く止血に難渋することが多かつ

たため、血管吻合の様式改良を加え、術式の単純化を図った。

従来は血管は左右卵巣動静脈、子宮動静脈、深子宮静脈の剥離を行っていたが、1) 同種移植においては in-situ replantation と異なり血管長の余裕があるため、出血しやすい内腸骨動静脈までの剥離は行わずに移植、2) 深子宮静脈は superdrainage のため長く剥離をしていたが、この部分は静脈叢のように易出血性で結果出血が多くなっていったが、ICG で灌流を検討した結果、同血汗を吻合しなくても移植組織のうっ血は来さないため、子宮頸部が出た段階で深子宮静脈は結紮切離する、等の工夫を行った。また深部での吻合操作をさげ、浅部で端端吻合することで、より短時間で安定的に吻合を行う等の改善も行った。

迷走神経再生実験では胃壁内の迷走神経を探すことは困難であったため、食道前面を走行する迷走神経の断端を胃壁内に埋入して縫着し、迷走神経の胃壁への神経再生を図った。神経は 0.3mm 程度と細かったが、神経の縫合や埋入は十分可能であった。

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)

Kisu I, Mihara M, Banno K, Hara H, Masugi Y, Araki J, Iida T, Yamada Y, Kato Y, Shiina T, Suganuma N, Aoki D.

Uterus allotransplantation in cynomolgus macaque: a preliminary experience with non-human primate models.

J Obstet Gynaecol Res. 2014 Apr;40(4):907-18.

[学会発表](計 3 件)

Iida T,

Is "Eye" Transplantation Possible? Effect of Vascularized Nerve Graft for Optic Nerve Regeneration; A Preliminary Report.

Byron Bay Meeting 2015.3.2-5 Australia

飯田拓也、石浦良平、田代絢介、原尚子、山本匠、光嶋勲

頭頸部再建における Side-to-End Anastomosis を用いた小口径動脈吻合の有用性

日本形成外科手術手技学会 2016 .

2.13 さいたま

飯田拓也、石浦良平、田代絢介、原尚子、
山本匠、光嶋勲
Side-to-End Anastomosis による小口径動
脈吻合とインドシアニンググリーン蛍光造影
法の有用性
日本形成外科学会総会 福岡
2016.4.13-15

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 拓也 (Iida, Takuya)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00398603

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：