

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：32620
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792060
 研究課題名（和文）皮弁、植皮術における知覚再生メカニズム及びタクロリムス外用の新たな可能性について
 研究課題名（英文）A perception reproduction mechanism in a flap and a skin graft, and a new possibility of the tacrolimus external use
 研究代表者
 名取 悠平（NATORI YUHEI）
 順天堂大学・医学部・助手
 研究者番号：80445478

研究成果の概要（和文）皮弁及び植皮における知覚神経再生の評価として、軸索が蛍光発色するトランスジェニックマウスを用いた Live imaging が、有用になり得ると考えられた。知覚神経を温存した皮弁モデルで、術後 21 日頃から皮弁全体のピクセル比の上昇を認め、知覚神経増生の可能性が示唆されたが、他のモデルではピクセル比の上昇は認められなかった。タクロリムス使用群は、未使用群に比べ知覚神経再生が良い傾向が認められ、その塗布は、知覚神経再生を促進させる可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：To evaluating sensory innervation into either skin flap or skin graft, we used transgenic mice which all axons express YFP fluorescent and developed live imaging system for murine skin flap model. It was useful tool for evaluating sensory innervation and the intensity is elevated only at the flap which sensory nerve was preserved. We also evaluated the effect of applying tacrolimus ointment on the flap, and the tacrolimus applied group showed higher intensity than the other groups. The application of the tacrolimus may promote sensory nerve regeneration into the flap.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：皮弁 植皮術 神経再生 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

人間の知覚は、危険な物から人体を守ったり、ものの状態を評価する上で非常に重要な感覚であり、特に足底や手掌では知覚の有無が機能面に与える影響は大きい。そこで、外傷や腫瘍切除後生じる足底や手掌の欠損には知覚をどのようにして再建するかがひとつの重要な課題になるが、植皮術や皮弁移植術の後にどのようにして知覚が再生するか

の詳細については未だ明らかにされていない。植皮術の場合、周囲の健常皮膚から知覚が再生するとされるが、移植皮膚が薄い為母床に存在する深部知覚がその役割を十分に果たすとも言われ、どの程度周囲から再生しているかについて検討することが必要と考えられる。

一方、皮弁移植術においては、その皮膚の知覚神経を皮弁とともに採取して移植す

る知覚皮弁が行われるが、得られる結果が一定せず、移植した支配神経からの再生神経が優位に再生しているのか周囲の健常皮膚からの知覚再生が優位なのかについても検討の必要があると考えられた。

知覚神経の評価は一般的に本人からの申告を元にした主観的評価になることが多い為、客観的評価は困難な場合が多く、特に動物を用いた基礎実験では痛み刺激などによる反応として評価するため、その反応を定量することは困難で、知覚神経再生を客観的・多角的に評価することは非常に重要な課題と考えられる。

我々は現在まで独自の実験モデルを開発し、DiIを神経トレーサーとして使用したり、神経軸索が蛍光発光するトランスジェニックマウスを使用することで、神経発芽がどのようにして生じるかを視覚化することに成功し、そのメカニズムについての様々な発表を行ってきた。特に、軸索が蛍光発光するトランスジェニックマウスは、生来軸索が発色するため、同一個体で神経がどのように再生していくかを経時的に *in vivo* で観察することが可能 (Live imaging) で、さらに対象となる組織全体をマウントすることで、組織内に走行する全ての神経の走行を評価することも可能にする (Whole mount imaging)。

今回これまで我々が行ってきた手法を用い、皮膚に対する知覚再生の過程を視覚化し評価すれば、今まで明らかにされなかった移植皮膚への知覚再生のメカニズムをより明確にすることが出来るのではないかと考えられた。

また、皮膚への再生知覚神経を視覚化するのみならず定量化することが可能になれば、様々な手法での知覚再生の違いを比較することも出来る。現在、神経再生を促進する作用があるとして非常に注目されている薬剤に免疫抑制剤のタクロリムスがあり、近年様々な報告がされているが、全身的投与ではその副作用が問題となる。一方タクロリムスの外用薬がアトピー性皮膚炎などへの有効性の高い治療薬として既に広く臨床応用されており、移植皮膚へ経皮的に塗布することで、知覚再生を促す作用が存在する可能性もあるのではないかと考えた。知覚再生を促進する新たな治療法を確立出来れば非常に有意義と考えられた。

2. 研究の目的

植皮術や皮弁移植術は形成外科をはじめ皮膚科や整形外科など幅広い分野で日常的に用いられる手技であるが、移植皮膚又は皮弁への神経再生がどのように行われている

のかは未だ解明されていない。今回我々は全ての神経軸索が蛍光発光するトランスジェニックマウスを用い、独自の植皮及び皮弁移植のモデルを作成して、知覚神経の再生過程を経時的に視覚化し、評価することで再生の速度や再生神経の由来を明確にすることを考えた。また、神経再生促進作用があるとして近年注目されている免疫抑制剤タクロリムスの外用薬を経皮的に塗布することで、知覚再生を促すことが出来るかについても検討を行い、知覚再生の新たな治療法について検討する。

3. 研究の方法

軸索が蛍光発光するトランスジェニックマウスを用いて神経再生と蛍光発光の関係について実験を行った。実験には、全ての神経軸索が発色する Thy1-YFP16 トランスジェニックマウスを用いた。

更に知覚皮弁における神経再生の形態を評価する為、左鼠径部から右浅腸骨回旋動静脈を血管茎とし、伴走する大腿神経の知覚枝を支配神経とする鼠径皮弁を作成し、その知覚再生を評価した。

モデル作成方法

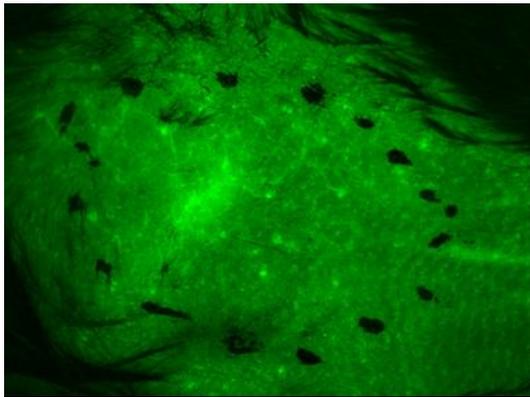
マウス吸入麻酔下に仰臥位に固定し、左鼠径部に 12×8mm の切開線をデザインした。

(図 1)



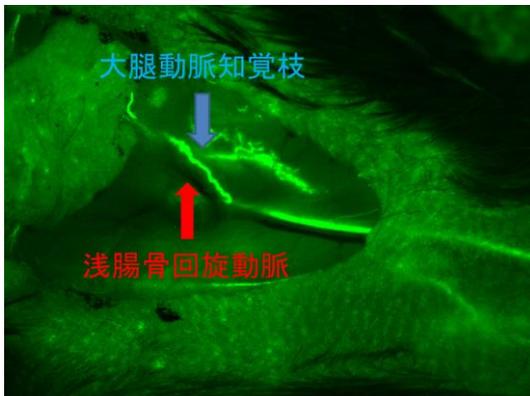
(図 1 皮弁のシェーマ)

左鼠径部に12×8mmの皮膚切開予定線を点線で示し蛍光顕微鏡下で観察した。(図2)



(図2 点線が切開予定線)

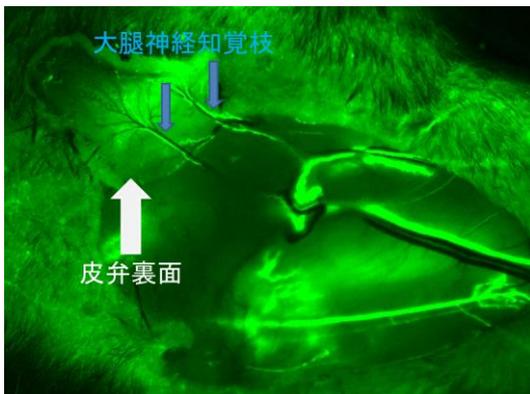
浅腸骨回旋動脈と伴走する大腿神経知覚枝を蛍光顕微鏡で確認した。(図3)



(図3 知覚神経は緑色に発色し、動脈は黒色となる)

神経の連続性を確認する共に、皮弁裏面に大腿神経知覚枝が分布している事を確認した。

(図4)



(図4)

上記皮弁を挙上した後、下記モデルの作成を行った。

神経温存モデル：知覚皮弁モデルとして大腿神経知覚枝を温存し、左鼠径部より有茎鼠径皮弁を挙上し、同部位へ4-0ナイロンにて縫合した。

神経切断モデル：左鼠径部より有茎鼠径皮弁を挙上し、知覚神経を同定しこれを切断し、同部位へ4-0ナイロンにて縫合した。

植皮モデル：左鼠径部より有茎鼠径皮弁を挙上しこれを切除し、左鼠径部より全層採皮した皮膚を皮弁切除部へ4-0ナイロンにて縫合固定した。

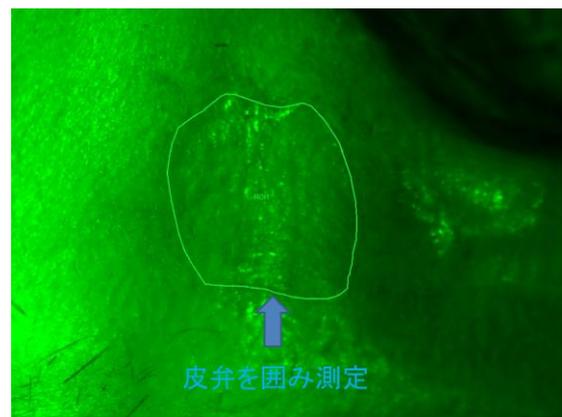
評価方法

Live imaging：移植部への再生軸索の様子を7日ごとに観察した。観察は同一個体で全身麻酔下に行い、観察時毎に剃毛と脱毛クリームを用いて脱毛を行った上で、移植皮膚内への再生神経を観察した。

部屋の明るさなど周囲の環境や顕微鏡の状態を画一化し、同じ条件で画像に記録した。

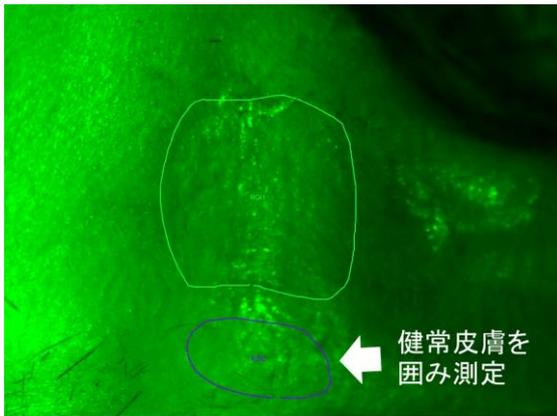
我々は live imaging でトランスジェニックマウスを視覚的に評価するとともに発色強度を数値化し、神経軸索の再生を客観的に評価する方法を行ってきた。以前は神経そのものを観察してきたが、今回は経皮的に知覚神経の再生を評価するために単位面積当たりの蛍光の発色強度を解析ソフトで計測することで表面的な再生軸索の程度を定量化しモデル間の神経再生を評価した。

蛍光顕微鏡下で撮影した画像から、LAS AF light を用い皮弁の縫合線上を囲み、その内部の発色強度の平均値を算出した。(図5)



(図5)

その対比として、同一視野の健常皮膚を囲み発色強度の平均値を算出した。(図6)



(図6)

皮弁の発色強度の平均/健常皮膚の発色強度の平均(以下ピクセル比)を算出しこの値をグラフに示し、発色強度の7日毎の移り変わりを調べた。

上記結果を踏まえ、より良い神経再生を促す新しい治療法の検討として神経再生促進作用のあるタクロリムスの外用薬を使用し、その再生形態の違いについて検討した。

神経温存モデル、神経切断モデル、植皮モデルを作成し0.1%タクロリムス含有軟膏を5日塗布し2日休薬を移植皮膚上に塗布した。

これを35日間行い、同様に評価してモデル間の相違とタクロリムス未使用群との神経再生の違いについて評価した。

4. 研究成果

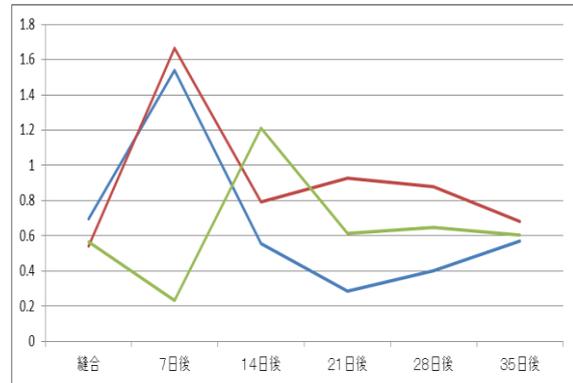
B) CCDカメラ搭載の蛍光顕微鏡を用い蛍光顕微鏡での撮影をデジタルデータとして記録した。

解析ソフトを用い、得られたデータの皮弁部を囲み、その内部のピクセルの平均値を算出し皮膚への知覚再生を評価した。

その際、撮影条件で誤差が出ないように同視野内の皮弁から離れた健常皮膚を同様に囲みその値との比を用いた。

これにより個々の発現の強さや周囲の状況によらず、発光の状態を統一することができ数値データとして評価することができた。今回の評価方法として用いた数値は蛍光発色をピクセルで数値化したものを用いた。

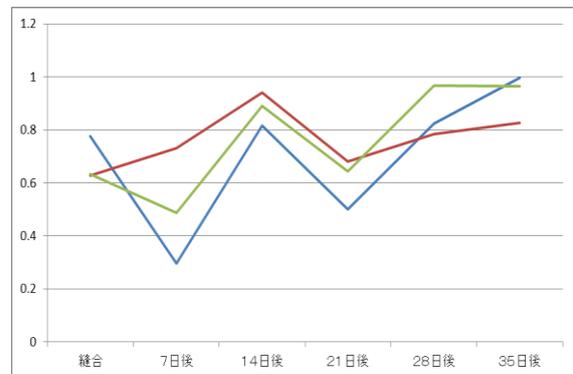
Live imagingの結果を7日毎に表とした。術後一度ピクセル比の上昇が認められたがその後**神経切断モデル**・**植皮モデル**はピクセル比は横ばいであった、21日目より**神経温存モデル**でピクセル比の上昇傾向が見られた。(図7)



(図7)

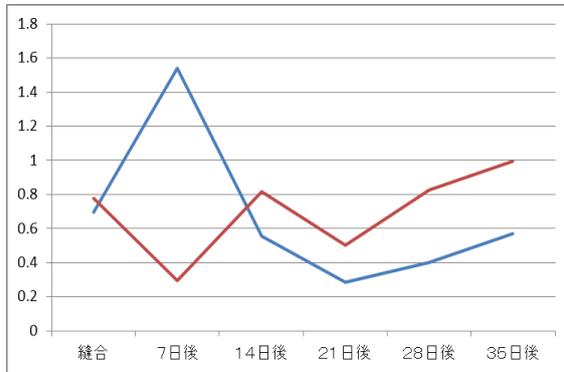
次に上記モデルで0.1%タクロリムス含有軟膏を塗布すると**神経温存モデル**・**植皮モデル**・**神経切断モデル**(グラフの色と対応)の順で数値が高かった。すべての群において14日目に一度数値の上昇を認めたのち、21日目に数値が低下後ピクセル比が上昇し、特に神経温存モデルで上昇が強い傾向にあり、35日にはほぼ健常皮膚と同程であった。

(図8)



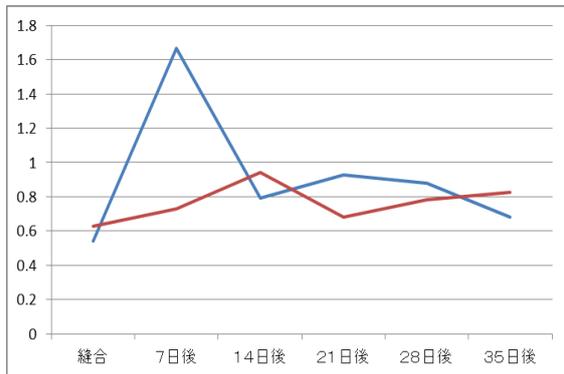
(図8)

神経温存モデルのみで比較すると軟膏塗布群は未塗布群（グラフの色と対応）に比べ14日目より健常皮膚との比が軟膏塗布群で高くなり、その差は時間がたつにつれ拡大した。（図9）



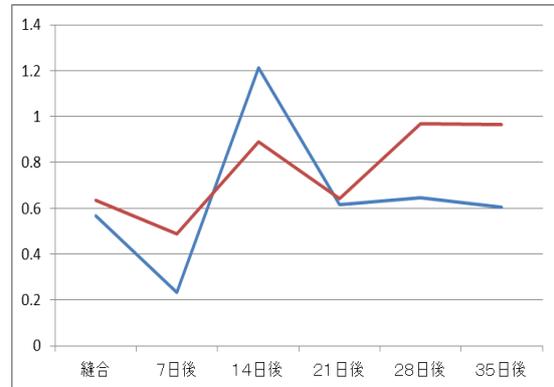
(図9)

神経切断モデルのみで比較すると軟膏塗布群と未塗布群（グラフの色と対応）はほぼ同じ値であったが、軟膏塗布群は緩やかではあるが、ピクセル比の上昇がみられた。（図10）



(図10)

植皮モデルのみで比較すると軟膏塗布群は未塗布群（グラフの色と対応）に比べ21日目よりピクセル比が軟膏塗布群で高くなった。（図11）



(図11)

知覚神経再生を live imaging を用い評価し、皮膚移植と皮弁移植、神経を温存した知覚皮弁で行った。

知覚皮弁は皮弁領域の知覚神経が温存されているため、知覚の低下がほとんどないこと（ピクセル比が1に近い）が推測されたが、軟膏未塗布群で他群に比べピクセル比が低下する時期があるという結果となった。

更に軟膏未塗布群で術後7日後または14日後に健常皮膚の発色強度を超える値となり、ピクセル比が1以上となった。一方で軟膏塗布群ではすべての群で14日目に発色強度の上昇に伴うピクセル比の上昇がみられたが健常皮膚の値を超えることはなかった。

ピクセル比が上昇した原因としては術後7日から14日後の創縁の異常発色によるものである。（図）



(図12 皮弁縫合部周囲に異常発色を認める)

異常発色の原因は、創縁周囲の炎症に伴うと考えられた。炎症が原因と考えた理由として、軟膏塗布群ではピクセル比の上昇がみら

れるものの、軟膏未塗布群に比べその程度が少なく、タクロリムスの抗炎症作用によると考えられたからである。今後モデル作成後7から14日目の組織学的検討などを行い、炎症と蛍光発色の関係を解明していく予定である。

本研究ではピクセル比を用いた評価方法がまだ確立しておらず、データにばらつきが出てしまった可能性がある。今後検体数を増やし、発色強度のサンプリングをどのように行うか検討する必要があると考える。

神経再生促進因子として用いたタクロリムスは1984年に筑波山の土壌より発見された放線菌より生成した強力な免疫抑制剤であるが、神経保護作用や神経栄養作用に加え軸索伸長の促進作用があると報告されている。しかし、今まで行われてきた研究は全身投与例であり、免疫抑制などの全身への作用が危惧される。その為、全身作用の少ない外用薬が神経再生の有用性が証明される事は非常に有意義であると考ええる。

本研究の結果からタクロリムスを外用した全ての群でピクセル比が高く知覚神経再生促進を示唆する結果となった。

今回解明に至らなかった皮弁移植術や皮膚植皮術での知覚再生の起源については今後更なる研究を行っていきたいと考える。

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)

[学会発表] (計3件)

経皮的神経刺激装置を用いた術前の顔面神経評価の有用性 2012年 顔面神経研究会

経皮的神経刺激装置を用いた術前の表在性末梢神経評価の有用性 2012年 日本形成外科学会

神経再生における短期的神経刺激装置の有用性について 2012年 日本形成外科基礎学術集会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

名取 悠平 (NATORI Yuhei)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：80445478