

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592708

研究課題名(和文)非創傷部位への陰圧療法の可能性を探る 末梢神経再生・移植脂肪生着増加を目指して

研究課題名(英文)Possibility of the external tissue expander - Aiming at peripheral nerve regeneration and fat graft survival.

研究代表者

森 弘樹 (Mori, Hiroki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：80345305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：陰圧療法を創傷のない皮膚、皮下組織に行い、末梢神経、移植脂肪への影響を評価することを目的とした。ヌードマウスの背部に皮弁を作成し陰圧療法5日間を行った。マウス背部への脂肪移植では術前1週と術後2週に陰圧をかけ、ヒト脂肪移植、および塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)付加を比較した。脂肪細胞を伸展培養し検証した。陰圧治療は皮弁末梢部の血流に悪影響を与えた。神経ペプチドは5日目では増加した。脂肪移植実験については吸引群で吸収が早まり、bFGFは生着の増加を促した。脂肪細胞は伸展により数が減少するが脂肪合成活性は上昇した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate the influence of the external expander to a peripheral nerve and fat graft. A flap was made in the dorsum of the nude mouse and the expander was put on the flap. The negative pressure (-15 to -30mmHg, 10hours/day) was given via expander for 5 days. In the fat graft, the negative pressure was given 1 week before graft and 2 weeks after graft. Human fat was grafted in the dorsum of the mouse and the expander was put on the dorsum. Fat graft + negative pressure, fat graft combined with basic fibroblast growth factor (bFGF) + negative pressure, and fat graft only were compared. Adipocyte was extensively cultivated. The distal sides of the flap become necrotic due to negative pressure. Neuropeptide was increased in the 5th day. In fat graft, absorption was recognized in the negative pressure group. And survival of fat graft increased with bFGF. In extensive culture of adipocyte, number of adipocyte was decreased, but synthetic ability was increased.

研究分野：形成外科学

キーワード：陰圧療法

## 1. 研究開始当初の背景

陰圧閉鎖療法は Argenta らの報告 (Ann Plast Surg. 1997;38:563-577.) 以来、徐々に普及してきた。当初から創面積縮小、肉芽増生、浮腫改善、細菌数減少に効果があることが報告され、開放創に対する使用が主体となっている。一方、乳房形成の分野において 1999 年にアメリカで BRAVA が開発された (Plast Reconstr Surg 105: 2500, 2000)。これは乳房の表面から陰圧をかけ、1 日 10 時間、10 週の使用で乳房の増大を図る医療器具であり、良好な臨床成績 (Plast Reconstr Surg 2007, 120: 1680-9.) が報告されている。

BRAVA の基礎的な検討はほとんどなされていないが、最近、Kato らは体外式の組織拡張器により脂肪増大が起こるが可逆的反応であること、それが塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) によって起こることを示した (TISSUE ENGINEERING: Part A 16: 2029-40, 2010)。また Younan らは開放創への陰圧閉鎖療法により皮膚内に神経線維が再生すること、神経成長因子の発現が見られることを示し、脱神経領域に陰圧閉鎖療法を行うことで創治癒を促進する可能性を示唆した (Plast Reconstr Surg. 126: 87, 2010)。

脂肪注入は生着率向上が課題だが、その試みとして脂肪幹細胞 (Aesthet Surg J. 2010; 30: 381-7.)、血管内皮細胞増殖因子 (Plast Reconstr Surg. 2009; 124: 1437-46.) を併用する報告がある。Del Vecchio ら (Plast Reconstr Surg. 127: 2441-50, 2011) は BRAVA 使用後に脂肪を移植し乳房を増大させ、陰圧療法が脂肪生着向上に寄与することを示唆した。

体外式組織拡張器を使うと細胞レベルでは細胞を伸展させる。脂肪細胞を機械的に伸展する基礎実験では、脂肪生成や分化が抑制されるとの報告が複数 (Tanabe 2004, Akimoto 2005, Yang 2012, Khayat 2012) ある。これらの実験では、1 分あたり 1-60 回と頻回の伸展刺激であり、Brava® と同じ長時間の伸展刺激の検討はされていない。

## 2. 研究の目的

このような背景のもと、今回我々は陰圧療法が皮弁知覚回復と脂肪移植後の生着率増加に対してどのような効果を発揮するのかについて解明すべく、ヌードマウスを用いた動物実験を行い、さらに細胞レベルの検討を行うため、伸展培養下で脂肪細胞を培養し、陰圧によって細胞が牽引される影響を検証することを計画した。

皮弁内知覚回復に与える影響を評価するために、ヌードマウスの背部に軸走皮弁を作成する。陰圧療法ののち、免疫組織学的検索な

どにより、神経線維、神経ペプチドがどのように進入、分布するかを明らかにする。免疫組織学的検索により、脂肪細胞数の変化、量の変化を明らかにする。これらにより陰圧環境下の周囲皮膚、もしくは底部からの神経再生の程度、また皮弁遠位部での血管新生と脂肪細胞数、脂肪幹細胞の分布を評価する。

移植脂肪生着に与える影響を評価するために、ヌードマウスの頂部に人からの吸引脂肪を注入して移植する。術前後に陰圧治療を行う。免疫組織学的検索により、脂肪細胞数の変化、量の変化を明らかにする。これらにより陰圧環境下の血管新生と脂肪細胞数、脂肪幹細胞の分布を評価する。さらに実験の発展形として bFGF 添加陰圧療法が移植脂肪生着に与える影響の評価を行う。本実験モデルにおいて、bFGF を添加することで、脂肪再生にどのような効果を示すかを調べる。

次に伸展培養器を用いて脂肪細胞を培養した場合に、増殖能、サイトカイン発現がどのように変化するかを調べ、細胞レベルの検証を行う。

以上の研究により陰圧療法が創傷のない皮膚、皮下組織に対して末梢神経、脂肪組織の増殖にいかに関与しているかのメカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

< 研究 1: 陰圧療法が皮弁内知覚回復・脂肪硬化に与える影響 >

陰圧装置は BRAVA ミニチュアポンプ、もしくは吸引ポンプ (アズワン コンパクトエアポンプ NUP-2) とフリームービングシステム (エイコム 京都)、点滴用チューブ、ポリエチレンテレフタレートドーム (径 20mm) ハイドロコロイド、フィルムを組み合わせ作成した (図 1)。

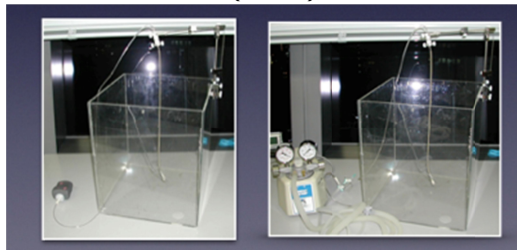


図 1

8-9 週齢のヌードマウス (15-19g) の背部に 15\*8mm 軸走皮弁を作成した翌日から皮弁を含む径 20mm の範囲に 15-30mmHg による吸引をかけ、1 日 10 時間 5 日間の処置を行った。コントロール群は皮弁作成のみを行った。5 日目と 10 日目に屠殺を行い、肉眼的、組織学的検討を行った (図 2)。

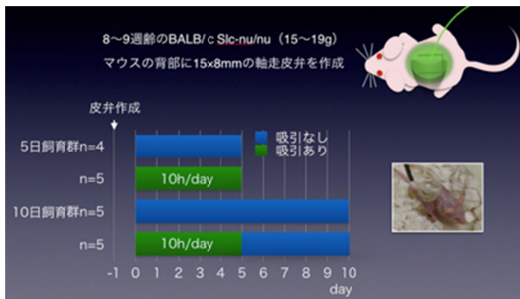


図 2

皮弁部を永久標本とし、免疫染色によって皮弁中央部での各陽性細胞数を数えた。神経ペプチド (Substance-P) は酵素抗体法を行い、対物 40 倍視野で数えた。脂肪細胞 (perilipin+)、血管 (isolectin+) は蛍光抗体法で多重染色し、対物 20 倍視野で数えた。

< 研究 2：陰圧療法が移植脂肪生着に与える影響 >

脂肪移植実験では術前 1 週と術後 2 週に陰圧治療を行い、ヒト脂肪 0.5g 移植、脂肪 0.5g+塩基性線維芽細胞増殖因子 1 $\mu$ g 移植、脂肪移植(吸引-)の 3 群とし、術後 4 週で屠殺する (図 3, 4)。

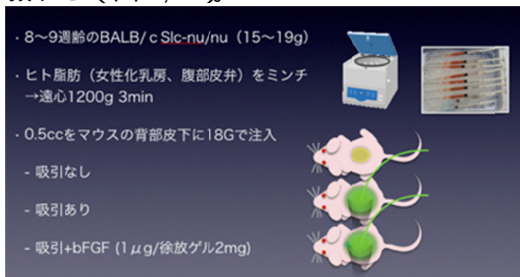


図 3

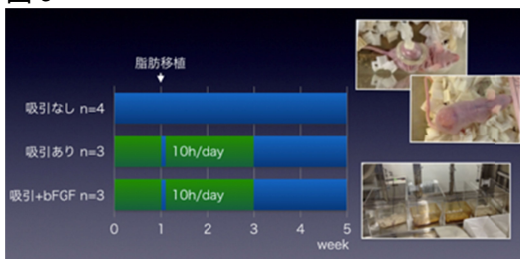


図 4

< 研究 3：脂肪細胞の伸展培養 >

培養細胞は、成熟ラットの皮下白色脂肪細胞キット (コスモバイオ) を用いた。伸展装置は、培養細胞伸展システム (STB-140 ストレックス) 及び有効面積 4cm<sup>2</sup> のシリコンチャンバー (ストレックス) を用いた。チャンバーにはコラーゲンをコーティングした (図 5)。



図 5

80 × 10<sup>4</sup> 個の脂肪細胞を播種後 4 日目に、ストレッチ群に対し、1 日 1 回 10 時間、20% 長の伸展刺激を与えた。コントロール群は伸展をしなかった。伸展開始後 1 日目、2 日目、3 日目、及び 4 日目に細胞を回収した。生細胞数のカウント及び脂肪合成活性の指標となる GPDH 活性の測定を行った。2 回目の実験では伸展刺激を 10% 長とした (図 6)。

ラット脂肪前駆細胞 皮下白色脂肪細胞培養キット(細胞&増地) [コスモバイオ] ~ 播種後4-5日目に脂肪蓄積、7日目に成熟期



図 6

4. 研究成果

研究 1

吸引群 (n=10) において 1 日 10 時間、5 日間の装着は可能で、装置外れ、褥瘡発生を認めなかった。吸引群とコントロール群 (n=9) を比較すると肉眼的に吸引群の皮弁は浮腫状となり末梢部が壊死に陥ることがあった。吸引群の壊死面積を 5 日目時点で写真計測すると壊死率は平均 29.8% であった。10 日目には浮腫は軽減した (図 7)。

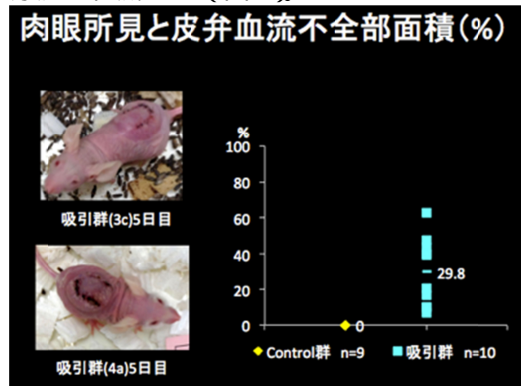


図 7

組織の厚みを表皮、真皮、皮下組織においてそれぞれ、5 日飼育群、10 日飼育群で、比較した。表皮では吸引群で有意差はないが増大する傾向が認められた。また 5 日群よりも 10 日群で増大する傾向を認められた。真皮においても同様の傾向を認められた。皮下組織ではそのような傾向はなく、同等、むしろ吸引群で減少した (図 8)。

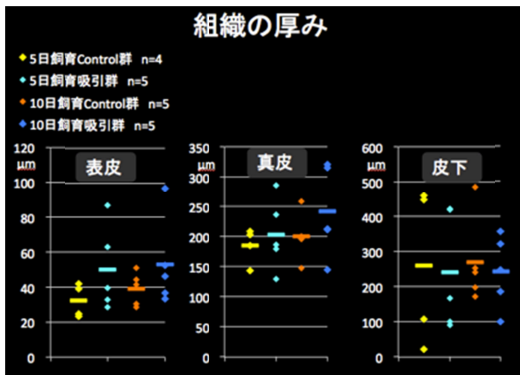


図 8

神経ペプチドは 5 日屠殺群で吸引群が多い傾向を示したが、10 日群では逆となった (図 9)。



図 9

脂肪細胞数は吸引群で少ない傾向で、5 日屠殺群で吸引群 (n=5,  $15.6 \pm 1.67$ ) が、コントロール (n=4,  $50.0 \pm 39.2$ ) と比較して有意に少なかった (図 10)。

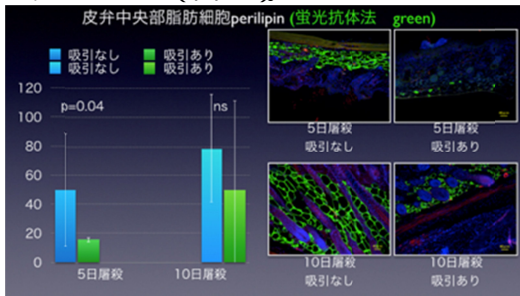


図 10

血管数は 5 日屠殺群で吸引群が少ない傾向を示したが 10 日群では逆となった (図 11)。

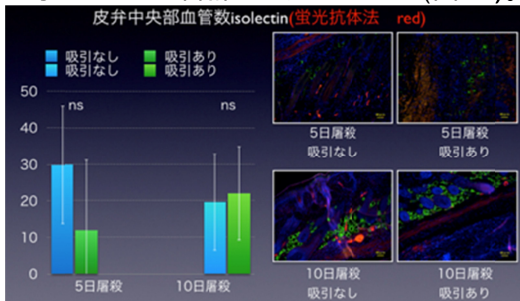


図 11

## 研究 2

吸引なし (n=4) で最も脂肪組織残存率が高く 85%、吸引群 (n=3) 72%、吸引+bFGF 群 (n=3) 60% の順で低くなった (図 12)。

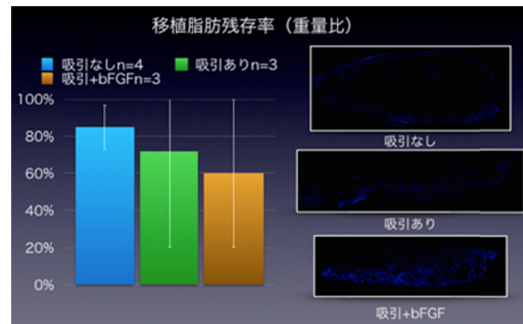


図 12

単位面積当たりの脂肪細胞数をカウントすると吸引なし (n=2) で  $3.7/\text{mm}^2$  と低く、吸引群 (n=1)  $5/\text{mm}^2$ 、吸引+bFGF 群 (n=1)  $10.9/\text{mm}^2$  の順で高くなった (図 13)。



図 13

単位面積当たりの血管数をカウントすると吸引なし (n=2) で  $6/\text{mm}^2$ 、吸引群 (n=1)  $2.5/\text{mm}^2$ 、吸引+bFGF 群 (n=1)  $3.7/\text{mm}^2$  であった (図 14)。

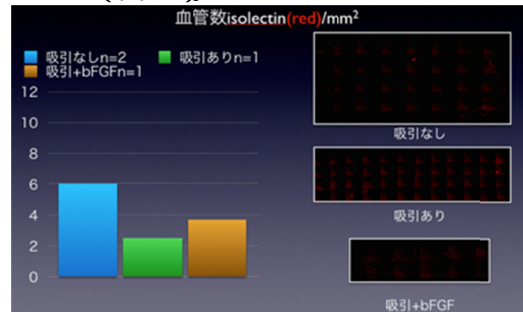


図 14

## 《結論》

陰圧治療は皮弁末梢部の血流に悪影響を与えた。脂肪細胞は血流低下により一部が壊死したと考える。5 日屠殺群と 10 日屠殺群の差は吸引の中止により創治癒の過程をみている可能性がある。

脂肪移植実験については吸引群で吸収が早まった可能性がある。bFGF の添加は生着脂肪の増加を促す可能性がある。

今回の 0.5cc 一塊の脂肪注入では 3mm 以上の直径になることと、内圧の上昇が起こりやすく、効果の検証が難しいことが考えられた。

## 研究 3

伸展率 20% のグループでは両 group とも脂肪生成を認めた。stretch group では細胞の剥離を認めた (図 15)。伸展率 10% のグルー

プでは両 group とも脂肪生成を認めた。stretch group では細胞の剥離および細胞塊の形成を認めた (図 16)。

細胞数については 10%, 20%ともに stretch group で細胞数が減少する傾向を認めた (図 17)。

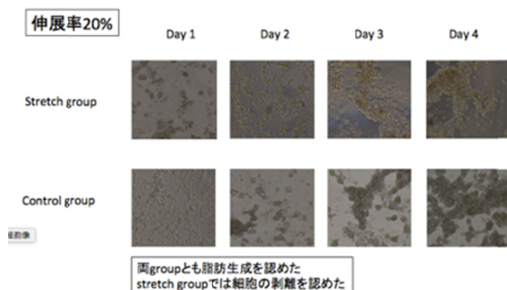


図 15

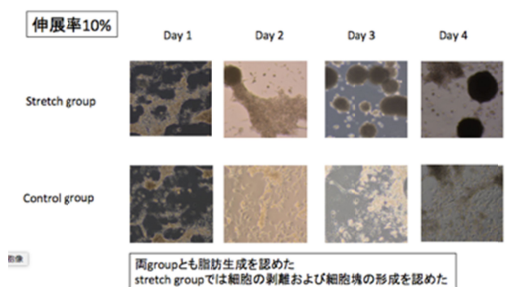


図 16

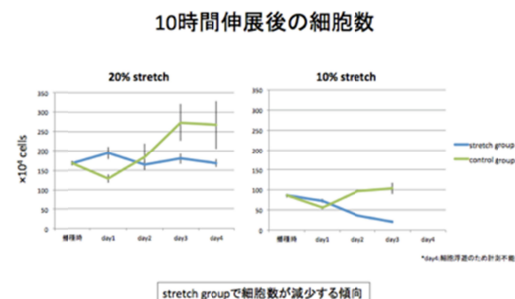


図 17

GPDH 活性については 10%, 20%ともに stretch group で単位細胞数あたりの GPDH 活性が増加する傾向を認めた (図 18)。

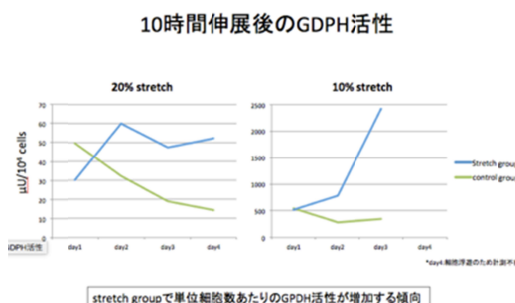


図 18

## 《結論》

脂肪細胞は分化により脂肪が蓄積する為、培養容器から剥離しやすい傾向がある。本研究でもストレッチ群で細胞の剥離が観察された。脂肪細胞の減少は、伸展で細胞が剥離しやすくなることと、伸展刺激そのものの2つの要因が考えられる。一方で GPDH 活性の上昇が見られた。過去の高頻度伸展では低下するとされており、長時間伸展によって脂肪分化・生成が上昇する可能性が示唆された。

## 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0件)

[学会発表](計3件)

1. 森 弘樹, 植村法子, 末貞伸子, 岡崎 睦. 非創傷部位への陰圧療法の可能性を探る 第二報 皮弁部の組織学的検討と脂肪移植について. 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会. 松本市, 2014年10月9日
2. 植村法子, 森 弘樹, 岡崎 睦. 非創傷部位への陰圧療法の可能性を探る 第三報 脂肪細胞の伸展培養の試み. 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会総会. 松本市, 2014年10月9日
3. 石井義剛, 森 弘樹, 植村法子, 末貞伸子, 岡崎 睦. 非創傷部位への陰圧療法の可能性を探る 第一報 マウス用陰圧装置の作成と皮膚への影響について. 第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会. 新潟市, 2013年11月8日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
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

森 弘樹 ( Mori, Hiroki )  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究  
科・講師  
研究者番号：80345305

(2) 研究分担者

岡崎 睦 ( Okazaki, Mutsumi )  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究  
科・教授  
研究者番号：50311618

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：