

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20315

研究課題名(和文)ラット背部有茎皮弁の生着域に対する生理活性タンパク質含有シートの効果

研究課題名(英文)The effect of bioactive protein for survival area of pedicled flap on the back of rat.

研究代表者

新井 雪彦 (ARAI, YUKIHIKO)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：20458178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラミニンなどの生理活性タンパク質は血管新生効果が報告されている。ラットの背部に皮弁を挙上し、生着域拡大のため生理活性タンパク質を含んだコラーゲンシートを皮弁下に配置した。しかしながら、血管新生効果および皮弁生着域拡大効果は明らかではなかった。皮弁の生着域は血行領域におおむね一致していた。

そこで、ラット背部のU字型皮弁において、血管を選択的に温存して皮弁生着領域を観察した。双茎皮弁では血管茎から2ないし2.5血行領域が生着の限界であった。双茎皮弁の中央に流入血管を温存し、2回目の手術で切離すると、血管茎から2.5血行領域が安定的に生着すると思われた。

研究成果の概要(英文)：Bioactive proteins, such as laminin, were reported that has an angiogenesis effect. Skin flap was raised on the back of rat, and a sheet containing bioactive protein was placed on the wound in order to extend survival area of the skin flap. Both its angiogenesis and extending effect, however, were not clear. Survival area of the skin flaps are roughly corresponding to its perfusion area.

Then, a U-shaped skin flap was raised on the back of rat, and survival area of the skin flap was carefully observed by preserving blood vessels selectively. In bipedicle flap, 2 to 2.5 perfusion area from each vascular pedicle has limitations on survival. Additional blood vessels preserved at the center of this flap, seemed to be developing stability in the 2.5 perfusion area from vascular pedicle, even though they were cut in the second operation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ラミニン 血管新生 皮弁遷延法

1. 研究開始当初の背景

皮弁手術は、組織欠損の再建に不可欠であるが、部分壊死の問題は現在も解決されていない。皮弁血流の増強や周囲組織からの血流再開の促進により、部分壊死の回避が期待され、種々の方法が試みられている。

皮弁の生着には、十分な皮弁血流が必要であり、その血流は皮弁内の血管構造に依存する。従来、皮弁内の血管構造は主軸型と乱軸型に二分して論ぜられてきたが、近年は解剖学的血行領域とそれら領域間をつなぐ choke 血管に着目して皮弁血行が論じられる。すなわち、皮弁内に複数の解剖学的血行領域が含まれる場合、その間に存在する choke 血管が拡張し、皮弁栄養血管の解剖学的血行領域から末梢の解剖学的血行領域へと血流が到達する (linking 現象)。この linking 現象が波及する解剖学的血行領域の範囲は一定であり、皮弁基部の第 1 血行領域とそれに隣接する第 2 血行領域との間には確実に linking が起こる。しかし、第 2 血行領域と第 3 血行領域の間の choke 血管には必ずしも linking は起こらず、生着・壊死境界線が生じる。

一方、鬱血に陥った再接着指は切断近位端との再血行が生じるまでの 4 ~ 5 日間の瀉血操作で救済できることは臨床でしばしば経験することであり、植皮や遊離複合組織移植のような少量の組織であれば血管吻合を伴わない組織移植が可能である。

以上より、皮弁生着領域の拡大には、choke 血管の拡張を促す、または新生血管により各血行領域をつなぐ方法と、周囲組織からの血行再開を促す方法が考えられる。

皮弁血行を改善し、生着領域を拡大する試みは多数行われてきたが、現在最も信頼の置ける方法は皮弁遷延法である。本法は即ち、必要とする皮弁領域を部分的に挙上することで各血行領域への血流を減じ、choke 血管を拡張して linking 現象を起こすことで皮弁血流を増強する方法といえる。しかし、この方法には二期手術が必要となるという大きな欠点がある。

他方、血管拡張薬や抗凝固薬、抗酸化薬などの効果は限定的である。

このような状況を受けて岡本らは、血管新生作用を有する bFGF をフィブリン糊シートに混和し、皮弁下に埋入することで皮弁の血管新生を促し、皮弁の生着領域を拡大できたと報告した。このことは、一期手術における簡便な処置で皮弁の生着領域を拡大する道を開いたという意味で画期的であり、皮弁遷延法や薬剤投与と併用可能であることから応用範囲の広がりを感じさせる。

このように bFGF により皮弁生着領域拡大の端緒が開かれたが、血管新生作用を有する物質は多数あり、その優劣は明らかでない。

これまで、in vivo で皮弁における生着領域拡大効果が調べられてきた物質としては、

増殖因子や各種薬剤 (血管拡張薬、抗凝固薬、抗酸化薬など) があるが、細胞外マトリックスであるラミニン、コラーゲンやフィブリンなどの報告は見られない。

基底膜を構成する主要な蛋白であるラミニンは、5 種類の鎖、3 種類の鎖と鎖からなるヘテロ三量体であり、12 種類のイソ型が確認されている。このうち、1 鎖、4 鎖、1 鎖で血管新生を促進するという報告がなされている。また、ラミニン 1 (1 1 1) は、FGF との相互作用により血管新生を促進することが報告された。ラミニンにより、皮弁血流の増強および皮弁生着領域の拡大が確認されれば、bFGF との併用により、さらなる効果を得られる可能性が示される。コラーゲン (VI 型および V 型) やフィブリン II についても、これらを用いて内皮細胞を培養すると管腔形成することが報告され、血管新生に細胞外マトリックスが関与していることが明らかとなっている。そしてその機序は増殖因子とは異なると考えられる。

2. 研究の目的

ラミニンに代表される細胞外マトリックス構成蛋白を用いて、in vivo での血管新生、皮弁生着領域拡大効果について検証し、皮弁救済への応用の可能性を示すとともに、将来的には増殖因子との併用効果の解明へと繋げていくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 「ラット背部皮弁の生着領域に対する、細胞外マトリックス構成蛋白含有シートの効果」

Sprague-Dawley 系雄性ラット (250 ~ 300g) を使用し、イソフルラン吸入麻酔下に背部皮膚脱毛後、背部正中に尾側を茎とする 3 × 9 cm の乱軸型皮弁を肉様膜を含めて挙上する。皮弁作成後、LED ライトにより皮弁を透過し、皮弁血管を評価して写真撮影する (LED VIDEO

LIGHTING : NanGuang 社、EOS KISS X6i : Canon 社)。その後、5%フルオレセインナトリウム 20 mg/kg を静注し、30 分後に皮弁の dye distance (DD) を IVIS imaging system (PerkinElmer 社) により測定・撮影記録する。実験は以下の 3 群を設定し、DD 測定後に対応する処置を行い、皮弁を縫い戻す。それぞれ皮弁作成後 7 日目に survival length (SL) を測定する。DD、SL は最大値、最小値の 2 点を計測し、その平均値とする。得られた値は統計学的処理

(Wilcoxon-Mann-Whitney test, Bonferoni 調整) を行って評価する。

I 群 (対照群) : 何も処置をせず元の位置に縫合する。

II 群 (ハイドロゲル群) : 皮弁裏面にハイドロゲルシートを置く

III 群（細胞外マトリックス構成蛋白混和ハイドロゲル群）：皮弁裏面に細胞外マトリックス構成蛋白（ラミニン等）を混和したハイドロゲルを置く。

（2）「透明標本による皮弁血管形態の経時的变化の評価」

（1）と同様の処置を行う3群を設定し、1～7日目まで経日的に皮弁を周囲の皮膚と母床を含めて採取し、透明標本化することにより皮弁内血管形態を観察する。透明標本の作製は Spalteholtz 法に準じて行うが、原法とは異なり血管を自然の状態を観察するため、墨汁などの contact media は注入せず、皮弁採取後約10時間自然乾燥させ、血管内のヘモグロビンが血管壁にしっかり固定されてから皮弁内部を透明にする。choke 血管の拡張、新生血管の位置や量について評価する。

（3）「流入血管選択的温存による皮弁遷延法の皮弁生着域に対する効果」

（1）ラット背部皮弁の生着領域に対する、細胞外マトリックス構成蛋白含有シートの効果の対照群の実験から、皮弁の生着範囲を決定するにあたり、新生血管よりも血管網の位置と再構築が重要である可能性が示されたため、下記の実験を予備実験として追加した。

Sprague-Dawley 系雄性ラット（250～300g）を使用し、イソフルラン吸入麻酔下に背部皮膚を脱毛後、背部に幅約2.5mmの逆U字型の皮弁を設定する。この皮弁は、両側の深腸骨回旋動静脈、肋間動静脈、胸背動静脈、正中の奇静脈を含み、動脈系6領域、静脈系7領域を含む。この皮弁範囲から下記I群～VI群の条件で実際の皮弁を挙上した。皮弁挙上時、7日後、14日後の時点で可能であれば、LEDライトにより皮弁を透過し、皮弁血管を評価して写真撮影した。（LED VIDEO LIGHTING：NanGuang社、EOS KISS X6i：Canon社）。

I 群：両側肋間動静脈を温存して4血行領域を含む皮弁を挙上し、創縁を縫い戻した。術後7日目、皮弁生着域を確認した。

II 群：片側深腸骨回旋動静脈および、対側肋間動静脈を温存して5血行領域を含む皮弁を挙上し、創縁を縫い戻した。術後7日目、皮弁生着域を確認した。

III 群：両側深腸骨回旋動静脈を温存して6血行領域を含む皮弁を挙上し、創縁を縫い戻した。術後7日目、皮弁生着域を確認した。

IV 群：両側深腸骨回旋動静脈および正中の奇静脈を温存した皮弁を挙上し、創縁を縫い戻した。7日後、皮弁を再挙上し、奇静脈を切離して、再度皮弁創縁を縫い戻した。14日目、皮弁生着域を確認した。

V 群：両側深腸骨回旋動静脈および両側胸背動静脈を温存して、6血行領域を含む皮弁

を挙上し、創縁を縫い戻した。7日後、両側の深腸骨回旋動静脈を温存し、両側胸背動静脈を切離して、再度皮弁創縁を縫い戻した。14日目、皮弁生着域を確認した。

VI 群：両側深腸骨回旋動静脈および両側胸背動静脈を温存して、6血行領域を含む皮弁を挙上し、創縁を縫い戻した。7日後、片側の深腸骨回旋動静脈を温存し、両側胸背動静脈と対側深腸骨回旋動静脈を切離して、再度皮弁創縁を縫い戻した。14日目、皮弁生着域を確認した。

4. 研究成果

（1）「ラット背部皮弁の生着領域に対する、細胞外マトリックス構成蛋白含有シートの効果」

対照群として、SDラット背部に3×9cm大の皮弁を挙上し、担体を間置せずに縫い戻す実験を開始した。縫合後、色素静注を行い、染色範囲と生着範囲がおおむね一致し、その範囲は皮弁基部からおおよそ5cmであった。また、生着範囲は皮弁の基部から2つめの血管網までの範囲とおおむね一致し、血管網の間の細い血管（choke血管）が拡張していた。

当初、担体シートとしてハイドロゲルを想定していたが、強度がもろく、皮弁下に配置することが困難であったため、コラーゲンシートに細胞外マトリックス構成蛋白を含浸させて配置する方法に変更して実験を行った。

III 群として、SDラット背部に3×9cm大の皮弁を挙上し、ラミニン、bFGF、をそれぞれ含浸したコラーゲンシートを配置して血管新生効果を観察したが、明らかな血管新生効果を認めなかった。そこで、皮弁を1×1cm大として、ラミニン、bFGF、CTGF、IGF-Iをそれぞれ含浸したコラーゲンシートを配置して血管新生効果を観察する予備実験を行ったが、やはり明らかな血管新生効果を認めなかった。

（2）「透明標本による皮弁血管形態の経時的变化の評価」

（1）「ラット背部皮弁の生着領域に対する、細胞外マトリックス構成蛋白含有シートの効果」の結果を受けて、組織標本で皮弁内血管形態を観察する予定としていたが、前述の通り細胞外マトリックス構成蛋白含有シートによる皮弁血管新生および皮弁生着域の拡大効果が明らかでなく、評価に至らなかった。

（3）流入血管選択的温存による皮弁遷延法の皮弁生着域に対する効果

I 群：

1例施行し、皮弁は4血行領域中、4血行領域生着した。

II 群：

2例施行し、2例とも小範囲の部分壊死があ

ったものの5血行領域が生着した。

III群：

2例施行し、1例は両側深腸骨回旋動静脈からそれぞれ2領域までの生着で、皮弁中央部は壊死した。もう1例は、両側深腸骨回旋動静脈からそれぞれ2.5領域生着し、皮弁中央部遠位に壊死を生じたが、皮弁の連続性は保たれた。

IV群：

1例施行し、両側深腸骨回旋動静脈からそれぞれ2.5領域生着し、皮弁中央部遠位に壊死を生じたが、皮弁の連続性は保たれた。

V群：

2例施行し、両側深腸骨回旋動静脈からそれぞれ2.5領域生着し、皮弁中央部遠位に壊死を生じたが、皮弁の連続性は保たれた。

VI群：

4例施行し、2例は皮弁遠位外側に壊死を生じたが、最終的に温存した片側深腸骨回旋動静脈から6領域まで部分生着し、皮弁の連続性が保たれ、皮弁先端から出血を確認した。残り2例は、最終的に温存した片側深腸骨回旋動静脈から3及び3.5領域まで生着し、それより遠位では壊死した。

以上I群～VI群の結果より、皮弁遷延法なしでは、双茎皮弁の場合、血管茎から2～2.5領域までが生着の限界と考えられる。皮弁の中央部に(奇静脈または胸背動静脈などの)血管を温存して皮弁遷延した場合は、2.5領域まではほぼ確実に生着する。同様に血管を温存して、単茎皮弁とした場合は、血管茎から3ないし3.5領域まで生着したが、血管の再構築の状態によっては6領域まで生着する場合があった。しかしながら、その詳細な要因は未だ不明と言わざるを得ない。

(4)得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

今回実験に使用した細胞外マトリックス構成蛋白および増殖因子と担体の組み合わせにおいては、明らかな血管新生効果が見られず、皮弁生着領域拡大効果も観察できなかった。細胞外マトリックス構成蛋白や増殖因子の濃度や、担体との吸着・放出性等の要因が考えられる。

一方、皮弁の血流条件と生着域の範囲については、これまでのところ4領域までの双茎皮弁についての報告があるのみで、5領域、6領域の生着範囲についての報告は見られなかった。今回の実験結果から、双茎皮弁の血管茎からの血行領域と皮弁遷延法による生着域の範囲について新たな知見が得られ、皮弁遷延法の適応範囲の拡大が期待される。

(5)今後の展望

双茎皮弁の血管茎からの血行領域と皮弁遷延法による生着域の範囲についての効果と限界に示唆が得られたが、いずれも実験数が少なく、結果の安定性が不十分で統計学的

な処理も行えていない。また、LED透過光でのchoke血管径の観察は可能であったが、組織学的な評価は行っていない。今後は、報告のない5領域以上の皮弁について実験数を増やし、choke血管径の詳細な評価を行って、血行動態が皮弁生着領域拡大に与える要因を解明していきたい。

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0件)

[学会発表](計2件)

新井雪彦,後藤文,本庄省五,三橋伸行,小林誠一郎. 新たな皮弁遷延法を検証するためのラット多血行領域皮弁モデルの作成. 第59回日本形成外科学会総会・学術集会. 2016.4.14. 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

新井雪彦,後藤文,三橋伸行,佐々木孝輔,櫻庭実. 新たな皮弁遷延法による皮弁生着域拡大の試み. 第22回日本形成外科手術手技学会. 2017.2.18. 大田区産業プラザPiO(東京都大田区)

[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

新井 雪彦(ARAI, Yukihiko)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：20458178

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()