

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 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：24592709

研究課題名(和文) ナノスペクトCTを用いた、筋弁・脂肪弁における血流と体積の経時的変化の定量

研究課題名(英文) Evaluation of chronological change of volume and blood flow in the muscular and adiposal flap using nano SPECT/CT

研究代表者

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

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)：移植手術後の脂肪組織の体積変化の特性を動物実験から明らかにした。Zuckerラットを使用した下腹部脂肪移植モデルを作成し、栄養血管に虚血や鬱血のストレスを与えて術後の体積変化を比較検討した。また移植組織の血流の指標として組織中の毛細血管密度を測定した。ストレスが加わらない場合、術後12週間の経過で移植脂肪の体積変化は34.7%であり、ストレスが加わると体積変化は13.2%と体積減少が大きかった。脂肪組織中の毛細血管密度は体積変化率と有意な相関を示した( $p=0.011$ )。今回得られたデータは、実際の組織移植・再建手術において最適な術式選択と最適な移植組織量の決定に重要な情報となり得る。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine volumetric changes in vascularized fat flaps after stresses as well as their relationship to capillary density by using a new Zucker-fa/fa rat model. The volumes of vascularized fat flaps were measured weekly; superficial epigastric fat flaps were evaluated on the right side as the control and on the left side as the stress (ischemic or congestive) condition in the same rat. After 12 weeks of measurements, the capillary density of harvested flaps was studied using immunohistochemical examination. Percent changes in the body-weight-corrected flap volume 12 weeks after surgery was  $34.7 \pm 26.7$  in the control flaps and  $13.2 \pm 10.5$  in the stress flaps. The rate of decreases in the volume of the fat flaps correlated with capillary density ( $p=0.011$ ). An adequate soft tissue volume is crucial for a good outcome after reconstructive surgery. Our results are helpful for determining an operative procedure in reconstructive soft tissue augmentation.

研究分野：形成外科学

キーワード：組織移植 脂肪移植 移植組織の体積変化 血流量評価 虚血モデル 鬱血モデル 毛細血管密度 Zuckerラット

### 1. 研究開始当初の背景

当研究室では悪性腫瘍切除後や外傷後などの様々な組織欠損に対して、組織移植を用いた再建手術を行っている。その際に、例えば頭蓋底再建手術では移植組織容量の過多は頭蓋内容の圧迫につながり、口腔咽頭再建では移植組織の容量変化が発声嚥下機能に影響を与える。このように移植組織における筋体、脂肪の血流や体積の変化は再建成績に大きく関与する。しかし今までの研究では、臨床研究では手術条件や実験値の設定が困難であるという欠点があり、動物実験では体積の組織別の経時的評価の報告はほとんどなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、移植組織の体積変化と組織血流量を、ラットを用いた動物実験によって明らかにすることである。ここから得られるデータは臨床における組織移植・再建手術において、最適な術式選択と最適な移植組織量の決定に重要な情報となり得る。具体的な実験内容としては移植組織に虚血や鬱血など様々なストレスを付加し、より臨床に即したデータの収集を目指した。移植組織としては筋肉と脂肪を分けて考え、この異なる組織間での体積変化の違いを明らかにする予定であった。

### 3. 研究の方法

本研究の実施に際しては本学実験動物センターの1年以上の改修工事期間と重なってしまったため実験期間に大幅な制約が加わってしまい、当初使用を予定していた放射線照射装置と nano SPECT/CT 装置が使用できなかった。このような制限下ででき得る限りの成果を上げるべく実験を進めた。

まずは SD ラットを用いた広背筋移植モデルを作成した。このモデルで手術操作中に同定された筋組織を支配する神経や血管に切断やクリッピングなどの条件を付加することが可能となった。様々なストレス下での移植筋組織体積の長期的な経時変化を測定するべく実験数を重ねた。移植筋組織の体積変化に関しては、ストレスの加わらない移植手術において術後8週間の経過で体積は約10%程度にまで減少するという結果が得られ、学会報告した。しかしその後の実験回数の蓄積とともに複数の問題点が明らかとなった。本来 CT 装置は軟部組織の観察には適さず筋組織を周囲組織と明瞭に識別することは困難であった。そのため周囲との血流再開を妨げない人工の識別材を十数種類の材質の中から選択し手術に使用していたが、長期経過観察の過程で高率に感染を併発することが明らかとなった。感染を合併すると識別材の周囲に滲出液や膿の貯留が起こり画像からの正確な組織体積の測定ができなくなるだけでなく、麻酔操作の過程で死亡する頭数が多かった。そのため適正で効率的な実験の継続

のためには人工物の使用は適さないと判断し、その代替法として従来から想定していた自家組織による組織識別の手技の開発に移った。具体的には同一ラット個体の他の部位から薄い膜様の脂肪組織(背部の皮下脂肪や腹腔内の大網組織)を採取し、それで移植する筋体を被覆することで周囲との識別を行った。この方法は有効であったが、ひとつにはこれらの手術操作の侵襲が大き過ぎてラットの死亡率が高いこと、広範な皮下剥離のために滲出液の皮下貯留や感染などのトラブルが多いこと、さらに長期経過観察の過程で間に敷きこんだ脂肪組織が萎縮吸収されてしまい画像上の識別が難しくなっていくことなどの問題点が明らかになった。さらには移植する広背筋自体が完全に筋組織のみから成るわけではなく画像上では脂肪の density が混じって観察されること、長期経過では脂肪の density の割合が徐々に増加すること、などから、最終的には筋組織の CT 画像での長期的な経過観察は困難であると判断した。

同時に、脂肪組織移植に関する動物モデルの開発を進めた。Zucker 肥満ラットを用いた浅下腹壁動静脈を血管茎とした下腹部脂肪弁を挙上する実験手技を確立した。SD ラットでも同様の手術は可能であるが、皮下脂肪組織量が少なく CT 画像での評価が難しいことと変化の有意差を観察するには不適であると判断した。組織移植実験に Zucker 肥満ラットを用いるという着想は独創的である。実験対象を Zucker 肥満ラットとし、浅下腹壁動静脈を血管茎とした下腹部脂肪弁を用いた移植脂肪組織の体積変化の経時的測定に絞って研究を進めた。Zucker 肥満ラットは皮下脂肪組織が豊富で大きな脂肪弁を挙上することができるので、画像での観察の点でも変化率の観察の点でも非常に優れた実験モデルであった。ただし実験を重ねるとともに、このラットが非常に高率(ほぼ 100%)で術後創部への噛みつき行動をとるという生物学的な特徴が明らかになった。これにより術後1週間の経過で移植脂肪組織があらかた消失してしまうため、噛みつき行動を阻止するための工夫が必要であった。包帯やネックカラーなど複数の手技を試みた結果、医療用のストッキネットなどを利用して独自に開発した抑制具を使用することにより移植組織の損傷を防ぐことに成功し、実験の継続が可能となった。

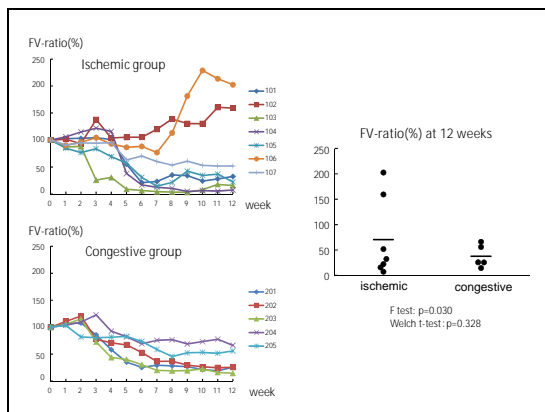
またラット個体間による差や成長とともに変化する体積量の誤差を補正するため、同一個体の両側で脂肪移植を行い右側には血管に対する負荷を与え左側はコントロールとする工夫を行った。測定結果は基本的に左右の測定値の比率を評価することとした。使用する動物実験種の選択、1週間ごとの経時的な体積変化の測定(従来の研究では組織重量が測定されることがほとんど)、同一個体でのコントロールとの比較、などの工夫によ

り独創的な優れたモデルが確立された。血管に与える負荷としては臨床における組織移植・再建手術を想定して、虚血 3 時間(血管茎の動脈にクリッピング)と鬱血 3 時間(静脈にクリッピング)とした。

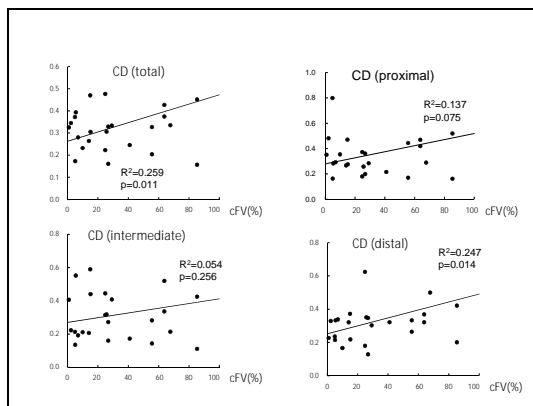
組織血流の評価に関しては前述のように実験計画期間内に nano SPECT/CT 撮影を行うことができなかった。その代替手段として免疫組織学的手法を用いた。12 週間の測定が終了したラットから移植脂肪組織の検体を採取し、血管茎からみて近位, 中間位, 遠位それぞれから組織切片を作成した。脂肪細胞をペリリピンで毛細血管をイソレクテンで染色することにより 1 視野内の脂肪細胞数と毛細血管数を測定し毛細血管密度を算出した。この毛細血管密度と移植脂肪組織の体積変化率の相関を検討した。この実験に必要な器具や試薬は当研究室にすでに備えられていたものを使用した。

#### 4. 研究成果

実験の結果、移植された脂肪組織は術後 6 ~ 10 週の経過で体積が減少しその後はほぼ一定かやや増加することが分かった。コントロール群の術後 12 週の体積変化は平均 34.7%、ストレス群の体積変化は 13.2%であり、血管にストレスを与えた方が体積減少が大きかった。同一個体でのストレス群/コントロール群の測定値をみると、虚血群では  $70.2 \pm 77.9\%$  であるのに対して、鬱血群では  $37.7 \pm 22.2\%$  であった。体積変化の平均値には有意差がみられなかったが ( $p=0.328$ )、ばらつきには有意差がみられた ( $p=0.030$ )。



脂肪組織中の毛細血管密度の検討では、1 視野あたりの脂肪細胞数や毛細血管数が体積変化率と相関を示さなかったのに対して ( $p=0.323, 0.129$ )、毛細血管密度は体積変化率と有意な相関を示した ( $p=0.011$ )。脂肪組織の部位別にみると、近位や中間位では相関を示さなかったが、遠位での毛細血管密度と体積変化率は相関関係を示した ( $p=0.014$ )。同一個体での脂肪体積と毛細血管密度のストレス群/コントロール群の測定値を比較すると、この両者にも有意な相関がみられた ( $p=0.002$ )。



血流のある脂肪移植でも体積の減少がみられるが、移植の過程で血管に虚血や鬱血などのストレスが加わった方が体積減少率が大きかった。ストレス別にみると虚血と鬱血では全体の体積変化の傾向に変わりはなかったが、減少率のばらつきは虚血群で有意に大きかった。虚血群/コントロール群の値は 7 ~ 202%と非常にばらつき、虚血群が増加している個体もあった。また移植脂肪の体積変化と毛細血管密度には相関があった。特に移植脂肪組織の血管茎より遠位での毛細血管密度との間に強い相関がみられた。

以上をまとめると、脂肪移植の際に栄養血管に鬱血が加わると体積はコンスタントに減少するが、虚血が加わると体積が保たれたり減少したりと様々である。その減少率の要因は末梢での毛細血管密度の減少であると考えられる。

人体における実際の移植手術では手術中に移植組織に加わるストレスは虚血であることが多い。今回の実験結果から、栄養血管より末梢の毛細血管の減少を防ぐような工夫を行うことにより移植組織の体積の減少率を下げる可能性があることが示唆された。

これらの研究成果は、英文論文 (Volumetric changes in transplanted vascularized fat flaps after ischemic or congestive stresses and their relationship to capillary density : the usefulness of a new Zucker fatty rat model) としてまとめ現在学術雑誌へ投稿中である。また 2015 年 10 月に開催される第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会において、血管ストレス負荷後の移植脂肪組織の体積変化および毛細血管密度との関連性 (田中顕太郎、岡崎 睦、森 弘樹) というタイトルで研究成果を報告する予定である。

今後は、今回の研究期間には行うことができなかった放射線照射を負荷させた実験、あるいは今回臨床応用できるのではないかと期待された血管内操作などを条件に加えた実験などを継続的に行っていきたいと考えている。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

田中顕太郎, 岡崎 睦. Microfocus X線CT装置を用いたラット移植脂肪組織の画像評価. 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

田中顕太郎, 岡崎 睦. Microfocus X線CT装置を用いたラット移植筋組織の画像評価 ~第一報~. 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 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:  
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

岡崎 睦 (OKAZAKI, Mutsumi)

東京医科歯科大学医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 50311618

(2) 研究分担者

森 弘樹 (MORI, Hiroki)

東京医科歯科大学医歯学総合研究科・講師  
研究者番号: 80345305

(3) 研究者

田中 顕太郎 (TANAKA, Kentaro)

東京医科歯科大学医学部附属病院・医員  
研究者番号: 20569503