

# ラット自己遊離脂肪移植における血管新生およびアポトーシスの生着機構おける役割について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9413">http://hdl.handle.net/2297/9413</a>

## ラット自己遊離脂肪移植における血管新生およびアポトーシスの 生着機構における役割について

金沢大学医学部医学科耳鼻咽喉科学講座(主任:古川 亙教授)

高 柳 春 実

近年、耳鼻咽喉科領域で反回神経麻痺での喉頭の注入材料として、また整容的手術の補充充填材料として自己脂肪の移植が注目されている。しかし移植後の脂肪組織の長期経過については症例数が少なく生着の機構や移植後の吸収については不明な点が多い。今回自己遊離脂肪組織移植の生着機構の解明のため、ラットを用いたモデルを作成し以下の検討を行った。ラット鼠径部の自己脂肪組織を採取し背部皮下に移植する群と大腿部筋肉内に移植する群を作り、それぞれ一塊に移植する方法、細切して注射針で注入する方法で移植を行った。移植片の重量、組織学的変化、免疫組織学的に血管新生や脂肪細胞の状態について検討した。背部皮下移植群では移植片の重量と日数の経過の間には逆相関が認められ、脂肪を一塊にして移植した群は細切して移植した群と比較して有意に重量が保存されていた。組織学的検討では、いずれの群でも移植片の顕微鏡下の代表的視野における全体に対する脂肪組織の比率と日数の間には逆相関の関係が認められ、逆に結合組織の比率と日数の間には順相関の関係が認められた。移植片の生着に関与する因子として血管新生に着目し抗 von Willebrand 因子抗体により染色された微小血管と血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) との関連について免疫組織学的検索を行った。VEGF 陽性細胞は1週間後に移植脂肪組織周囲の結合組織に発現したが次第に減少し3ヶ月以後は認められなくなった。移植部位の比較では筋肉内移植群で VEGF 陽性細胞数が有意に高値を示した。微小血管数は1週間後までに著明に増加したがその後増加は認められなかった。移植片に対し TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検索を行った結果、脂肪細胞のアポトーシスは移植1週間後から3ヶ月後まで認められた。本検討により脂肪組織生着機構として微小血管の増生があることが明らかになったが、生着後もアポトーシスが持続することが術後の移植脂肪の減少の一因であることが判明した。今後の臨床応用に当たっては脂肪細胞の生着を向上させアポトーシスの誘導をくい止める方策が必要であると考えられた。

**Key words** autologous fat transplantation, graft survival, angiogenesis, vascular endothelial growth factor, apoptosis

近年、声帯機能不全に対する声帯内充填術の注入材料<sup>1) 6)</sup>として、また顔面や頸部の陥凹部を充填する方法<sup>7)</sup>として整容的な面からも自己脂肪組織は耳鼻咽喉科領域で注目されている。従来の注入材料であるアテロコラーゲンでは注入後短期間のうちに吸収され、テフロンでは異物性の肉芽腫を生ずるが、自己脂肪組織は採取も容易で、移植後の拒絶反応も少ないことから理想的な注入材料であると考えられる<sup>1) 7)</sup>。しかし移植後の脂肪組織の吸収は約50~70%程度<sup>1) 10)</sup>と移植条件により差があるうに、移植法自体の同一条件下での基礎的な比較研究は少なく移植片の重量、体積の変化については予想し難い。またその生着機構や長期間に起こる変化については不明である。

移植片の体積や重量を保持するためには、脂肪組織の生着が必要であり、これには血管新生による血行再開が関与すると考えられる。一方、脂肪組織の減少を防ぐことも臨床効果の持

続の観点から重要であると考えられる。移植片が生着しない場合は脂肪細胞の壊死が生じるため脂肪組織が減少すると考えられるが、生着後も徐々に移植片の重量や体積が減少する場合は多くあり<sup>1) 10)</sup>、これには壊死以外の要因が関与していると推測される。

本研究では異なる条件下で移植した自己脂肪組織の重量、脂肪組織や結合組織の状況について経時的に観察し比較した。また血管新生を誘導する因子の一つである血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) と微小血管新生との関連について検索し、移植片の生着とその関連について検討を試みた。さらに脂肪組織が減少する原因を追求するため、壊死以外に起こりうる現象として脂肪細胞のアポトーシスに着目した。これらの結果を踏まえて、これまで未解明であった遊離脂肪組織の生着機構について考察を加えたい。

平成10年12月28日受付、平成11年2月24日受理

Abbreviations: AMeX, acetone methyl-benzoate xylene; bFGF, basic fibroblast growth factor; DAB, diaminobenzidine; NO, nitrogen oxide; PBS, phosphate-buffered saline; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine-5'-triphosphate-biotin nick end-labeling; VEGF, vascular endothelial growth factor; vWF, von Willebrand factor

## 対象および方法

## I. 実験動物および移植モデルの作成

## 1. 実験動物

実験には体重200g前後、6~8週齢、ウイスター系雄性ラット(日本チャールズリバー、横浜)を使用した。動物の取り扱いには金沢大学動物実験施設の指針に従った。

## 2. 移植モデルの作成

移植モデルの作成はペントバルビタール(ネンブタール®, ダイナポット、大阪)50mg/kgの腹腔内投与による麻酔下に行った。移植する脂肪組織は鼠径部より採取した。

## 1) 皮下移植群

頭頸部外科領域での整容的な移植のモデルとして、一塊にして採取した脂肪組織約300mgをそのまま一塊として背部皮下に移植する群と、ハサミで細切して18G注射針を容易に通過する大きさとして背部皮下に注入移植する群に分けた。各群5匹ずつ実験モデルを作成した。

## 2) 筋肉内移植群

反回神経麻痺における声帯筋内注入のモデルとして同様に採取した脂肪組織約200mgを右大腿筋内に一塊にして移植する群とハサミで細切し18G注射針で注入する群に分けた。各群3匹ずつ実験モデルを作成した。

## 3. 切片の作成

それぞれの群のラットに対し、術後2日後、1週間後、1ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後にペントバルビタールを腹腔内投与(200mg/kg)し屠殺した後、移植片を採取した。対照脂肪組織として対側の鼠径部の脂肪を採取した。

移植後の組織学的変化を検討するため、皮下移植群からは移植片のみと、周辺の結合組織の変化を観察するため移植片とその周辺の筋・結合組織を採取した。筋肉内移植群は移植片と移植部付近の筋を切除した。

採取した移植片はアセトン・安息香酸メチル・キシレン(acetone methyl-benzoate xylene, AMeX)固定法<sup>11)</sup>により固定後パラフィン包埋し、それぞれから厚さ4 $\mu$ mの切片を作成した。

## II. 移植片重量の検討

皮下移植群の移植片のみ採取したものについては、AMeX固定前に、総重量と脂肪組織、結合組織それぞれの重量を精密電子上皿天秤(島津製作所、京都)にて計測した。筋肉内移植群については結合組織が増生し筋肉と脂肪の分離が困難で脂肪組織のみ取り出すことが著しく困難であったので重量の測定は行わなかった。

## III. 組織学的検討

皮下移植群の移植片のみ採取したものの切片と筋肉内移植群の切片を使用した。

## 1. HE染色

パラフィン切片を脱パラフィン、親水化し、ヘマトキシリン液にて約10分染色した後、エオジン液で1~3分染色し、脱水、透徹、封入し光学顕微鏡下の観察に用いた。

## 2. エラスチカ・ワンギーソン染色

パラフィン切片を脱パラフィン、親水化し、1%塩酸加70%アルコールで切片を親和させた後、ワイゲルトレゾルシンフクシン液(武藤化学、東京)で5~8時間染色した。水洗後1%塩酸加70%アルコール液で分別し、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液(武藤化学)で5~10分染色した。水洗後0.5%塩酸水で分

別し水洗、色出しを行った。その後ワンギーソン液(武藤化学)で30秒~1分染色し、脱水、透徹、封入し光学顕微鏡下の観察に用いた。

## 3. 画像解析

HE染色とエラスチカ・ワンギーソン染色の標本について経時的な変化を観察し、光学顕微鏡で400倍の視野下に代表的と思われる3カ所を選び写真撮影したものを、パーソナルコンピュータに取り込み画像解析用のソフトNIH Image(National Institutes of Health, Bethesda, MD)を用い、脂肪組織および結合組織それぞれの面積を測定し、全体の面積に対する比を求めた(図1)。なおこの解析では脂肪組織は壊死に陥っていない正常な形態を保っている視野を選んで行った。

## IV. 免疫組織染色による検索

皮下移植群の切片(移植片とその周辺の筋を採取)と筋肉内移植群の切片を型の如く脱水、親水化した後、以下の免疫組織学的検索<sup>12)13)</sup>に用いた。

## 1. 抗ラット血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体

20%硫酸亜鉛溶液にて500W、5分間2回のマイクロウェーブ処理を行い抗原性の賦活化を行った後、20分間室温にて0.3%過酸化水素水加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを阻害した。リン酸緩衝食塩水(phosphate-buffered saline, PBS)(pH7.4)で洗浄後ウマ正常血清を用いブロッキングを行い抗ラットVEGF抗体(100倍希釈, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)を4℃で1晩反応させた。続いてPBSにて3分間3回洗浄後、ビオチン化ウマ抗マウスIgG抗体(200倍希釈, Vector Laboratories, Burlingame, CA)を用い室温で30分間反応させた。

## 2. 抗von Willebrand 因子(von Willebrand factor, vWF)抗体

3%過酸化水素水にて5分間内因性ペルオキシダーゼを阻害し、PBSで5分間洗浄後、37℃で0.1%トリプシン(和光純薬、東京)にて蛋白分解処理し、抗原性の賦活化を行った。PBSで洗浄後ヤギ正常血清を用いてブロッキングを行い抗vWF抗体(200倍希釈, ダコジャパン、京都)を室温で2時間反応させた。続いてPBSにて3分間洗浄後、ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体(200倍希釈, Vector Laboratories)を用い室温で30分間反応

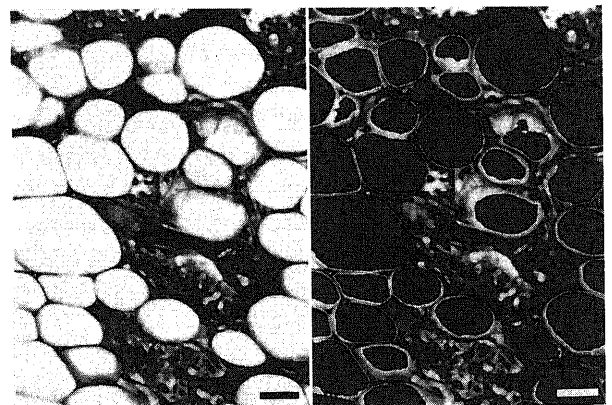


Fig. 1. Computer assisted histological analysis. Left side, histological pictures of the fat graft (HE stain). Right side, Fat cells are recognized and selected (black area). Then the ratio of area of fat cells to that of one visual field was calculated. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

させた。

1)2)ともPBSにて3分間3回洗浄後ビオチン-ストレプト アビジン パーオキシダーゼ複合体 (biotin-strept avidin peroxidase complex) (strept ABC Complex) (ダコジャパン) と室温で30分間反応させた後PBSで洗浄した。この後0.0006% 過酸化水素加0.05%ジアミノベンチジン (diaminobenzidine, DAB) (同仁化学研究所, 熊本) 溶液にて3~5分発色させた。核染色はヘマトキシリンで行い, 常法にしたがい脱水, 透徹, 封入し光学顕微鏡下の観察に用いた。

陽性対照組織として抗ラット VEGF 抗体にはヒト皮膚, 抗 vWF 抗体にはヒト口蓋扁桃組織を用いた。陰性対照としては各切片群においてPBSを一次抗体として用いた染色を行い, 非特異的な染色がないことを確認した。

抗 VEGF 抗体染色については一つの切片について免疫反応陽性の細胞が最も多いと思われる3カ所について, 光学顕微鏡で200倍の視野下に免疫反応陽性細胞の数を計測した。

血管数の計測には200倍の視野下に抗vWF抗体で標識された血管が最も多いと思われる部位で脂肪組織と結合組織が1:1となるように視野を設定し, 一視野内の血管の数を計測した。形態上血管が分岐しているものについても単一の血管として計測した。

#### V. 組織切片を用いたアポトーシスの検出

皮下移植群の切片と筋肉内移植群の切片に対し, ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 加ビオチン-デオキシウリジン-5'-3'リン酸 (deoxyuridine-5'-triphosphate, dUTP) ニック末端標識 (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling, TUNEL) 法にてアポトーシス細胞の検索を行った<sup>14)</sup>。アポトーシス細胞の検出にはアポトーシス検出システム (Apop Tag®, Oncor, Gaithersburg, MD) を使用した。

パラフィン切片を常法にしたがって脱パラフィン, 親水化した後20 µg/ml プロテアーゼK (Sigma, St. Louis, USA) にて処理後, 3% 過酸化水素水加PBSで5分間内因性ペルオキシダーゼを阻害した。PBSにて洗浄後TdT緩衝液 (100mM カコジル酸カリウム, 2mM 塩化コバルト, 0.2mM ジチオスライトール, pH7.2) を加え約10秒間反応させ, TdT反応液を滴下し, 各切片にカバーガラスをかけ37℃の加湿器で60分間反応させた。次に緩衝液 (0.3M NaCl, 30mM クエン酸ナトリウム) 内に室温で約10分間浸し, TdT反応を停止した。PBSにて洗浄後ペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体と室温で30分間反応させた。PBSで洗浄後3'-DABで約5分発色し, メチルグリーンで核染色を行い, 常法にしたがって脱水, 透徹, 封入し, 光学顕微鏡下の観察に用いた。

#### VI. 統計学的処理

重量, 脂肪組織および結合組織の面積比, 抗ラット VEGF 抗体陽性細胞数, 微小血管数のそれぞれを平均値±標準偏差をもって表した。各群間の比較はMann-WhitneyのU検定を用いて危険率5%未満 ( $P < 0.05$ ) を有意差ありとして判定した。また相関分析にはPearsonの相関係数を用いた。

### 成 績

#### I. 皮下移植群の重量

移植片の総重量は, 一塊にして移植した場合2日後および1週間後に結合組織の増生により若干増加したが, 1ヶ月後から

は減少し, 6ヶ月後には移植前の重量の  $16.67 \pm 3.34\%$  となり, 重量と移植後の日数との間には強い逆相関の関係が認められた (図2) (相関係数  $R = -0.878$ ,  $p < 0.0001$ )。細切して移植した場合も同様な傾向が認められ, 6ヶ月後には移植前の重量の  $31.89 \pm 12.17\%$  となり, 強い逆相関の関係が認められた (図2) ( $R = -0.787$ ,  $p < 0.0001$ )。皮下移植群の移植片の総重量は一塊にして移植した場合と細切して移植した場合を比較すると細切して移植した方が有意に重量が減少していた (図3) ( $P < 0.05$ )。

#### II. 組織学的検討

##### 1. HE染色

皮下移植群, 筋肉内移植群とも2日後から脂肪細胞の浮腫, 炎症細胞の増加, 1週間後から組織球, リンパ球, 線維芽細胞の増加が認められるようになった。1ヶ月後より壊死に陥った

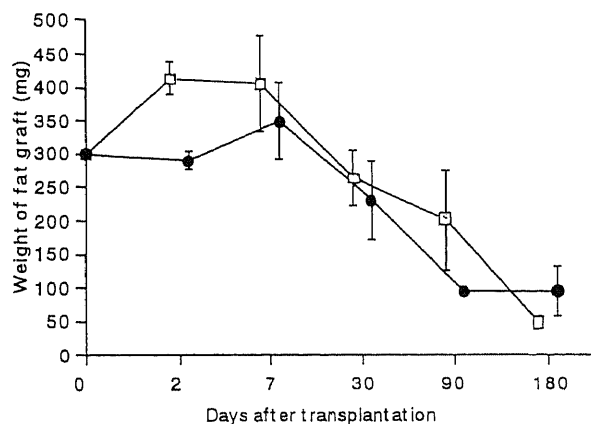


Fig. 2. The changes in the weight of fat graft. Each point indicates  $\bar{x} \pm SD$ . En bloc group (□) and minced group (●) are indicated. In both groups, the weight increased more or less during the first 7 days, and then decreased gradually. The weight of fat grafts correlated negatively with days after transplantation. En bloc group,  $R = -0.878$ ,  $p < 0.0001$ . Minced group,  $R = -0.787$ ,  $p < 0.0001$  ( $R$ , correlation coefficient).

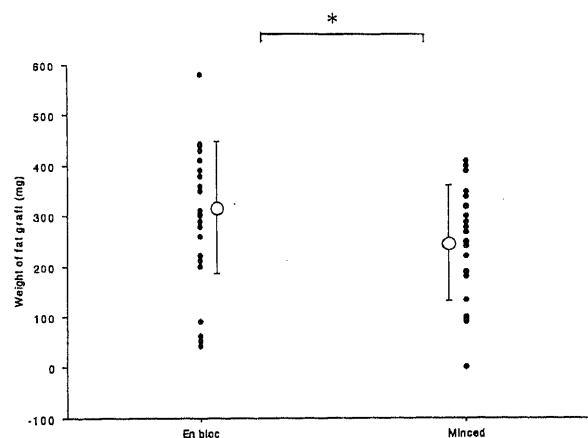


Fig. 3. The weight of en bloc fat grafts and injected fat grafts retrieved over a time range of 2 to 180 days. Statistically significant correlation was observed between the groups by Mann Whitney U test. \* $p < 0.05$ .

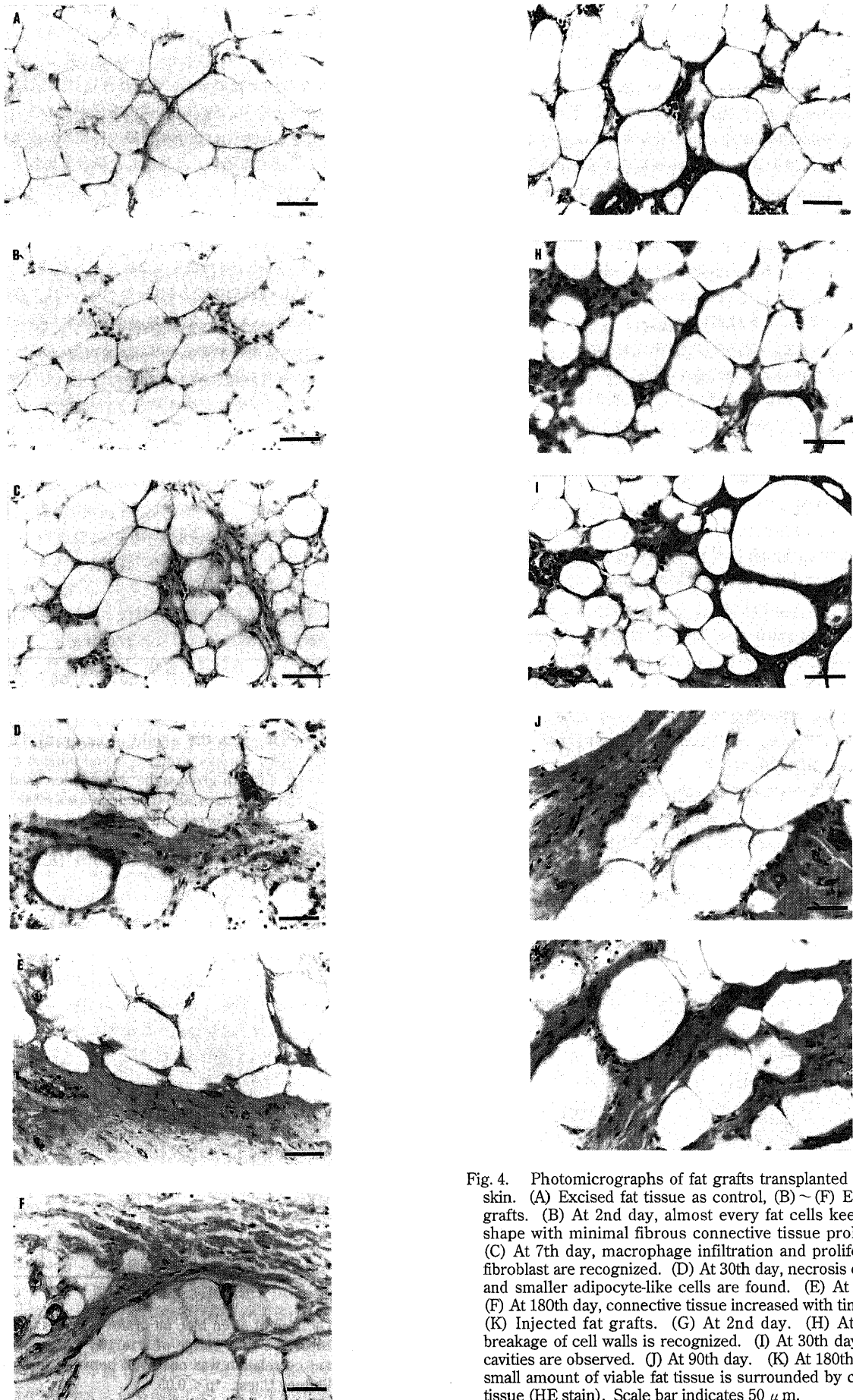


Fig. 4. Photomicrographs of fat grafts transplanted into back skin. (A) Excised fat tissue as control, (B) ~ (F) En bloc fat grafts. (B) At 2nd day, almost every fat cells keep normal shape with minimal fibrous connective tissue proliferation. (C) At 7th day, macrophage infiltration and proliferation of fibroblast are recognized. (D) At 30th day, necrosis of fat cells and smaller adipocyte-like cells are found. (E) At 90th day. (F) At 180th day, connective tissue increased with time. (G) ~ (K) Injected fat grafts. (G) At 2nd day. (H) At 7th day, breakage of cell walls is recognized. (I) At 30th day, cystlike cavities are observed. (J) At 90th day. (K) At 180th day, very small amount of viable fat tissue is surrounded by connective tissue (HE stain). Scale bar indicates 50  $\mu$  m.

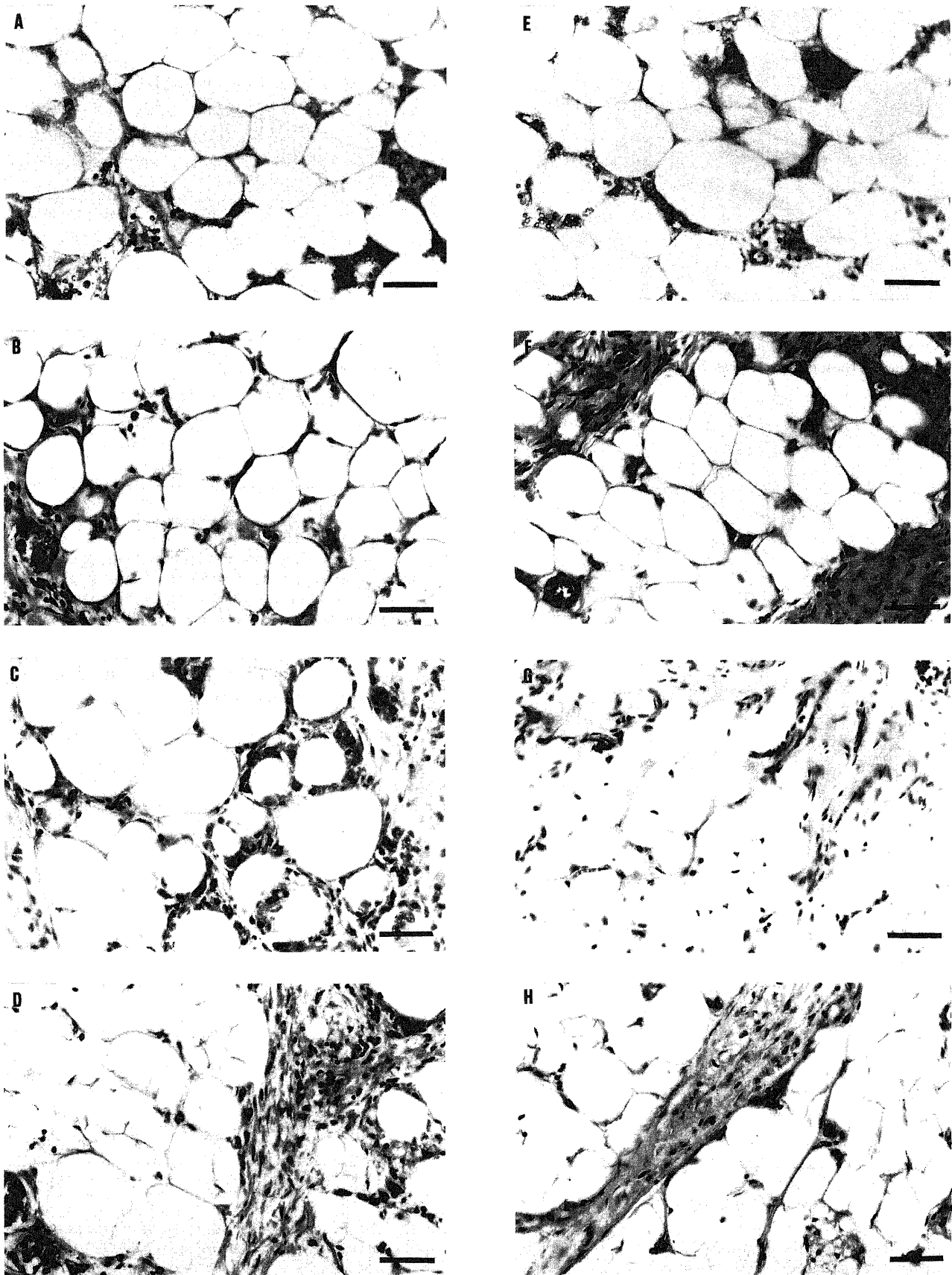


Fig. 5. Photomicrographs of fat grafts placed in the muscle. (A)~(D) En bloc fat grafts. (A) At 2nd day. (B) At 7th day. (C) At 30th day, cystlike cavities surrounded by inflammatory cells are frequently seen. (D) At 90th day, severe cell wall disruption is observed. (E)~(H) Injected fat grafts. (E) At 2nd day. (F) At 7th day, a mild surrounding inflammation is observed. (G) At 30th day. (H) At 90th day, massive fibrosis is observed (HE stain). Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

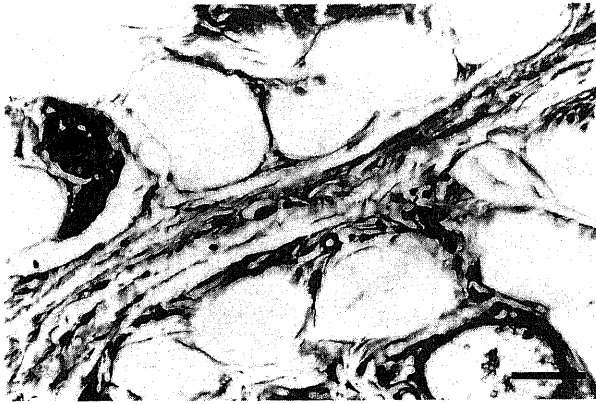


Fig. 6. Fibroblastic responses in the graft after 90 days. Growing intracellular fibroblast and collagen are observed (Elastic van Gieson's stain). Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

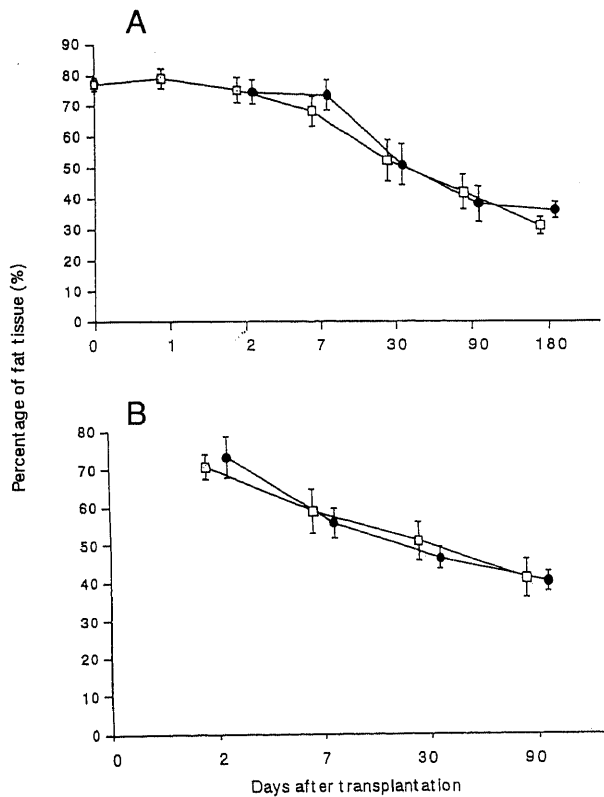


Fig. 7. The ratio of the area of fat cells to one visual field by computer assisted histological analysis in graft. (A) Back skin, (B) In muscle (HE stain). Each point indicates  $\bar{x} \pm SD$ . En bloc group ( $\square$ ) and minced group ( $\bullet$ ) are indicated. In both (A) and (B) the percentage of fat tissue correlated negatively with the days after transplantation. (A)  $R = -0.837$ ,  $p < 0.0001$ . (B)  $R = -0.790$ ,  $p < 0.0001$  (R, correlation coefficient).

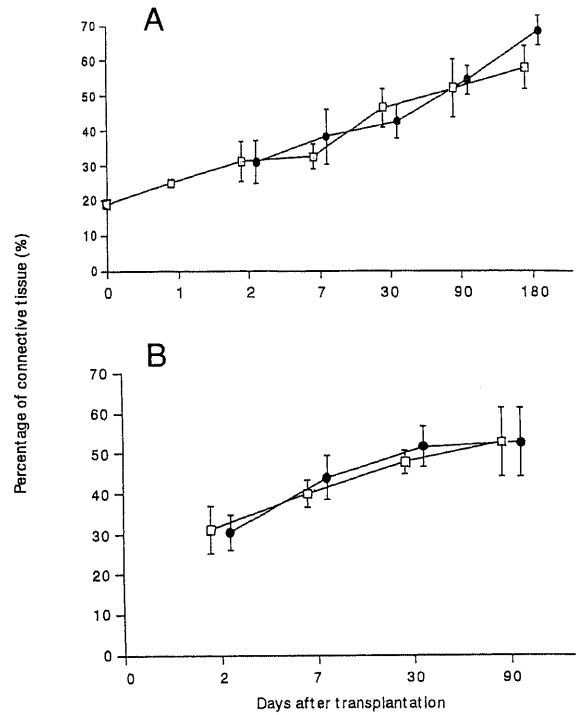


Fig. 8. The ratio of the area of connective tissue to one visual field by computer assisted histological analysis in graft. (A) Back skin, (B) In muscle (Elastic van Gieson's stain). Each point indicates  $\bar{x} \pm SD$ . En bloc group ( $\square$ ) and minced group ( $\bullet$ ) are indicated. In both (A) and (B) the percentage of connective tissue correlated positively with the days after transplantation. (A)  $R = 0.825$ ,  $p < 0.0001$ . (B)  $R = 0.752$ ,  $p < 0.0001$  (R, correlation coefficient).

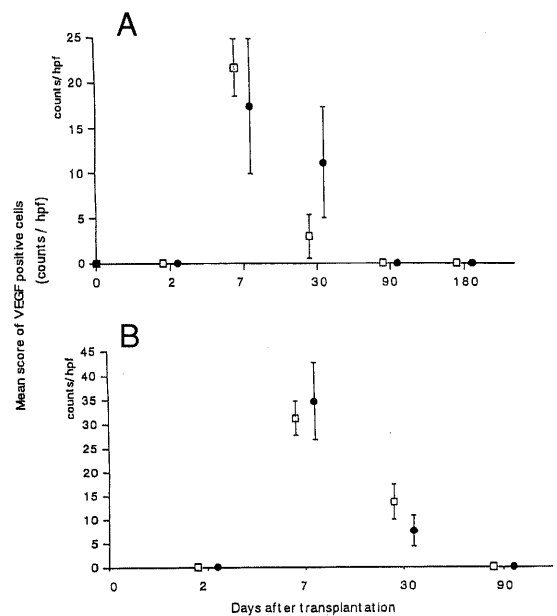


Fig. 10. The number of VEGF positive cells in high power field under microscope in fat graft (A) Back skin, (B) In muscle. Each point indicates  $\bar{x} \pm SD$ . En bloc group ( $\square$ ) and minced group ( $\bullet$ ) are indicated. The expression of VEGF appeared on 7th day after transplantation and then decreased. In (B) group, the expression of VEGF correlated negatively with the days after transplantation.  $R = -0.430$ ,  $p < 0.0001$  (R, correlation coefficient).

脂肪細胞が融合して形成された脂肪滴が認められるようになり、この傾向は細切して脂肪を移植した場合に著明に認められた。また同時に既存の脂肪細胞より小型で新しく生成したと思われる脂肪細胞も認められたが3ヶ月後、6ヶ月後にはこのような細胞は認めず、壊死と線維化が主であった。皮下移植群は筋肉内移植群に比べ脂肪細胞の形態が保存されており、また一塊にして移植した群は細切した群より正常脂肪細胞がより多く残存していた(図4, 5)。

## 2. エラスチカ・ワンギーソン染色

結合組織は膠原線維の増加が主であった。移植2日後より移植片周囲や脂肪組織内に膠原線維の増生が認められるようになり、日数とともに増加が認められた。また弾性線維は既存の血管周囲や膠原線維の集積した部位に存在していたが、新生血管周囲には認めず、明らかな増加は認められなかった(図6)。

## 3. 画像解析

### 1) 脂肪組織

皮下移植群では脂肪組織の比率が日数とともに減少し両者の間に強い逆相関の関係が認められた ( $R = -0.837, p < 0.0001$ )

(図7A)。筋肉内移植群でも同様に強い逆相関の関係を認めた ( $R = -0.790, p < 0.0001$ ) (図7B)。また脂肪組織の比率と移植部位(皮下・筋肉内)、移植前の脂肪の状態(一塊・細切)の間にはいずれも有意差は認めなかった。

### 2) 結合組織

皮下移植群では結合組織の比率は日数とともに増加し強い順相関の関係が認められ ( $R = 0.825, p < 0.0001$ ) (図8A)、筋肉内移植群でも同様の関係が認められた ( $R = 0.752, p < 0.0001$ ) (図8B)。結合組織の比率と移植部位、および移植前の脂肪の状態の間にはいずれも有意差は認めなかった。

## Ⅲ. 免疫組織化学的検討

### 1. 抗ラットVEGF抗体

皮下移植群、および筋肉内移植群ともに移植1週間後に周囲の結合組織にVEGF陽性細胞が発現した(図9)。陽性細胞は1週間後に最も多く出現した後減少し、3ヶ月以降ではほとんど認められなくなった(図10A, B)。VEGF陽性細胞と移植後の日数との間には弱い逆相関が認められた ( $R = -0.43, p < 0.0001$ )。また筋肉内移植群のほうが皮下移植群に比べVEGF陽性細胞数が有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ) (図11)。VEGFと脂肪の状態との間には有意差は認められなかった。

### 2. 抗vWF抗体

抗vWF抗体により血管内皮細胞が特異的に染色された(図12)。対照組織に比して新生微小血管は1週間後までに著明に増加したが、それ以降は血管数の増加は認めなかった(図13A, B)。微小血管数と1週間目以降の日数との間に相関は認められなかった。また微小血管数と移植部位、および脂肪の状態との間にもいずれも相関を認めなかった。

### Ⅳ. アポトーシスの検出

皮下移植群では移植1週間、および1ヶ月後に脂肪細胞の核がTUNEL法で染色されたが3ヶ月後は陽性細胞は認められなかった。筋肉内移植群では移植1週間後と1ヶ月後に脂肪細胞が染色され、3ヶ月後では陽性細胞は細切して移植した群にのみ認められた(図14)。また対照群では陽性細胞は認められなかった。

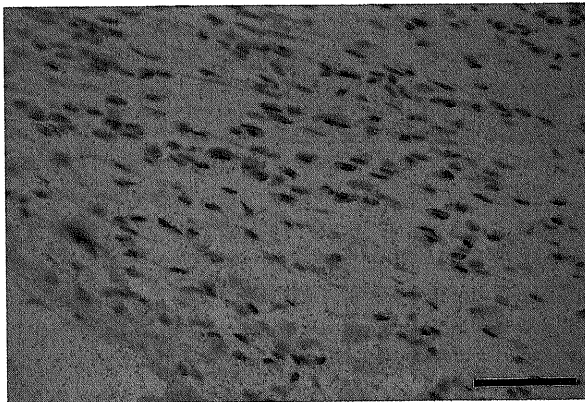


Fig. 9. Immunohistochemical staining for VEGF after 7 days. VEGF positive cells are found in connective tissue around fat graft. Scale bar indicates 50  $\mu$  m.

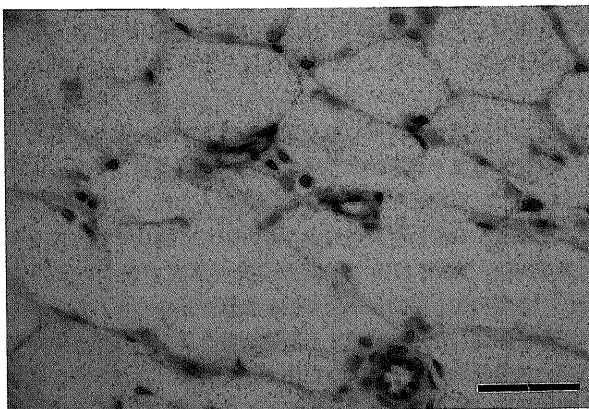


Fig. 12. Immunohistochemical staining for von Willebrand factor 7 days after the transplantation. Microvessels are represented by clusters, which stand out sharply from other tissues. Scale bar indicates 50  $\mu$  m.

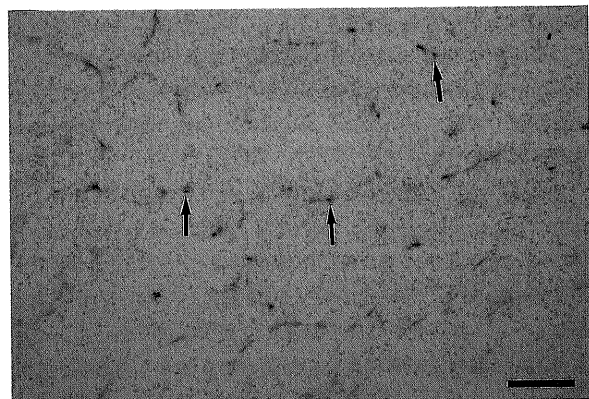


Fig. 14. Detection of apoptosis in the fat graft. Apoptotic cells are stained by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) method. Positive signals are detected in the nuclei of fat cells. Scale bar indicates 50  $\mu$  m.



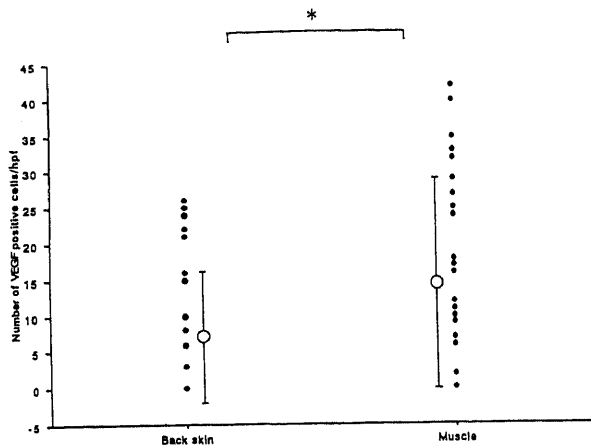


Fig. 11. Expression of VEGF in fat grafts of the back skin (retrieved in the range of 2 to 180 days) and of the muscle (retrieved in the range of 2 to 90 days). The expression of VEGF was significantly high in the graft in muscle than that of back skin. Statistically significant correlation was observed between the groups by Mann Whitney U test. \* $p < 0.05$ .

### 考 察

近年、耳鼻咽喉科領域で声帯内や顔面、頸部への自己脂肪移植が注目されている。自己脂肪組織は入手しやすく、異物反応や早期の吸収も少なく理想的な注入材料である。しかし長期経過例の報告が少なく移植片の生着については不明な点が多く、その生着機構の解明のため本研究を行った。

本研究での脂肪組織とは白色脂肪組織を指すが、これは複数の細胞から構成されている。それらの細胞には、脂肪細胞、前駆脂肪細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、神経細胞が含まれる。成熟脂肪細胞は脂肪滴を貯蔵しており、ヒトでは以前は乳幼児期や思春期など限られた時期にしか増加せず、生涯でその数は決定されると考えられていた。しかし近年の研究により脂肪細胞は成人後も増加することが明らかにされた<sup>15-17</sup>。脂肪細胞は結合組織の細胞群に属し間葉系幹細胞から分化すると考えられており、この分化系列には線維芽細胞、軟骨細胞、骨細胞、平滑筋細胞などの細胞が含まれている。脂肪細胞の発生源としては線維芽細胞説、血管周囲の原基説、骨髄系細胞説があるが、前駆脂肪細胞の段階では線維芽細胞様の形態を示し、分化に伴い脂肪滴の蓄積を認めるようになることから、線維芽細胞由来説が最も有力である<sup>15</sup>。

移植後の脂肪組織の重量の変化は、皮下に移植した場合、本研究では1ヶ月後で一塊の場合91%、細切の場合77%、6ヶ月後には一塊の場合17%、細切の場合32%となった。1ヶ月で元の重量の約90%、6~12ヶ月で50%前後となったとする報告がある<sup>9-10</sup>。本研究では先の報告より減少率が高かった。この原因として移植法や移植部位の相違が第一に考えられる。また成長因子を投与した報告<sup>8</sup>もあり種々の条件が異なったためと推測される。

移植脂肪への塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 投与の有無で比較した場合、bFGF投与により線維化が促進され移植片の形態や重量が保存されることよ

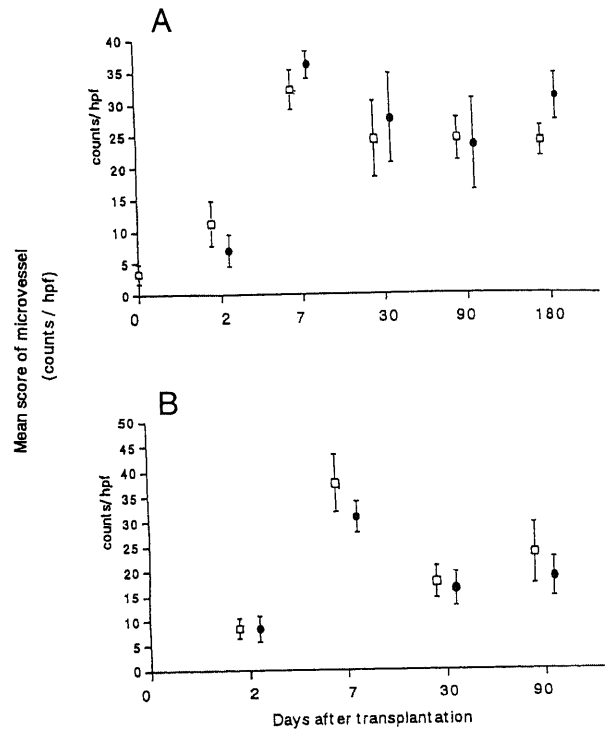


Fig. 13. The number of microvessels in high power field under microscope in fat graft. (A) Back skin, (B) In muscle. Each point indicates  $\bar{x} \pm SD$ . En bloc group (□) and minced group (●) are indicated. The number of microvessels was markedly increased on 7th day after transplantation.

り、bFGFは移植に有用であることの報告<sup>8,9,10</sup>がある。bFGFは中胚葉、および神経外胚葉由来の細胞の分裂促進作用があり、線維化促進作用と血管新生能を持っている<sup>18,19</sup>。また前駆脂肪細胞の分裂を促進する可能性があることも示唆されている。したがってbFGFは脂肪細胞の生着、重量の維持に有利に働く可能性が示唆される。

移植法による脂肪組織の状態に関しては、ヒトでは4~6mm大の粒子状で頬部に移植し2年後も約50%生着していたという報告がある<sup>7</sup>。声帯内注入例では、イヌ声帯筋内に細切した脂肪と遠心分離した脂肪を比較し、3ヶ月後の移植片の体積は細切した群では約20%、遠心分離した群では約10%になるという報告がある<sup>11</sup>。今回、細切して移植した群の方が一塊にして移植した群に比べ有意に重量が減少したが、これは脂肪組織の粉碎により脂肪細胞の細胞壁や間質の結合組織、血管が破壊され移植片が吸収される傾向が強くなったためと推測される。今回の実験では脂肪採取時の操作は切除のみで行ったが、臨床例では陰圧による吸引で行われることが多く、陰圧を弱くする方が脂肪細胞の形態が保たれ脂肪細胞の障害が少ないとされる<sup>7-10</sup>。移植する脂肪は脂肪細胞の破壊が少ないほど生着率が高いと予想されるが、移植する脂肪の量や部位を調節しやすいこと、注射針を使用する方が術創が小さいことなどより注射針を通る程度に細切する方法が臨床的には実際的であると考えられる。移植操作を容易にすることにより脂肪細胞の障害は避けられず、ここに脂肪移植の困難さが挙げられる。

反回神経麻痺声帯への脂肪組織移植はヒトでは脂肪組織を細

切して注射針で注入するが、大部分で術後発声時の声門閉鎖不全を補助してかなりの発声機能改善を認める。経過については1年以上改善状態を保つ例もあるが、一般には3ヶ月以降は移植片の吸収、筋の壊死などにより脂肪組織が減少し、徐々に機能低下が起こる傾向があるとされている<sup>20-21</sup>。しかし脂肪注入術は簡便な方法であるため、移植片が吸収された場合でも追加注入により機能改善状態を維持することが可能である。

一般に皮膚などの遊離組織の移植片の生着には移植床からの血行が関与していると考えられる<sup>19</sup>。本研究では移植片の血管新生に着目したが、移植脂肪は血行の良好な筋肉内が最も吸収されにくく、生着率が高かった。一方骨・腱・筋膜上では吸収される傾向があり、血行の少ない部位では移植片が壊死に陥りやすい<sup>21,20</sup>。血行の良好な部位の方が血管新生、血行再開しやすいため壊死に陥る組織が少なくなるためと考えられる。

VEGFは血管内皮細胞の増殖に特異的に関与する<sup>19,20</sup>。VEGFは腫瘍細胞、平滑筋細胞、マクロファージ、ケラチノサイトなどで生成、分泌される<sup>121,13,21</sup>。VEGFは腫瘍増殖、炎症、創傷治療過程において発現する<sup>20-23</sup>。VEGFは別名血管透過性因子(vascular permeability factor)とも呼ばれており炎症時には血管透過性を亢進させ血漿滲出を惹起する。また内皮細胞の遊走を促進し、von Willebrand 因子の放出を増加させ血管新生を誘導する<sup>21</sup>。今回の検討では移植2日後まではVEGFの発現は認めなかったが1週間後で最大となり、3ヶ月以降は認めなかった。また組織学的に検討して移植1週間後にマクロファージが出現していることより、VEGFは炎症反応の過程で出現したマクロファージにより分泌されていると推測される。またvWF抗体により染色された微小血管数は移植1週間後で最大となりその後は微小血管の増加、減少は認めなかった。VEGF濃度と血管新生の度合いは比例することが多く<sup>22,23</sup>今回も同様な傾向が認められた。以上より自己脂肪組織は移植後約1週間までにVEGFによる血管新生が起こり移植片が生着することが示唆された。VEGFを変動させる物質や条件として性ホルモン、低酸素、低グルコースなどが報告されている<sup>19-23</sup>。また一酸化窒素(nitrogen oxide, NO)によるVEGFの発現誘導も報告されている<sup>20</sup>。NOは炎症時に好中球やマクロファージにより産生されるため<sup>20</sup>、今回のVEGFの発現にはNOも関与している可能性が示唆される。本実験では筋肉内移植群が皮下移植群に比べVEGFが有意に高値を示した。これは筋肉内移植群では運動が多いため脂肪細胞が移植床に安定して接触しないため、移植1週間後でも壊死に陥った細胞が所々に認められた。そのため筋肉内移植群の方が皮下移植群に比べ、虚血による低酸素状態となりVEGFの発現が強くなったと推測される。

また今回移植片の血管新生後生着してからも脂肪組織の減少を認めることから、壊死以外にアポトーシスも細胞の減少に関与する可能性を考えてTUNEL法を用いた検索を行った<sup>10</sup>。本研究では皮下移植群、筋肉内移植群とも移植後1週間より脂肪組織内にアポトーシス細胞が出現し、1ヶ月ではさらに増加を認めたが、その後は次第に減少した。移植片は約1週間で血管新生が起こり生着したと考えられたが、1ヶ月以降も移植片の重量の減少が続いた。脂肪細胞のアポトーシスはサイトカイン、インスリン、コルチコステロイド、血清除去状態、加熱等で誘導される<sup>20</sup>。また悪性腫瘍による羸瘦は腫瘍が産生する腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ )などのサイトカインにより脂肪細胞のアポトーシスが引き起こされ、脂肪組織が減少するた

め発症すると考えられている<sup>20</sup>。今回の検討では移植後の炎症に伴い白血球が産生したサイトカインにより、移植片の脂肪細胞のアポトーシスが誘導された可能性が示唆される。移植後長期間経過したため移植片の脂肪細胞は壊死に陥ったものが多いと考えられるが、脂肪細胞の消失には移植による炎症反応に起因するアポトーシスも関与していると推測された。

本研究により自己脂肪移植は脂肪細胞の破壊が少ない状態で移植の方が生着率が良好であること、移植後の炎症反応により血管新生が起こり移植片が生着することが明らかになった。移植片の生着後の脂肪組織の減少は脂肪細胞の壊死以外にアポトーシスも関与していると推測された。今後脂肪移植において移植片の生着率を改善させるため、血管新生や脂肪細胞の生存の面なども考慮して成長因子の投与など脂肪細胞を維持する方法を検討すべきであると考えられる。

## 結 論

ラットの自己脂肪組織移植モデルを用いて移植法や移植部位による生着の比較、観察と、血管新生や脂肪細胞の状況についての検討を行い、以下の結果を得た。

1. 移植片の重量と移植後の日数の間には強い逆相関が認められた。脂肪を一塊にして移植した群は細切して移植した群と比較して有意に移植片の重量の減少が少なかった。

2. 組織学的検討により移植片の脂肪組織の比率と日数の間に強い逆相関の関係を認め、結合組織の比率と日数の間には強い順相関の関係を認めた。

3. 免疫組織学的検討により移植1週間後にVEGF陽性細胞が発現し微小血管数も著明に増加した。自己脂肪組織は移植後1週間でVEGFにより血管新生が誘導され移植片が生着することが示唆された。

4. VEGF陽性細胞は移植1週間後に発現し陽性細胞数は最大となるがその後は減少し3ヶ月以降は認められず、VEGF陽性細胞数と日数の間には弱い逆相関が認められた。また筋肉内移植群の方が皮下移植群に比べ陽性細胞数が有意に高値を示した。

5. 移植片に対しTUNEL法によるアポトーシス細胞の検索を行った。脂肪細胞のアポトーシスは皮下移植群・筋肉内移植群とも移植1週間後から認められるようになり、前者は1ヶ月、後者は3ヶ月まで認められた。血管新生による生着後も移植片の脂肪組織の減少が起こるのは脂肪細胞のアポトーシスも一因であると推測された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師古川 仰教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に際し終始、直接御指導を賜りました金沢大学医学部附属病院耳鼻咽喉科学講座西村俊郎講師に心から感謝いたします。さらに、御支援と御協力を頂きました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座の皆様にも厚く御礼申し上げます。

本研究は平成10年度文部省科学研究補助金奨励研究A(10770878)の援助をうけたことを付記する。

## 文 献

- 1) Joseph LM, James AK, Scott EK. Fate of liposuctioned and purified autologous fat injections in the canine vocal fold. *Laryngoscope* 105:17-22, 1995
- 2) Gary YS, Mark AS, Jeff S, Janet W. Autologous fat injection

- into the vocal folds. *Laryngoscope* 107: 177-186, 1997
- 3) Lauren SZ, Michael D, Maisie LS, Dale HR. Autologous fat injection for vocal fold paralysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104: 1-4, 1995
  - 4) Maisie LS, Lauren SZ, Dale HR. Autologous fat injection for unilateral vocal fold paralysis. *Ann Otol Rhino Laryngol* 105: 602-606, 1996
  - 5) Michael SB, David A, Sanford A, Robert B, Charles F, James K, Robert TS, Joseph RS, Peak W. Vocal fold scarring. *Otolaryngol Head Neck Surg* 115: 474-482, 1996
  - 6) Bauer CA, Valentino J, Hoffman HT. Long-term result of vocal cord augmentation with autogenous fat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104: 871-874, 1995
  - 7) Igor N, Oleg S. Long-term results of fat transplantation. *Plast Reconstr Surg* 94: 496-506, 1994
  - 8) Barry LE, Robert VS, Thomas W, Jhon JD. Autologous facial fat transplantation. *J Oral Maxillofac Surg* 90:477-482, 1992
  - 9) Barry LE, Richard AS, James M, A. Michael Sadove. Bioactivation of free-fat transfers. *Plast Reconstr Surg* 90: 1023-1029, 1992
  - 10) Abram N, Krystyna AP, Theresa NB, Cheryl AH, Louis CA. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast Reconstr Surg* 85:378-389,1990
  - 11) Sato Y, Mukai K, Watanabe S, Goto M, Shimosato Y. The AMeX method. *Am J Pathol* 125: 431-435, 1986
  - 12) Tokumo K, Kodama J, Seki N, Nakanishi Y, Miyagi Y, Kamimura S, Yoshonouchi S, Okuda H, Kudo T. Different angiogenic pathways in human cervical cancers. *Gynecol Oncol* 68: 38-44, 1998
  - 13) Toi M, Kondo S, Suzuki H, Yamamoto Y, Inada K, Imazawa T, Taniguchi T, Tominaga T. Quantative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer* 15: 1101-1106, 1996
  - 14) Kojima H, Tanaka Y, Tanaka T, Miyazaki H, Shiwa M, Kamide Y, Morikawa H. Cell proliferation and apoptosis in human middle ear cholesteatoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124: 261-264, 1998
  - 15) Pozanski WJ, Waheed I, Van R. Human fat cell precursors. *Lab Invest* 29: 570-576, 1973
  - 16) Robin LR, Van and Daniel AK. Complete differentiation of adipocyte precursors. *Cell Tissue Res* 195: 317-329, 1978
  - 17) 河田照雄. 脂肪細胞の分化と特異的機能. *最新医* 52: 1078-1086, 1997
  - 18) 吉川秀昭, 川上重彦, 平敷貴也, 塚田貞夫. ヒト線維芽細胞成長因子 (bFGF) による皮弁生着長の延長機序. *日形会誌* 14: 467-472, 1994
  - 19) 脇坂尚宏. 上咽頭癌における Epstein-Barr ウイルス関連因子および血管新生因子の発現に関する研究. *十全医会誌* 106: 105-115, 1997
  - 20) 渋谷正史. VEGFと血管. *実験医* 16: 618-624, 1998
  - 21) Iruela-Arispe ML, Dvorak HF. Angiogenesis. *Thromb Haemost* 78: 672-677, 1997
  - 22) Martin GS, Elazer RE. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activatig factor. *Am J Physiol* 272: 2746-2756, 1997
  - 23) Ian A, Nicola JB, Dean W, Paul RC, Chandon A, Joanne RB, Derek AW. The role of vascular endothelial growth factor in a murine chronic granulomatous tissue air pouch model of angiogenesis. *J Pathol* 180: 90-94, 1996
  - 24) Prince JB, Walker NI, Winterford CM, Cameron DP. Apoptosis of human adipocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 500-507, 1994
  - 25) Prince JB, Walker NI, Winterford CM, Cameron DP. Human adipocyte apoptosis occurs in malignancy. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 625-630, 1994

**The Roles of Angiogenesis and Apoptosis in Graft Survival of Autologous Free Fat Transplantation in Rats**

Harumi Takayanagi, Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - J. J. J. Med Soc., **108**, 213 - 223 (1999)

**Key words** Autologous fat transplantation, graft survival, angiogenesis, vascular endothelial growth factor (VEGF), apoptosis

**Abstract**

Autologous fat transplantation is now considered one of the better methods for augmentation techniques for treatment of paralyzed larynxes and cosmetic deformities. However, long-term graft survival prospects remain unclear. In this study, we evaluated changes in grafted fat tissues and estimated their survival, focusing on angiogenesis and apoptosis. We designed two types of fat graft models in rats. Fat tissues were obtained from the inguinal region and were transplanted by either en bloc placement or by injection of minced fat. Fat grafts were transplanted into either the skin of the back or the muscle of the thigh. The grafts were variously retrieved over a time range of 2 to 180 days. The weight of en bloc fat grafts was significantly heavier than that of injected fat grafts at every point in time. The weight of the fat grafts correlated negatively with number of postoperative days. Histologically, the ratio of area of fat cells to that of the visual field under the microscope also correlated negatively with the number of days after transplantation, while the ratio of area of the connective tissue had a positive correlation with this measure. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and microangiogenesis were investigated immunohistochemically using antibodies to the von Willebrand factor. The expression of VEGF appeared at 7th day, decreased thereafter and disappeared by 90th day. The number of microvessels was markedly increased after 7th day and remained stable. The expression of VEGF was significantly higher in the graft into muscle than in that into the skin of the back. Apoptotic cells were detected using the TUNEL method, and were observed in the fat tissue between 7th day and 90th day. These results suggest that, although VEGF helps to develop the microangiogenesis which is necessary for graft survival, prolonged apoptosis was observed among the grafted fat cells and is supposed to be the major cause of loss of graft volume. Further supportive methods to facilitate angiogenesis and prevent apoptosis would seem to be helpful to clinical application of free fat grafts.