

【2】

氏 名	菅 剛 史
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第798号
学位授与の日付	令和3年10月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (形成再建外科学)
学位論文題目	Heparin administration expands flap survival area possibly by increasing the concentration of hepatocyte growth factor (ヘパリン投与は肝細胞増殖因子を増強し、皮弁生着面積を拡大する可能性がある)
論文審査委員	(主査) 教授 種 市 洋 (副査) 教授 井 川 健 教授 美津島 隆

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

皮弁移植術における皮弁の生着成績を向上させるため、これまでに多くの試みがなされてきた。近年、肝細胞増殖因子（Hepatocyte growth factor：HGF）が、強い血管新生作用を有していることが分かり、各分野でその研究が進められている。そのなかで、ヘパリンを急速投与することで血中HGF濃度が上昇し、虚血部での血管新生が促進されるという報告がなされるようになり、末梢性動脈疾患の治療領域ではすでに臨床応用されている。血管新生と関係の深い皮弁移植術においても、ヘパリンの急速投与による血中HGF濃度上昇が、皮弁内と周囲組織からの血管新生を促し、皮弁生着範囲を拡大させることが期待されるが、これまでにそれを裏付ける報告はされていない。

【目 的】

これまでもヘパリン投与による皮弁生着率増大についての報告は多数あるが、これらはヘパリンのもつ抗凝固作用や抗炎症作用に着目したもので、血管新生に着目したものではなかった。今回我々はヘパリン投与が皮弁生着へ与える影響を、血管新生の観点から実験動物を用いて検証した。

【対象と方法】

本実験は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て行った（実験許可番号 第1086号）。実験動物の取り扱いに当たっては、獨協医科大学動物実験規程を遵守した。

8～9週齢の雄のWistar系ラット20匹を使用し、ランダムにコントロール群（n=10, 335 - 350g）とヘパリン投与群（n=10, 305 - 341g）に10匹ずつ割り当てた。Mc-Farlane背部皮弁モデルを使用

し、ラット背部に肉様層を含めた皮膚全層の3×9cmのランダムパターン皮弁を挙上し、戻して4-0 nylonで縫合閉鎖した。術後、コントロール群には生理食塩水を、ヘパリン投与群には300U/kgのヘパリンを内頸静脈もしくは大腿静脈から急速投与した。手術日から連日投与を行い、術後7日目の皮弁生存面積と血管数を観察し比較した。全ての手術は、イソフルラン吸入による全身麻酔、キシロカイン局注による局所麻酔を併用して行った。計測は皮弁移植術後7日目まで実施した。

皮弁生存面積は、術後7日目にラット背部の撮影を行い、画像解析ソフト（Area Q）を用いて面積を計測、グループ間の平均面積をパーセンテージで比較した。

血管数は、術後7日目写真撮影を行った後に、皮弁基部から3cmの位置で組織片を採取しCD31免疫染色を行い組織学的に評価した。各標本につき、400倍率で10視野をランダムサンプリングし、CD31陽性細胞をカウントした。CD31陽性平均細胞数をグループ間で比較した。血管造影のため、上記20匹の他に、コントロールとヘパリン投与のラットを2匹ずつ作成し、術後7日目に血管造影を行った。

両群間の比較には、Mann-Whitney U検定を用いた。

【結 果】

平均皮弁生存率はコントロール群（n=10）で47.3±5.9%、ヘパリン投与群（n=10）で57.9±5.3%であった。Mann-Whitney U検定において、ヘパリン投与群はコントロール群と比して有意に皮弁生存面積の拡大（P<0.01）を認めた。400倍率10視野あたりのCD31陽性細胞数はコントロール群（n=10）で平均43.7±4.8、ヘパリン投与群（n=10）で60.3±7.3であった。Mann-Whitney U検定において、ヘパリン投与群はコントロール群と比して有意に血管数の増加（P<0.01）を認めた。術後7日目の血管造影では、コントロールと比べて、ヘパリン投与を行ったラットの皮弁辺縁で血管増生が盛んになっており、縫着部では新たに構築された血管網が観察された。

【考 察】

HGFは肝臓や肺、傷害臓器などの血管平滑筋および血管内皮より産生され、内因性血管壁内HGFとして貯蔵されている。HGFはヘパリンに対して強い親和性を有しており、ヘパリンが投与され血中ヘパリン濃度が上昇すると、血管壁の細胞外マトリックスから一時的に遊離され、血中HGF濃度が上昇すると考えられている。ヘパリン投与は、それ自体が直接的に血管新生を起こすのではなく、血管増殖因子であるHGFの血中濃度を一時的に上昇させることで間接的に血管新生に寄与するものと考えられる。

本研究では、ヘパリン投与群において皮弁生存率の有意な増加が示された。また、皮弁内のCD31陽性細胞数の増加が示され、皮弁内で血管新生が促進したものと考えられた。血管造影では、コントロール群と比べて、皮弁辺縁で血管増生が盛んになっており、縫合部では新たに構築された血管網が観察された。ヘパリン投与による間接的なHGF濃度上昇が、皮弁内、縫合部位での血管新生、内皮再生、内皮機能改善を促進し、皮弁生着率の向上に寄与した可能性がある。

しかしながら、過去の報告においてラットへのヘパリン投与により血中HGF濃度が上昇することが示されているが、本研究では血中HGF濃度の上昇を検証していない。連日のヘパリン投与により

内因性HGFが枯渇している可能性もあり、HGFが血管新生の促進に重要な役割を果たしているかを判断するには、連日投与時の経時的な血中HGF濃度の測定が必要である。

HGFは不安定な因子だが、本手法は内因性血管壁HGFを利用した手法であるため、HGFの生体内での安定性、安全性は担保されており、手技としてもヘパリンを急速投与するのみと、簡便で安価である。皮弁移植術への応用に留まらず、血管新生と関係の深い、植皮術や遊離組織移植術など、他の関連手技にも発展されていくことが考えられる。

【結 論】

本研究では、7日間のヘパリン投与（300U/kg）により皮弁内の血管数が有意に増加し、皮弁生着面積の拡大が示された。ヘパリン投与を介した血中HGF濃度の上昇が、皮弁内の血管新生の促進に影響した可能性が示唆された。臨床での皮弁移植術への展開に留まらず、血管新生と関係の深い、植皮術や遊離組織移植術など、他の関連手技にも発展されていくことが考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

皮弁移植術における皮弁の生着成績を向上させるためには、皮弁内と周囲組織からの血管新生により、適切な血液灌流が構築されることが必要である。肝細胞増殖因子（Hepatocyte growth factor : HGF）は、強い血管新生作用を有しており、血管新生と関係の深い皮弁移植術における有効な治療手段となり得る可能性を秘めている。一方ヘパリンを経静脈的に急速投与することで間接的に血中HGF濃度が上昇し、虚血部での血管新生が促進されることが知られている。皮弁移植術においても、この手法により皮弁生着成績の向上が得られることが推測されるが、これまでに報告はない。申請論文は、ヘパリン急速投与が皮弁生着に与える影響を実験動物（Wistarラット、実験群・対照群各10匹）を用いて血管新生の観点から分析を行い、HGFとの関連性を検討したものである。結果、1）ヘパリン投与群において有意に皮弁生着面積の拡大（ $P<0.01$ ）を認めたこと、2）ヘパリン投与群において有意に皮弁内血管数の増加（ $P<0.01$ ）を認めたこと、3）ヘパリン投与群の皮膚血管造影において、皮弁辺縁で血管新生が促進されている様子が観察されたこと、を明らかにしている。以上よりヘパリンの急速投与は血管新生を促進し皮弁生着の成績向上に寄与している、と結論づけている。また、ヘパリン急速投与による血中HGF濃度の上昇は証明できなかったが、その関与の可能性を考察した。

【研究方法の妥当性】

申請論文ではWistarラットを用いて、皮弁生着面積と皮弁内血管数の測定、および血管造影による血管網の観察を行っている。皮弁生着面積の比較には、標準的なモデルであるMcFarlaneラット背部皮弁モデルを使用している。皮弁内血管数は血管内皮細胞に特異的なCD31免疫染色を行い、その陽性細胞数を測定することによって評価した。また、酸化鉛による皮膚血管造影を行い血管網の観察を行っている。統計解析には、適切な対照群の設定と群間比較にMann-Whitney U検定（有意水準 $p<0.05$ ）による客観的な解析を行っている。以上の研究方法および統計解析はヘパリン投与が皮弁の

生着に与える影響の評価として妥当である。

【研究結果の新奇性・独創性】

これまでもヘパリン投与により皮弁生着成績が向上した報告はあるが、これらはヘパリンのもつ抗凝固作用や抗炎症作用に着目したもので、血管新生に着目したものではなかった。ヘパリンはHGFと高い親和性を持っており、血管内に高用量のヘパリンが急速投与されると、血管壁の細胞外マトリックスに貯蔵されているHGFと結合して血管内にHGFを遊離させると考えられている。申請論文では、ヘパリン急速投与により皮弁内の血管新生が促進されていることを初めて明らかにしており、この結果には血中HGF濃度の上昇が関与している可能性があることを検討している。この点において、本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、適切な対照群の設定の下、確立された実験方法と統計解析を用いて、ヘパリン急速投与が皮弁生着面積、皮弁血管数に与える影響を評価している。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、また、形成外科学、再生医学など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、ヘパリンの急速投与により一時的に血管壁から内因性血管壁HGFが遊離され血中HGF濃度が上昇するという現象を利用し、皮弁生着成績の向上を試みている。その結果、皮弁内血管数の増加と皮弁生着面積の拡大が明らかにされた。また、本手法は内因性血管壁HGFを利用しているため、生体内での安定性、安全性は担保されており、手技としてもヘパリンを急速投与するのみと、簡便で安価である。臨床においては皮弁移植術への展開に留まらず、血管新生と関係の深い、植皮術や遊離組織移植術など、他の関連手技にも大いに役立つ大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、形成外科学と再生医学、統計学の理論を学び実践した上で、研究仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。獨協医学会誌に掲載された本研究を発展させた課題が科研費（若手B）に採択されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Dokkyo Journal of Medical Sciences

(48 : 43-49, 2021)