

血管柄付遊離複合組織移植内動脈の血管平滑筋に 対するノルアドレナリンの感受性変化について

塚原 孝浩

近畿大学医学部附属病院形成外科

Changes in sensitivity to noradrenaline of vascular smooth muscle
of arteries in vascularized free tissue transfer

Takahiro Tsukahara

Department of Plastic Surgery Kinki University Hospital, Osaka, Japan

ABSTRACT

This study examined changes in effect of noradrenaline on vascular smooth muscle of the arteries obtained from vascularized free tissue transfer. The free groin flap was utilized as a model of vascularized free tissue transfer. Superficial epigastric arteries were dissected from the proximal and distal part in the free groin flaps, and the effect of noradrenaline was examined using small vessel myograph. Cumulative dose-response curves for contractions induced by noradrenaline (NA) were shifted to the left and ED_{50} values were decreased during the early phase (one to four weeks) following surgery, indicating supersensitivity of the arteries. Twelve weeks after surgery there was a difference in the effect of noradrenaline on the proximal compared to distal part of the superficial epigastric arteries in the free groin flaps. The supersensitivity of the proximal part recovered to the control level, while the supersensitivity of the distal part remained. Cumulative dose-response curves for K-ion-induced contractions did not change at any time after surgery. Histochemical studies of the adrenergic nerves in the proximal and distal portions of the arteries in the free groin flaps were performed by fluorescence method with glyoxylic acid. The adrenergic nerve fibers which had disappeared one week after surgery, reappeared. Twelve weeks after surgery reinnervation occurred in the proximal part of the superficial epigastric arteries in the free groin flaps. However, the distal part did not completely recover. The time when the nerve fiber disappeared coincided with the increase in the sensitivity to NA. Therefore, we conclude that supersensitivity to NA can be induced by denervation of the arteries in the free groin flaps at early phase after surgery. The denervation supersensitivity remained in distal part of superficial epigastric arteries in late phase after surgery. This explains the circulation change in the vascularized free tissue transfer.

Key word : free tissue transfer, denervation supersensitivity, vascular smooth muscle, noradrenaline

緒 言

近年、微小血管の吻合による血管柄付遊離複合組合移植術の進歩は著しく、とくに形成外科領域において数多く利用され重要な術式となっている¹。しかし、術後早期に遊離複合組織移植内血管に閉塞が生じると移植された組織の壊死という重大な結果を招き移植は失敗する。一方、移植が成功し長期を経過した場合でも移植された組織の温度が低下するなどの不快事項が生じることがある²。術後早期に血管が閉塞する原因として、手術操作による血管壁や内膜の損傷、血栓形成、さらに血管攣縮などが考えられている^{3,4,5,6}。対策として手術操作の改良、抗血栓薬、血管拡張剤などが用いられ、それらの作用機序も解明されつつある。しかし、血管柄付遊離複合移植内の血管において血管攣縮が発現する機序については未だ明らかにされていない。したがって、この遊離移植組織内の血管攣縮の発現機序を解明することは、この手術をより安全に行う上で極めて重要である。

この血管攣縮の発現機序に関しては、血管平滑筋細胞膜興奮性の変化、各種受容体の質的量的変化、平滑筋細胞内収縮弛緩系の変化、内皮機能低下、神経支配の変化などが考えられている⁷。近年の研究でさらにまた、血管攣縮がラットの自家動脈移植モデルにおいて認められ、これが血管に分布するカテコラミン含有神経の除神経によるものであることがわかり、ノルアドレナリン（以下 NA）によって移植血管が過敏に攣縮することも明らかになってきた⁸。しかし、血管柄付遊離複合組織移植内動脈での研究はない。

そこで、本研究ではラットの腹壁遊離皮弁を用いた血管柄付遊離複合組織移植術を行い、その中に含まれる動脈の NA に対する感受性変化を経時的に観察した。

その結果、血管柄付遊離移植組織内動脈の

NA に対する感受性は吻合部に近い近位部では術後早期より除神経性の感受性の上昇によると思われる血管攣縮が認められたが、経時的にみるとその傾向は消失した。しかし、血管柄付遊離複合組織移植内の遠位部から摘出した動脈においては術後長期間経過しても除神経の感受性上昇が引き続き観察された。この遠位部に残存する感受性上昇こそが、血管柄付遊離複合組織移植の温度低下の原因ではないかと思われた。

方 法

1. 実験動物

本実験に用いた動物は、Sprague-Dawley (SD) rat で、無菌的に飼育されたものを日本エスエルシー株式会社より購入し、飼育条件 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の空調、1日12時間の自動点滅（7:00 a.m.—7:00 p.m.）の照明下で1週間飼育した。飼料は飼育繁殖固形飼料（日本クレア CE-2）を用い、塩酸テトラサイクリン（30 mg/kg）を含む水道水と共に自由に摂取させた。手術時、ラットは8週令、体重は280—300 gであった。また、手術後1週間、塩酸テトラサイクリン（60 mg/kg）を水道水に混ぜて投与したが、抗凝固剤は投与しなかった。

2. 実験方法

後述するような Strauch と Murry⁹の方法に準じ、ラットの左浅下腹壁動静脈を血管茎とする遊離鼠径皮弁を作製し、左大腿動静脈を切断したうえで、同所に再吻合移植（同所遊離組織移植）を行った。コントロールには右浅下腹壁動脈を用いた。術後1, 2, 4, 8, 12週に両側浅下腹壁動脈を摘出し薬理学的検討を行った。薬理学的検討は浅下腹壁動脈の2カ所についておこない、一方は大腿動脈から分岐した最も近位部分と、もう一方は皮弁のほぼ中央に位置する遠位部分から摘出し実験を行った。近位部分と遠位部分の距離は $15 \pm 1.5 \text{ mm}$ であっ

た。また、術後1, 12週に組織化学的蛍光法による内在神経の変化について検討した。各週別のラットの数は、6~10匹であった。

2.1. 手術操作

ラットは、urethane (ethyl carbamate) 1 mg/kg を腹腔内投与で麻酔した。また、手術は手術用顕微鏡（トプコン製，OMS-300）下で行った。

まずラットの左下腹部に40×30 mmの皮膚切開を加え鼠径皮弁を挙上した。遊離鼠径皮弁の血管柄となる浅下腹壁動静脈と大腿動静脈を温存し浅下腹壁動静脈分岐より末梢の大腿動静脈と他の末梢血管をすべて結紮切断した。鼠径靭帯と浅下腹壁動静脈分岐部との間で大腿動静脈にそれぞれ手術用血管鉗子（河野製作所，ダブルクリップ No. 11-11）をもちいクリッピングした上で、血管を切断し、鼠径皮弁を完全に遊離した。切断した大腿動静脈それぞれを、通常の微小血管吻合手技を用い、7-8個の結節縫合をもって端々吻合した。血管吻合には、11-0ナイロン糸（4SD黒ナイロン11-0，SIGMA）を使用した。血管吻合終了後、まず遠位側のクリップからはずし、移植動脈への逆流による血液充満を待って吻合部からの出血が止まったのを確認し、その後近位側のクリップをはずした¹⁰。10分後 patency test¹¹ を行い血行の再開と止血を確認した後、5-0ナイロン糸（15M黒ナイロン5-0，SIGMA）にて皮弁を元の位置に縫合し、同所遊離組織移植の処置を完了した。

また、一部の標本は、除神経操作のみを行った。この標本では、左大腿動脈を周囲組織から剝離して露出させた後、遊離鼠径皮弁作成の際に切断される大腿動脈の同部位にクリップでクランプをおこなった。クランプする時間は遊離組織移植処置に要した時間に合せて60分とした。

2.2. 摘出標本の薬理的検討

術後1, 2, 4, 8, 12週に両側浅下腹壁動脈を摘出し、種々の脈管作動物質に対する収縮反応を検討した。なお、大腿動脈の除神経操作

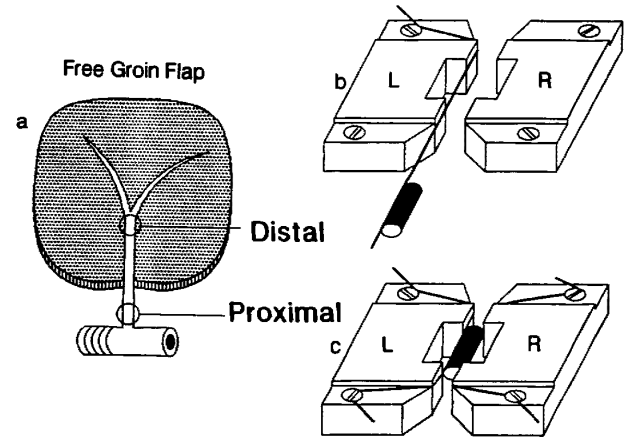


Fig. 1 Mounting procedures. a: sketch of superficial epigastric artery in the free groin flap. The arteries were dissected from both proximal and distal portions of the superficial epigastric artery in the free groin flap after removing the surrounding adipose tissue. b: diagram showing how the artery was threaded onto a 40µm tungsten wire previously attached to a specimen support(L). The artery acted as its own guide as it was pulled along the wire. The artery was then positioned between the jaws of the support, and the opposite end of the wire was secured under tension by the second screw. A second wire was passed through the lumen of the vessel. This wire was then likewise attached at each end to the second support(R). c: diagram showing the final configuration. The left specimen support(L) was connected to the transducer, and the right support(R) was connected to a linear slide moved by the micrometer. (Cited from Mulvany MJ and Halpern W)

のみを行った浅下腹壁動脈に関しては、術後1, 12週の標本についてのみ実験を行った。

2.2.1. 血管標本の作成

遊離鼠径皮弁作製手術の時と同様に、urethaneの腹腔内投与にて麻酔後、手術用顕微鏡下で前回の手術創に沿って皮膚切開を加えて、大腿動脈を露出させた。移植動脈の開存の良否を確認した後、右頸動脈を切断し出血致死させ、鼠径皮弁を浅下腹壁動静脈を含めたまま切離した。実体顕微鏡（オリンパス製実体顕微鏡

SZ) 下で切離された鼠径皮弁内浅下腹壁動静脈周囲の脂肪組織や結合組織を切除し、浅下腹壁動脈の近位部と遠位部の2箇所から直径3mmの血管標本を摘出した。近位部は浅下腹壁動脈が大腿動脈より分岐した部分とし、遠位部は鼠径皮弁のほぼ中央に位置する部分とした。(Fig. 1).

2.2.2. 実験装置

上記の方法で作成した血管標本は、Small vessel myograph (以下 Myograph) 装置^{12,13}の温浴装置内に懸垂した (Fig. 1)。また、温浴装置内は10mlのmodified Tyrode液(以下 Tyrode液)で満たした。Tyrode液の組成(mM)は: NaCl 137, KCl 5.4, CaCl₂ 2.0, MgCl₂ 1.0, NaHCO₃ 11.9, NaH₂PO₄ 0.4, glucose 5.6で、常通37°Cに保ち、95% O₂, 5% CO₂の混合ガスを通気した。K-Tyrode液は、Tyrode液中のNaClを全量KClに置換して作成した。Tyrode液とK-Tyrode液を混合することによってK濃度の異なったTyrode液を作成して用いた。発生張力の変化は等尺性に測定し、Myographに付属する圧アンブにて増幅し、熱ペン式記録器(三栄 Recti-Horiz-8K)で記録した。

2.2.3. 実験手順

標本懸垂後40μmのタングステンワイヤーを用いて標本内腔を摩擦し内膜を除去した。標本は、500mgの負荷を予め加えて、Tyrode液中に60分間放置した。その後、K-Tyrode液に置換し10分間収縮させた後、Tyrode液に戻し弛緩させるという操作を3回繰り返す。この収縮が一定になったところで実験を開始した。

薬物に対する収縮反応実験では、血管標本に諸種作動物質を累積投与して標本の収縮反応を調べ、用量作用曲線を作成した。使用した薬物は、noradrenaline (NA), Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α})で、脱分極収縮手段としてK濃度の異なる高K-Tyrode液を用いた。また、最大発生収縮張力は140mM K-Tyrode液を用いて発生させた。なお、内皮細胞の有無は標本にacetylcholineを投与して確認した¹⁴。

2.3. 内在神経の組織化学的検討

術後1, 12週に両側浅下腹壁動脈を摘出して、伸展標本を作成し、glyoxylic acid (以下GA)を用いた組織化学的蛍光法によりカテコラミン含有支配神経を調べた¹⁵。

2.3.1. 前処置

血管のadrenaline作動性神経におけるnoradrenaline分布の生理的動態をよりの確に把握するために予め次のような前処置を行った。

2.3.1.1. Nialamide 処理

Monoamine oxidase 阻害剤であるnialamide 50mg/kgを腹腔内に注入した。24時間後にurethane 1mg/kgを腹腔内投与して麻酔後、noradrenaline 200μg/kgを1mlの生理食塩水に溶解して右外頸静脈より5分間かけて静注した。Noradrenaline静注10分後、右外頸動脈を切断し出血致死させた。

2.3.1.2. Reserpine 処理

手術操作を加えていない5匹のラットにreserpine処理を行った。Reserpine 5mg/kg/dayを無麻酔下で3日間腹腔内投与した。最後のreserpine注射から24時間後に頸動脈を切断し、出血致死させた。Reserpineは最小量のTween 80に溶解してから1mg/mlとなるように生理食塩水で希釈して用いた。

2.3.2. 伸展標本の作成

鼠径皮弁内浅下腹壁動脈にダブルクリップをかけて固定したままで、血管が短縮しないようにして摘出した。摘出後直ちに、0.1Mのリン酸緩衝液でpH 7.2に調整された新鮮な2% GA溶液に入れ放置した。この溶液は、0.1M NaH₂PO₄·H₂Oと0.1M Na₂HPO₄·2H₂OでpH 7.0に調整した0.1Mリン酸緩衝液50mlに1g GAを加え、6N NaOHでpH 7.2に再調整して作成した。

血管標本は、GA溶液に浸した状態で周囲の脂肪組織や結合組織を切除した。そして、血管に縦軸方向に切開を加えて開き、内膜面が下になるようにカバーガラスの上に伸展させ、ダブルクリップでつまみ直して伸展標本を作成した。90—120分間の放置後、GA溶液から取り

出して濾紙で水分を吸い取り，ドライヤーで乾燥させた．乾燥の程度は，血管組織の不透明さが失われて透明に変化しかける状態までとした．さらに100℃に加熱した恒温器の中で4分間熱処理した後，entellan (MERCK) でカバーガラスと共にスライドガラスの上に封入した¹⁵．

2.3.3. 蛍光顕微鏡による観察

蛍光顕微鏡 (Nikon, FLUOPHOT) を用いて，落射蛍光下で観察を行った．光源には超高压水銀燈 (Nikon, HB-201AN) を使用し，励起フィルターは Nikon V (1F 385-425)，接眼側吸収フィルターは Nikon 470K を通して写真撮影装置 (Nikon UFX-II) を用いて撮影した．対物レンズは，Fluor レンズ (10X, 20X, 40X) を使用した．また，フィルムは，Ektachrome (EASTMAN KODAK Co.) と Tri-X pan (EASTMAN KODAK Co.) を使用した．

2.4.4. 画像解析処理

組織化学的蛍光法で撮影されたカテコラミン含有神経の蛍光顕微鏡写真 (カラーズライド) をパーソナルコンピューター (Sharp XY66000) を用いて画像解析処理した．まず，蛍光顕微鏡写真を CCD カラー TV カメラ (中村理科機器, IK1570N) でカラービデオモニター (PCTV452) に写し出し，画像入力装置 (NEC, PC9801) を通してコンピューターに画像を取込ませた．取込まれた画像は，512(横) × 470 (縦) 画素に分割され，1画素が red, green, blue (RGB) の組合わせで125色のうちの1色で擬似的に表示されるようにした．ついで，蛍光を発する部分を白，その他の部分を黒として白黒の二値化画像に変換した．そして，二値化処理の結果得られた画像から面積計測を行った．面積計測は，白または黒の点の数を総計し，一定面積に対する比率で示した．

2.4. 統計学的解析

計測値はすべて mean ± SE で示し，標本の数 (n) とともに記した．また，有意差検定には，Student's t-test を用い，p < 0.05 を以て有意と判定した．

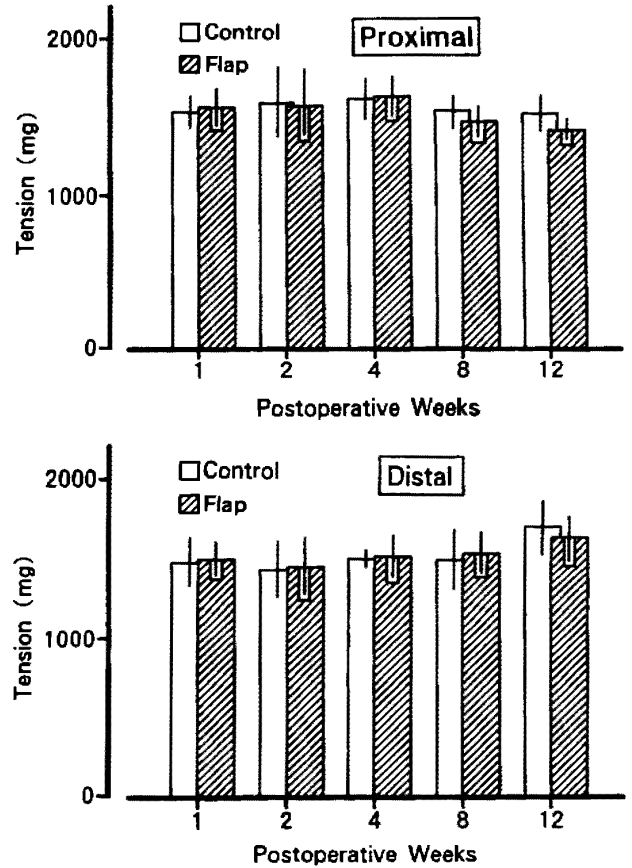


Fig. 2 Maximum contractile tension induced by 140mM K solution in control arteries and in arteries dissected from the proximal (top) and distal (bottom) portions of the superficial epigastric arteries in free groin flaps at various stages after surgery. Each value represents the mean ± SE (vertical lines) of six to ten preparations.

2.5. 使用薬物

主な使用薬物は，次の通りである．Noradrenaline (NA, Sigma), acetylcholine (Sigma), nialamide (Sigma), reserpine (半井), EDTA (半井), glyoxylic acid monohydrate (和光)．

実験結果

1. 開存率

同所遊離組織移植に際して，血管吻合に要した阻血時間は平均約60分であった．標本摘出時に生存していたラット120匹 (120皮弁) のうち遊離鼠径皮弁が壊死しなかったものは102皮弁で，開存率は，85%であった．

2. 薬理的検討

2.1. 最大発生収縮張力 (Fig. 2)

コントロールと術後各週の移植動脈の最大発生収縮張力を 140 mM K による収縮時の最大張力で比較した。

遊離鼠径皮弁側の浅下腹壁動脈の近位部分から摘出した動脈（以下皮弁近位部動脈）に関しても、遠位部分から摘出した動脈（以下皮弁遠位部動脈）に関してもコントロール動脈との間に有意な差はなかった。また、術後 1, 2, 4, 8, 12 週の術後各週間の比較においても有意な差はみられなかった。

2.2. 収縮反応

2.2.1. Noradrenaline (NA)

皮弁近位部動脈の NA の累積投与による収縮反応の結果は以下のものであった。術後 1, 2 週では、 3×10^{-8} M から収縮し始め、 3×10^{-6} M でほぼ最大収縮に達した (Fig. 3)。術後 4 週では、 10^{-7} M から収縮し始め 10^{-5} M でほぼ最大収縮に達した。また、術後 8 週以降では、 3×10^{-7} M から始まり、 3×10^{-5} でほぼ最大収縮に達した。これに対し、コントロール近位部動脈の収縮反応は、術後 1 週においても、術後 12 週においても、 3×10^{-7} M から始まり、 3×10^{-5} M でほぼ最大収縮に達した (Fig. 3)。

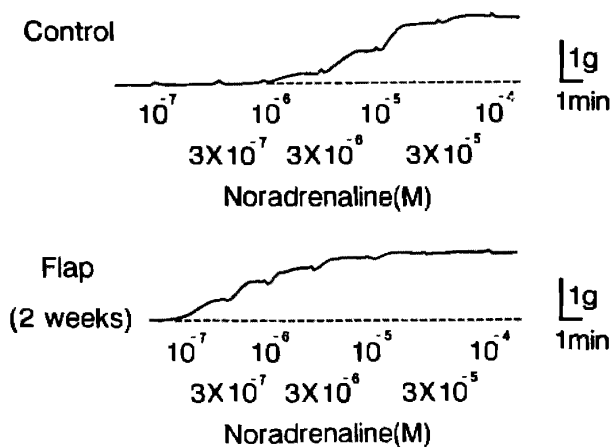


Fig. 3 Typical records of dose response experiments for noradrenaline-induced contraction in the control artery (top) and in the artery dissected from the superficial epigastric artery in free groin flap (bottom) 2 weeks after surgery.

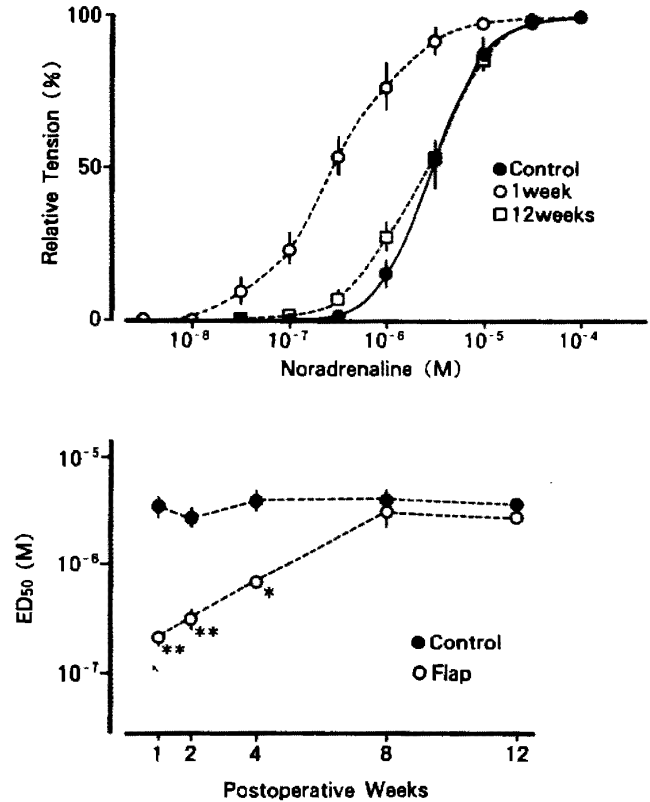


Fig. 4 Top: Dose-response curves for noradrenaline-induced contractions in control arteries and in arteries dissected from the proximal part of the superficial epigastric arteries in free groin flaps 1 week and 12 weeks after surgery. Bottom: Changes in ED_{50} values for noradrenaline obtained from cumulative dose-response curves in control arteries and arteries dissected from the proximal part of superficial epigastric arteries in free groin flaps at various stages after surgery. Each point represents the mean \pm SE (vertical lines) of six to ten preparations. *, **: significant difference from the control value (* p < 0.005, ** p < 0.001).

このように、皮弁近位部動脈は術後早期（1, 2 週）には、コントロールより低濃度から収縮し始め、低濃度で最大収縮に達し、術後 4 週には収縮反応はコントロールに近づき、術後 8 週以降はコントロールとほぼ同様の収縮反応を示した。これを用量作用曲線にまとめると Fig. 4 のようになる。術後 1, 2 週の皮弁近位部動脈の用量作用曲線はコントロールに比べて、左方に移動した。術後 4 週には徐々に右方に戻り始

め、術後8, 12週ではコントロールとほぼ同様になった。

用量作用曲線から求めた ED_{50} は、術後1, 2, 4週の皮弁近位部動脈で、それぞれコントロールに比べて有意に低下していた。しかし、術後8, 12週の皮弁近位部動脈の ED_{50} は、コントロールと有意な差は見られなかった (Fig. 4)。

また、皮弁遠位部動脈の NA の累積投与による収縮反応の結果は以下のものであった。術後1, 2週の収縮反応は、 $3 \times 10^{-8} M$ から始まり、 $3 \times 10^{-6} M$ でほぼ最大収縮に達した。術後4週の収縮反応は、 $10^{-8} M$ から始まり $10^{-6} M$ また、術後8週以降では、 $10^{-7} M$ から始まり、 $10^{-5} M$ でほぼ最大収縮に達した。これに対し、コントロール遠位部動脈の収縮反応は、術後各週とも、 $3 \times 10^{-7} M$ から始まり、 $3 \times 10^{-5} M$ でほぼ最大収縮に達した。このように皮弁遠位部動脈は術後早期 (1, 2週) のみならず、術後長期 (8, 12週) 経過してもコントロールより低濃度から収縮し始め、低濃度で最大収縮に達することが示された。これを用量作用曲線で示すと Fig. 5 のようになる。術後1, 2週の皮弁遠位部動脈の用量作用曲線はコントロールに比べて、左方に移動した。そして、術後4, 8週に右方に戻る傾向を示すものの、術後12週経過しても皮弁遠位部動脈の用量作用曲線はコントロールに比べて左方偏位したままであった。

用量作用曲線から求めた皮弁遠位部動脈の ED_{50} は、術後1, 2, 4, 8, 12週の各週ともコントロール遠位部動脈に比べて有意に低下していた (Fig. 5)。

さらに、大腿動脈を除神経したラットの浅下腹壁動脈の NA の累積投与による収縮反応は、遊離鼠径皮弁より摘出した浅下腹壁動脈の反応とほぼ同様であった。

除神経側の浅下腹壁動脈の近位部から摘出した動脈 (以下除神経近位部動脈) の NA 累積投与による収縮反応の結果は以下のものであった。術後1週で、 $3 \times 10^{-8} M$ から収縮し始め、 $3 \times 10^{-6} M$ でほぼ最大収縮に達した。また、術

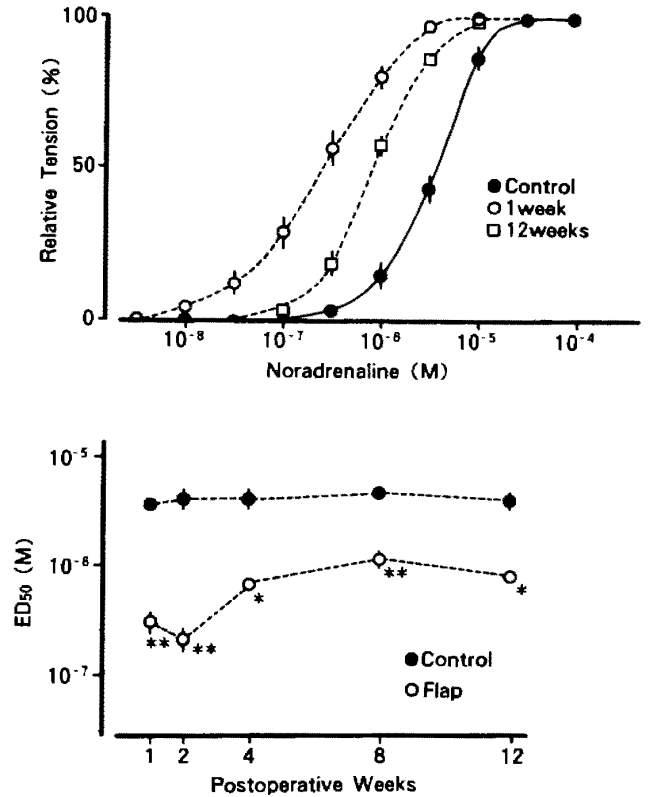


Fig. 5 Top: Dose-response curves for noradrenaline-induced contractions in control arteries and in arteries dissected from the distal part of the superficial epigastric arteries in free groin flaps 1week and 12 weeks after surgery. Bottom: Changes in ED_{50} values for noradrenaline obtained from cumulative dose-response curves in control arteries and arteries dissected from the distal part of the superficial epigastric arteries in free groin flaps at various stages after surgery. Each point represents the mean \pm SE (vertical lines) of six to ten preparations. *:**significant difference from the control value (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

後12週では 10^{-7} から収縮し始め、 3×10^{-5} でほぼ最大収縮に達した (Fig. 6)。これに対し、コントロール側近位部動脈の収縮反応は、術後1週, 12週とも、 3×10^{-7} から収縮し始め、 3×10^{-5} でほぼ最大収縮に達した。このように、遊離鼠径皮弁の場合と同様に、除神経近位部動脈は術後早期には、コントロールより低濃度から収縮し始め、低濃度で最大収縮に達し、術後12週にはコントロールとほぼ同様の収縮反応を

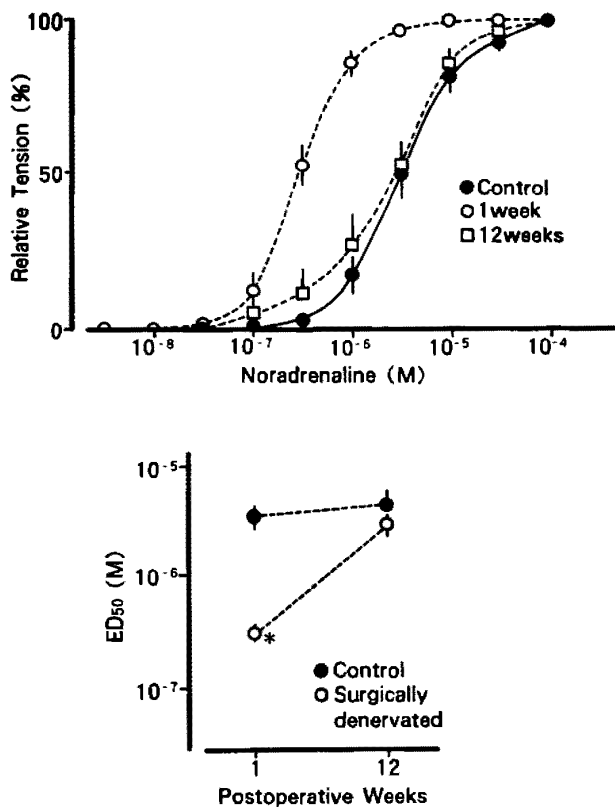


Fig. 6 Top: Dose-response curves for noradrenaline-induced contractions in control arteries and in surgically denervated arteries dissected from the proximal part of the superficial epigastric arteries at 1 week and 12 weeks after surgery. Bottom: Changes in ED_{50} values for noradrenaline obtained from cumulative dose-response curves in control arteries and surgically denervated arteries dissected from the proximal part of the superficial epigastric arteries at various stages after surgery. Each point represents the mean \pm SE (vertical lines) of six preparations. *: significant difference from the control value (* $p < 0.005$).

示した。

これを用量作用曲線で示すと Fig. 6 のようになる。術後1週の除神経側近位部動脈の用量作用曲線はコントロールに比べて左方に移動し、術後12週では再び右方に戻り、コントロールとほぼ同様になった。

用量作用曲線から求めた術後1週での除神経近位部動脈の ED_{50} は、コントロール近位部動脈に比べて有意に低下していた。しかし、術後

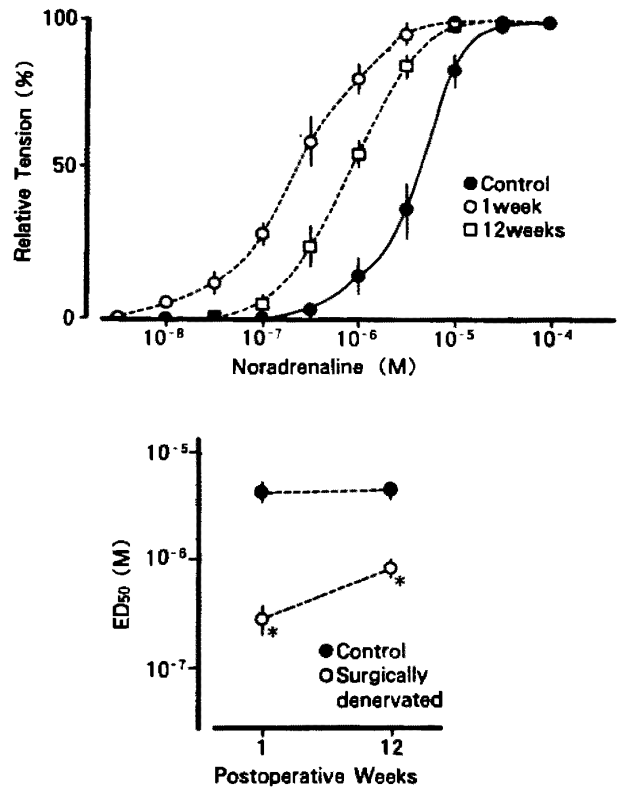


Fig. 7 Top: Dose-response curves for noradrenaline-induced contractions in control arteries and in surgically denervated arteries dissected from the distal part of the superficial epigastric arteries 1 week and 12 weeks after surgery. Bottom: Changes in ED_{50} values for noradrenaline obtained from cumulative dose-response curves in control arteries and surgically denervated arteries dissected from the distal part of the superficial epigastric arteries at various weeks after surgery. Each point represents the mean \pm SE (vertical lines) of six preparations. *: significant difference from the control value (* $p < 0.005$).

12週での除神経近位部動脈の ED_{50} はコントロール近位部動脈と有意な差は見られなかった (Fig. 6)。

また、除神経側の浅下腹壁動脈の遠位部から摘出した動脈 (以下除神経遠位部動脈) の NA の累積投与の結果は以下のものであった。術後1週では、 10^{-8} M から収縮し始め、 3×10^{-6} M でほぼ最大収縮に達した。また、術後12週では、 10^{-7} M から始まり、 10^{-5} M でほぼ最大収縮に

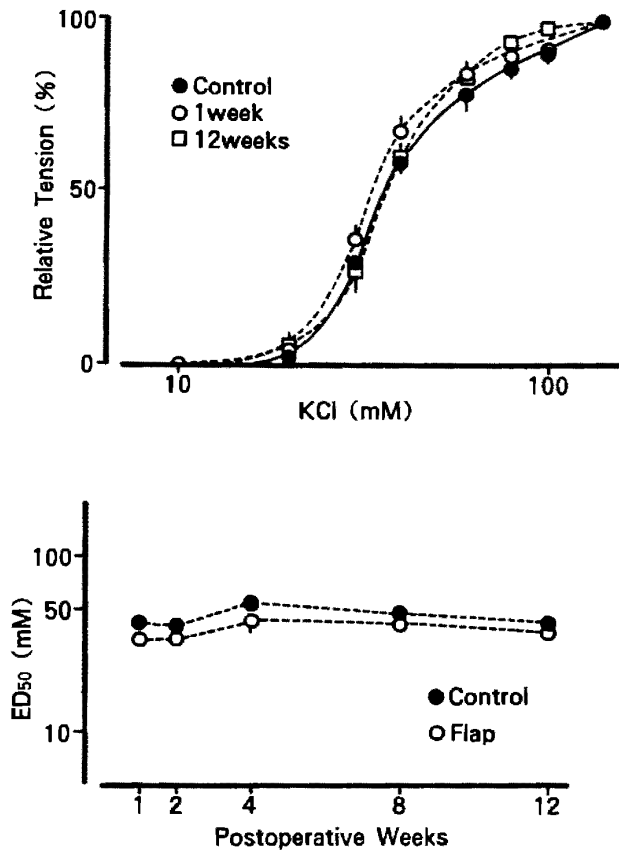


Fig. 8 Top: Dose-response curves for KCl-induced contractions in control arteries and in arteries dissected from the proximal part of the superficial epigastric arteries in free groin flaps at 1 week and 12 weeks after surgery. Bottom: Changes in ED₅₀ values for KCl obtained from cumulative dose-response curves in control arteries and arteries dissected from the proximal part of the superficial epigastric arteries in free groin flaps at various stages after surgery. Each point represents the mean ± SE (vertical lines) of six to ten preparations.

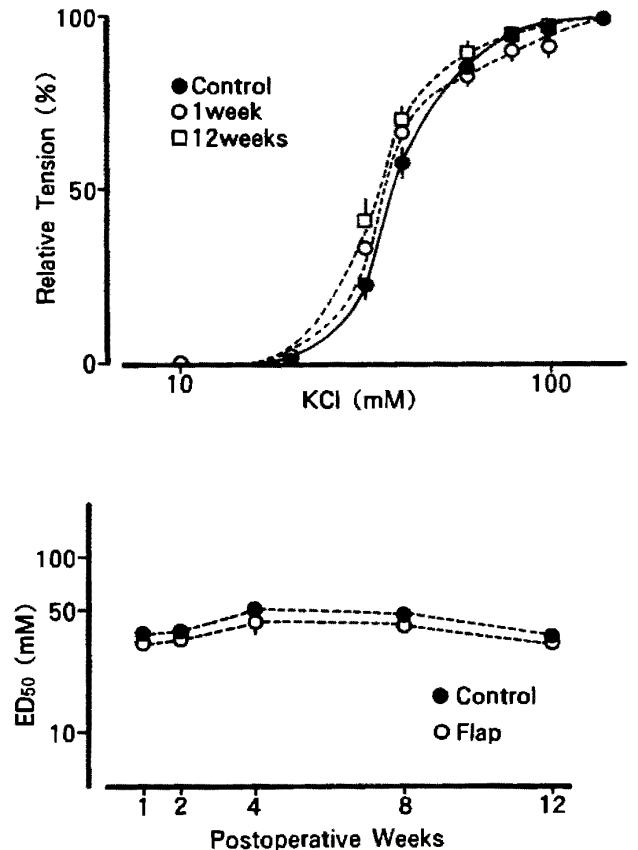


Fig. 9 Top: Dose-response curves for KCl-induced contractions in control arteries and in arteries dissected from the distal part of the superficial epigastric arteries in free groin flaps at 1 week and 12 weeks after surgery. Bottom: Changes in ED₅₀ values for KCl obtained from cumulative dose-response curves in control arteries and arteries dissected from the distal part of the superficial epigastric arteries in free groin flaps at various stages after surgery. Each point represents the mean ± SE (vertical lines) of six to ten preparations.

達した。これに対し、コントロール遠位部動脈の収縮反応は、術後1、12週とも、 3×10^{-7} から始まり、 3×10^{-5} ではほぼ最大収縮に達した。このように、遊離鼠径皮弁の場合と同様、除神経遠位部動脈でも、術後早期（1週）のみならず、術後長期（12週）経過してもコントロールより低濃度から収縮し始め、同じく低濃度で最大収縮に達することが示された (Fig. 7)。

これを用量作用曲線で示すと Fig. 7 のようになる。術後1週の除神経遠位部動脈の用量作

用曲線はコントロールに比べて、左方に移動した。しかし、術後12週では右方に戻る傾向を示すものの、コントロールに比べて左方に移動した。

また用量作用曲線から求めた ED₅₀ は、除神経遠位部動脈で術後1、12週でそれぞれコントロールに比べて有意に低下していた (Fig. 7)。

2.2.2. KCl

KCl 累積投与による収縮反応を用量作用曲線にまとめると Fig. 8, Fig. 9 になる。コント

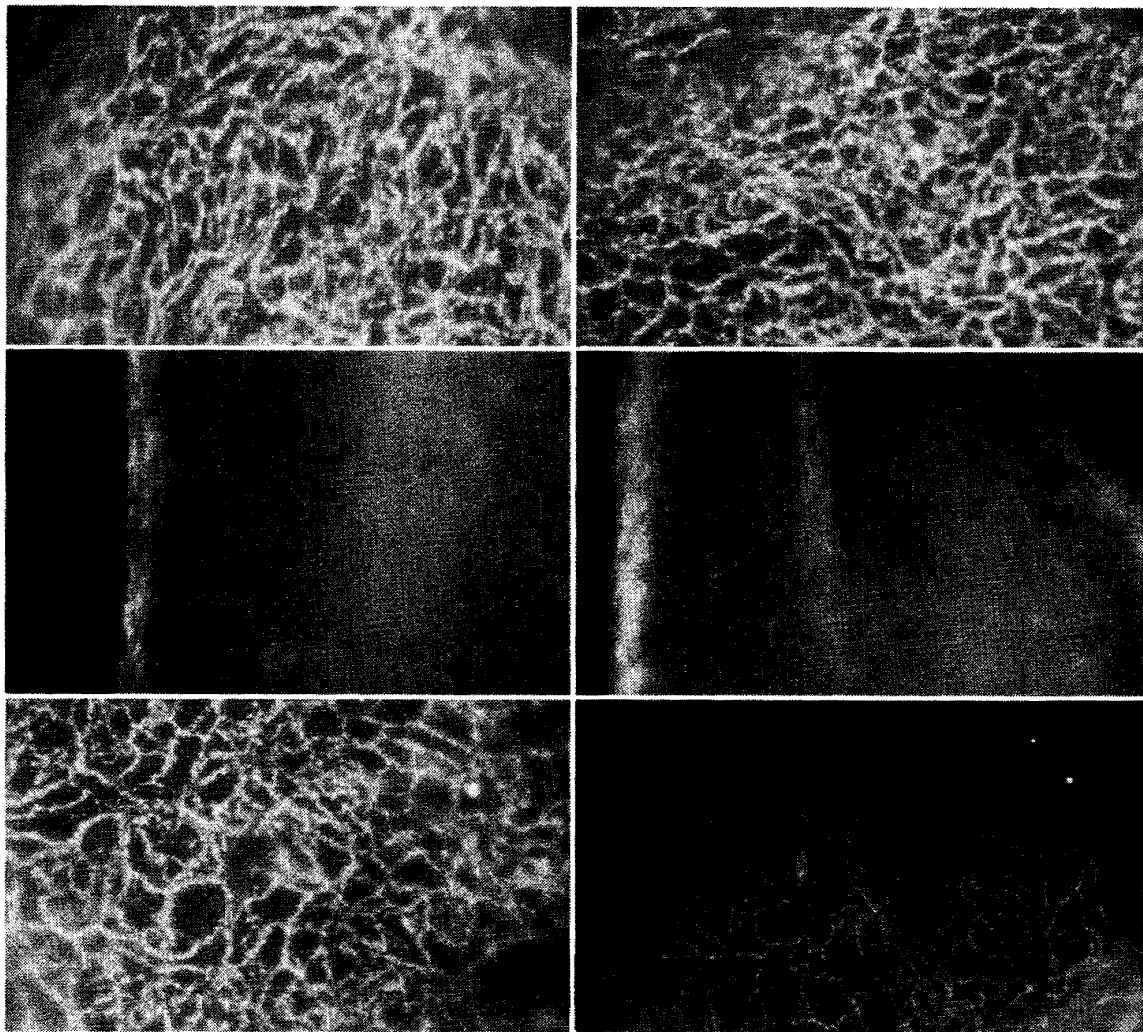


Fig. 10 Photomicrographs demonstrating glyoxalic acid-induced fluorescence of adrenergic nerves in stretch preparations ($\times 200$). Left top: control artery from the proximal part of the superficial epigastric artery. Left middle: 1 week after surgery; the proximal part of superficial epigastric artery. Left bottom: 12 weeks after surgery; the proximal part of the superficial epigastric artery. Right top: control artery from the distal part of the superficial epigastric artery. Right middle: 1 week after surgery; the distal part of the superficial epigastric artery. Right bottom: 12 weeks after surgery; the distal part of the superficial epigastric artery.

ロール動脈と術後各週の皮弁側動脈は近位部遠位部ともに 20 mM から収縮し始め、140 mM で最大収縮に達するほぼ同様の収縮反応を示した。

用量作用曲線から求めた ED_{50} は、皮弁側近位部動脈、皮弁側遠位部動脈にかかわらず、各週ともコントロール側動脈との間に有意な差はなかった。

3. 組織化学的検討

3.1. 蛍光顕微鏡所見

コントロール動脈の伸展標本では、近位部、

遠位部ともに標本全体に黄色の蛍光を発する網目構造のカテコラミン含有神経線維を認めた (Fig. 10)。

術後1週の皮弁内動脈では、近位部、遠位部ともにカテコラミン含有神経線維を全く認めなかった。術後12週の皮弁近位部動脈ではカテコラミン含有神経線維が比較的多く認められたが、術後12週の皮弁遠位部動脈ではカテコラミン含有神経線維が散在して認められる程度であった (Fig. 10)。

除神経動脈においても術後1週では、カテコ

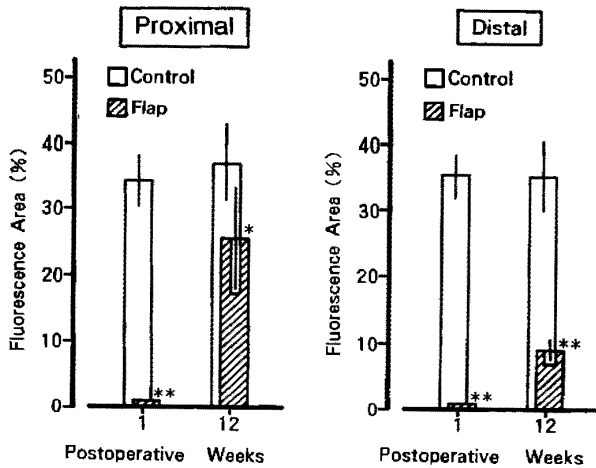


Fig. 11 The fluorescence area of adrenergic nerves was measured by computer image analysis in control arteries and in arteries dissected from superficial epigastric arteries in the free groin flaps at 1 week and 12 weeks after surgery.

Left: the proximal part of the superficial epigastric artery. Right: the distal part of the superficial epigastric artery. The unit area was taken as 100 percent in each preparation and the fluorescence area was expressed as a percent of the total unit area. Each value represents the mean \pm SE (vertical lines) of 8 preparations.

*, **: significant difference from the control value (* $p < 0.005$, ** $p < 0.001$).

ラミン含有神経線維を全く認めなかった。除神経後12週では皮弁側動脈と同様に、近位部動脈ではカテコラミン含有神経線維が比較的多く認められたが、遠位部ではカテコラミン含有神経線維が散在して認められる程度であった。

Reserpine 処理したラット大腿動脈では術後1週の皮弁側動脈と同様にカテコラミン含有神経線維を全く認めなかった。

なお、この実験で認められた蛍光は、adrenaline あるいは noradrenaline による色調を呈していた。

3.2. 画像解析

Fig. 11 はカテコラミン含有神経線維が蛍光を発した面積が画像一定面積当たりに占める割合を表わしたものである。

術後1週のコントロール近位部動脈では、

34.2 \pm 1.5%であったが、皮弁近位部動脈では全例で蛍光部分が全く認められなくなった。術後12週においてコントロール近位部動脈では、36.7 \pm 2.2%であったが、皮弁近位部動脈では、25.3 \pm 2.3%まで増加してきた。また、術後1週のコントロール遠位部動脈では 35.2 \pm 1.3%であったが、皮弁遠位部動脈では全例で蛍光部分が全く認められなかった。また、術後12週においてコントロール遠位部動脈では、35.0 \pm 2.0%であったが、皮弁遠位部動脈では、8.9 \pm 0.6%の増加しか示さなかった。

考 察

近年、微小血管の吻合による血管柄付遊離複合組織移植術の進歩は著しく、とくに形成外科領域における血管柄付遊離複合組織移植術は、臨床において数多く利用され重要な術式となっている¹。しかし、術後早期に動脈に閉塞が生じると移植された組織の壊死という重大な結果を招き移植は失敗する。一方、術後長期を経過した場合でも移植された組織の温度が低下するなどの現象が臨床的に認められており、血管柄付遊離複合組織移植内動脈の収縮性に何等かの変化が生じていることが示唆されている²。

術後早期に血管が閉塞する原因として、手術操作による血管壁や内膜の損傷、血栓形成、さらに血管攣縮などが考えられている^{3,4,5,6}。対策として手術操作の改良、抗血栓薬、血管拡張剤などが用いられ、それらの作用機序も解明されつつある。しかし、血管柄付遊離複合組織移植内動脈において血管攣縮が発現する機序については未だ明らかにされていない。したがって、この血管攣縮の発現機序を解明することは、この手術をより安全に行う上で極めて重要である。

この血管攣縮の発現機序に関しては、血管平滑筋細胞膜興奮性の変化、各種受容体の質的量的変化、平滑筋細胞内収縮弛緩系の変化、内皮機能低下、神経支配の変化などが考えられている⁷。近年の研究でさらにまた、血管攣縮がラットの自家動脈移植モデルにおいて認められ、

これが血管に分布するカテコラミン含有神経の除神経によるものであることがわかり、NA によって移植血管が過敏に攣縮することも明らかになってきた⁸。しかし、血管柄付遊離複合組織移植内動脈の機能的な変化に関する研究は行われておらず、殆どの報告が組織学的な変化の研究にとどまっている^{16,17,18}。

そこで、本研究ではラットの腹壁遊離皮弁を用いた血管柄付遊離複合組織移植術を行い、その中に含まれる動脈の NA に対する感受性変化を経時的に観察し、血管平滑筋の NA に対する感受性が変化していることが示された。次に、実験結果について考察する。

まず、本実験において移植手術を行う際に血管平滑筋の機械的損傷や虚血による退行性変化が起きる可能性があり¹⁹、このことが実験結果に大きな影響を与えている可能性がある。しかし、本実験における阻血時間平均は約60分であり、この虚血によって血管平滑筋の諸機能に大きな変化が起きる可能性は少ないといわれている^{20,21}。このことはK拘縮による本実験の最大収縮の検討実験によっても、移植組織よりとりだした動脈のK拘縮の最大発生張力はコントロールとの間に有意な差は見られなかったことから確認された。したがって、本実験で認められた血管柄付遊離複合組織移植内動脈におけるNAに対する感受性の変化について考察するにあたり、実験操作による血管平滑筋の収縮機能の異常に関する可能性は除外できると考えられる。

本実験では、血管柄付遊離複合組織移植内動脈の近位部及び遠位部において、移植術後1, 2, 4週で動脈のNAに対して感受性が上昇していることが示された。これに対して、Kに対する感受性の変化は認められなかった。NAに対する感受性の変化は近位部の動脈においては移植後8週以降に正常化するが、遠位部の動脈においては移植後12週を経過しても感受性上昇が残存した。このような血管柄付遊離複合組織移植内動脈における平滑筋の反応性の変化については報告はほとんどみられない。血管のみ

を移植した移植血管（動脈—静脈移植）での実験では、NAの収縮力が低下するという報告²²や、高Kに対する感受性は変わらないがNAに対する感受性が上昇したという報告²³や、NAに対する感受性は低下するという報告²⁴もありまちまちである。ラット大腿動脈を同所自家動脈移植した実験では、移植後1, 2週でNAに対する血管平滑筋の感受性が上昇したという報告⁸があり、本実験の結果と一致する。

本実験で観察された血管柄付遊離複合組織移植内動脈のNAに対する感受性変化とその機序にはいくつかの可能性が考えられる。以下、それらについて考察を加える。

感受性変化をもたらした原因としては1)血管損傷（特に内皮損傷）2)手術操作による除神経が考えられる。

まず、内皮損傷であるがクリッピングなどの手術操作によって内皮の損傷が生じるという報告^{19,25,26}が見られる。血管内皮は血管弛緩物質を遊離して血管の収縮を抑制する²⁷。したがって、逆に内皮の損傷による弛緩物質の遊離減少は血管平滑筋の収縮の増大につながる。NAは内皮由来の弛緩物質の遊離を介して自己の収縮作用を抑制する^{27,28,29}といわれているが、高Kによる収縮でも程度は弱いが多少の抑制が見られる。よって本実験で見られたNAに対する感受性上昇が内皮損傷によるものであれば、高Kに対しても感受性の増加が認められるはずであり、これは本実験の結果と矛盾する。さらに、本実験では内皮除去標本を用いているので内皮損傷には無関係の感受性の上昇であると考えられる。

次に、除神経の影響について考察する。血管壁の神経が除神経されることにより感受性が変化することはよく知られている^{30,31}。本実験では手術手技により一旦血管が完全に切断されるため、動脈の除神経が起こっていると考えられる。このことは、本実験でも動脈のカテコラミン含有神経が消失することを組織化学的蛍光法で観察出来たことから明らかである。また、reserpineは、交感神経終末からカテコラミン

を涸渇させる³²が、reserpine 処理で蛍光が消失した結果から、本実験で観察したこれらの神経がカテコラミン含有神経であることを確認している。本実験では動脈の神経消失は術後1週で見られ、術後12週で再生していることが確認された。この神経滅失の期間は NA に対する感受性の上昇の時期と完全に一致しており、本実験において見られた感受性上昇が除神経性感受性上昇 (denervation supersensitivity)^{30,31}であることを示唆する。また、血管切断は行わず除神経処置のみを加えた動脈においても同様に NA の感受性の変化が見られたという本実験の結果もこの可能性を強く支持していると思われる。また、一般に除神経による NA 感受性の上昇は術後1, 2週で最高となることが知られている^{30,31,33,34,35}が、本実験においてもこの時期において感受性が最高に上昇しており、このことも、本実験でみられた感受性上昇が除神経による除神経性感受性上昇であることを示唆している。

除神経による感受性上昇のメカニズムとして理論的にはシナプス後性すなわち血管平滑筋細胞膜の感受性の変化と、シナプス前性の変化の二つの可能性が考えられる。

まず、第一はシナプス後性の血管平滑筋細胞膜における感受性変化の可能性について述べる。平滑筋細胞膜における感受性変化の原因としては、平滑筋細胞膜興奮性の変化、各種 receptor の質的量的変化、平滑筋細胞内収縮系弛緩系の異常、内皮機能低下あるいは内膜損傷による内皮由来の平滑筋弛緩物質の減少などが考えられる⁷。しかし、先に述べたように、本実験系に於いては平滑筋細胞膜興奮性の変化や平滑筋細胞内収縮系弛緩系の異常は否定されており、これらの原因によって感受性変化が生じた可能性は否定される。また、血管内皮からの血管弛緩物質遊離の影響も本実験では無関係であると考えられる。次に、除神経による receptor の質的量的変化による可能性に関しては、本実験では確認していないものの radio-isotope を用いた実験から否定的な報告がなさ

れており³⁶、これらのことを考慮にいれると本実験で観察された血管柄付遊離複合組織移植内動脈の特異的な感受性の上昇は、血管平滑筋細胞膜のいわゆる後シナプス性の変化ではないと考えるのが妥当である。

つぎに、第二の可能性としてのシナプス前性の感受性上昇について述べる。

シナプス前膜においては、カテコラミンの神経性取り込み (neuronal uptake) があり、通常の状態では、この作用によるカテコラミンの刺激作用が抑制されていると考えられている³¹。除神経後は神経の変性が起こり、この神経性取り込みがなくなりカテコラミンの刺激作用が強くなると考えられる。本実験において血管柄付遊離複合組織移植内動脈の標本でカテコラミン含有神経の染色性の消失が術後1週で見られたが、このことは、とりもなおさずこの神経性取り込み障害を意味するものと考えられる。この神経性取り込みはかなり特異的でカテコラミンが最もよく取り込まれる³¹といわれている。したがって、本実験で見られた NA に対する最も強い感受性上昇は、この除神経による神経性取り込みの消失が原因であると考えることができる。Cocain を始めとする神経性取り込み遮断薬が同様の感受性上昇をもたらすという報告³⁷もこの可能性を支持する。また、術後数週間で感受性が元に戻る現象は、再神経支配による神経性取り込みの再開として説明できる。

以上より、本実験で見られた血管柄付遊離複合組織移植内動脈における NA に対する感受性の上昇は、いずれも除神経による神経性取り込みの消失が原因と考えられるシナプス前性のものである可能性が最も強いと考えられる。

最後に、血管柄付遊離複合遊離組織移植内動脈の近位部から摘出した動脈と、遠位部から摘出した動脈における感受性変化と組織化学的変化について考察を加える。本実験において、移植後早期において移植組織内の動脈は近位部、遠位部にかかわらず感受性の上昇とカテコラミン含有神経の消失が観察された。そして、移植後長期経過した際には、近位部動脈では感受性

正常化とカテコラミン含有神経の再神経支配が観察され、遠位部動脈では感受性上昇の残存とカテコラミン含有神経の不完全な再神経支配が観察された。移植組織内動脈のカテコラミン含有神経の末梢での不完全な神経再生に関する報告がすでに Lahteenmaki よりなされており¹⁸、本研究において、移植組織内動脈の近位部標本のカテコラミン含有神経の再支配が、移植後12週でコントロールの約74%に及んだにもかかわらず遠位部標本ではコントロールの約25%であった結果とはほぼ一致する。したがって、血管柄付遊離複合組織移植内動脈の再神経支配は動脈の近位部から始まり、順に遠位部に進行するが、遠位部分では移植後長期(12週)を経過しても完全に再支配されることはないと考えられた。

以上のことから、血管柄付遊離移植組織内動脈の NA に対する感受性は吻合部に近い近位部では術後早期より除神経性の感受性の上昇によると思われる血管攣縮が認められたが、経時的にみるとその傾向は消失した。しかし、血管柄付遊離複合組織移植内の遠位部から摘出した動脈においては術後長期間経過しても除神経性の感受性上昇が引き続き観察された。この遠位部に残存する感受性上昇こそが、血管柄付遊離複合組織移植後に長期間残存する温度低下の原因ではないかと考えられた。

近年、微小血管吻合による血管柄付遊離複合組織移植の進歩は著しく、とくに形成外科領域における血管柄付遊離複合組織移植は臨床において数多く利用され重要な術式となり頻用されている¹。しかし、本研究により、術後早期に血管の NA 感受性が上昇することが明らかになり、また、遠位部においてはこの上昇が長期間残存することが示された。

したがって、臨床的には術後早期から血管攣縮が生じることが示され、このことを考慮した術後管理の必要性が示唆された。そして術後長期間経過しても、遠位部に残存する除神経性感受性上昇が組織の温度低下をもたらすのではないかと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を頂きました皮膚科学手塚正教授、形成外科学上石弘教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、様々な形で御協力頂きました形成外科教室の諸先生方に心から感謝申し上げます。

本論文の各部については、第30, 31, 32回近畿大学医学会学術講演会(平成3年7月, 平成3年12月, 平成3年7月, 大阪狭山市), 第1回日本形成外科学会基礎学術集会(平成4年10月, 青森県弘前市)において発表した。

文 献

1. 波利井清紀. マイクロサージャリーの進歩と限界. 日医会誌 1981; 85: 1259-1265.
2. 桜井 実. 反射性交感神経性ディストロフィー. 整形外科 MOOK 1989; 57: 93-100.
3. 山田弘之, 波利井清紀, 桑原レオナルド実, 姜勝英. ラット free groin flap の生着に影響を及ぼす因子に関する実験的研究. 形成外科 1992; 35: 677-682.
4. Albertengo JB, Rodriguez A, Buncke HJ et al. A comparative study of flap survival rates in end-to-end and end-to-side microvascular anastomosis. Plast Reconstr Surg 1981; 67: 194-199.
5. Geter RK, Winters RRW, Puckett CP. Resolution of Experimental microvascular spasms and improvement in anastomotic patency by direct topical agent application. Plast Reconstr Surg 1968; 77: 105-115.
6. Seaber AV. Experimental vasospasms. Microsurgery 1987; 8: 234-241.
7. 日高弘義, 亀山正邦編. 血管の攣縮. 東京: JBQ 出版局, 1987; 3-64.
8. 上田吉生. 自家移植動脈における血管作動性物質の感受性の上昇とその機序について. 近畿大医誌 1991; 16: 149-164.
9. Strauch B, Murry DE. Transfer of composite graft with immediate suture anastomosis of its vascular pedicle measuring less than 1 mm. in external diameter using microsurgical techniques. Plast Reconstr Surg 1967; 40: 325-329.
10. Hattori H, Killen DA, Green JW. Suture materials and technique on patency of anastomosed arteries of less than 1.5 mm in diameter. Am J Surg 1970; 36: 352-358.
11. Hayhurst JW, O'Brien BMCC. An experimen-

- tal study of microvascular technique, patency rates and related factors. *Bri J Plast Surg* 1975 ; 28 : 128-132.
12. Mulvany MJ, Halpern W. Mechanical properties of vascular smooth cells in situ. *Nature* 1976 ; 260 : 617-619.
 13. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 1977 ; 41 : 19-26.
 14. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980 ; 288 : 373-376.
 15. Lindvall O, Bjorklund A. The glyoxylic acid fluorescence histochemical method: a detailed account of the methodology for the visualization of central catecholamine neurons. *Histochemistry* 1974 ; 39 : 97-127.
 16. 鳥居修平. 微小血管吻合を利用した遊離皮弁移植の実験的研究. 中部整災誌 1981 ; 24 : 893-904.
 17. 鳥居修平, 波利井清紀, 大森喜太郎, 関口順輔. 遊離皮弁生着に関する要因. 形成外科 1977 ; 20 : 234-241.
 18. Lahteenmaki T. The regeneration of adrenergic nerves in free microvascular groin flap in the rat. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1986 ; 20 : 183-188.
 19. Acland RD, Trachtenberg L. The histopathology of small artery following experimental microvascular anastomosis. *Plast Reconstr Surg* 1977 ; 59 : 868-875.
 20. Shibata S, Briggs AH. Mechanical activity of vascular smooth muscle under anoxia. *Am J Physiol* 1967 ; 212(5) : 981-984.
 21. Detar R, Bohr DF. Oxygen and vascular smooth muscle contraction. *Am J Physiol* 1968 ; 214(2) : 241-244.
 22. Wadell WG, Vogelfanger IJ, Bosc M, Malik KU, MacConaill M, Ling G. Changes in contractility, compliance and elasticity in experimental arterial vein autografts. *Can J Sur* 1973 ; 16 : 252-260.
 23. Seidal CL, Lewis RM, Hartley C et al. Adaptation of canine saphenous vein to grafting; correlation of contractility and contractile protein content. *Circ Res* 1984 ; 55 : 102-109.
 24. Makhoul RG, Davis WS, Mikat EM, McCann RL, Hagen PO. Responsiveness of vein by pass grafts to stimulation with norepinephrine and 5-hydroxytryptamine. *J Vasc Surg* 1987 ; 6 : 32-38.
 25. Kurihara K, Bang HH, Marumo E. Endothelial regeneration in a rat carotid artery. *J Jpn Plast Reconstr Surg* 1978 ; 7 : 380-388.
 26. Isogai N, Kamiishi H, Chichibu S. Re-endothelialization stages at the microvascular anastomosis. *Microsurgery* 1988 ; 9 : 87-92.
 27. Furchgott RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1984 ; 24 : 175-197.
 28. Cocks TM, Angus JA. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature* 1983 ; 305 : 627-630.
 29. Osugi S, Shimamura K, Sunano S. Decreased modulation by endothelium of noradrenaline-induced contractions in aorta from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Arch Inter Pharm Ther* 1990 ; 305 : 86-99.
 30. Trendelenburg U. Supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines. *Pharmacol Rev* 1963 ; 15 : 225-276.
 31. Trendelenburg U. Mechanisms supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines. *Pharmacol Rev* 1966 ; 18 : 629-640.
 32. Wada H. Demonstration of autonomic nerves in transplanted arteries in rabbits. *J Microsurg* 1981 ; 3 : 20-27.
 33. Kline RL, Mercer PF. Functional reinnervation and development of supersensitivity to NE after renal denervation in rats. *Am J Physiol* 1980 ; 238 : 353-358.
 34. Ohgushi H, Shinohara H. The supersensitivity of vascular smooth muscle following surgical renal denervation in the dog. *Arch Jpn Chir* 1984 ; 53 : 644-652.
 35. Hogestatt ED, Johansson O, Andersson KE, Kullendorff CM. Influence of renal denervation on vascular responsiveness of isolated rat intrarenal arteries. *Acta Physiol*
 36. Nasser A, Barakeh JF, Abel PW, Minneman KP. Reserpine-induced postjunctional supersensitivity in rat vas deferens and caudal artery without change in alpha adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1985 ; 23 : 350-357.
 37. Edvinsson L, Aubineau P, Owman C, Sercombe

R, Seylaz J. Sympathetic innervation of cerebral arteries: Prejunctional supersensitivity to

norepinephrine after sympathectomy or cocaine treatment. *Stroke* 1975 ; 6 : 525-530.