

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21182

研究課題名(和文) in vivoイメージングを用いたリンパ輸送機能定量的評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of quantitative evaluation method of lymphatic transport function using in vivo imaging

研究代表者

杉山 成史 (Sugiyama, Narushi)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80379776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光試薬としてIRDye PEGをマウス後肢に投与しin vivoイメージングにて投与部位の蛍光強度を経時的に測定することでリンパ流とともに流出する蛍光試薬の量を定量し、リンパ輸送機能を評価しようと様々な条件を検討したが、有意な結果は得られなかった。蛍光試薬としてFluorescent Dextranをラット後肢に投与し、リンパ流とともに血中に流入する蛍光試薬の量を経時的に採血した検体の蛍光強度を測定することで、リンパ輸送機能を定量評価できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
従来リンパ系の輸送機能を定量評価する検査が無かったが、新たな定量評価法の確立につながる結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：To quantify function of lymphatic transportation, several conditions were examined by measuring remaining IRDye PEG as a fluorescent reagent injected at mouse hind limb using in vivo imaging over time, but no significant results were obtained. It was suggested the possibility that quantitative evaluation of lymphatic transportation can be performed by administering Fluorescent Dextran as a fluorescent reagent to the rat hind limb and measuring the fluorescence intensity of the blood sample collected over time to evaluate the amount of Fluorescent Dextran flowing into the blood along with the lymphatic flow.

研究分野：リンパ学

キーワード：リンパ輸送機能 定量評価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

形成外科領域を始めとする外科臨床においては、リンパ輸送系が原因となる病態にしばしば遭遇する。そのなかで最大の疾患はリンパ浮腫である。リンパ浮腫はリンパ流の鬱滞に起因する組織の浮腫であり、子宮癌や乳癌に対するリンパ節郭清後に起こることが多い。本邦での罹患者数は、10~15万人と推定されている。しかしながら、リンパ節郭清後に必ずリンパ浮腫を発症するわけではなく、リンパ浮腫の病態は未だに解明されていない。また、決定的な治療法も存在せず圧迫やマッサージなどによる対症療法に甘んじざるを得ない。リンパ管静脈吻合術や血管付きリンパ節移植などの手術治療法が行われる例もあるが、その効果は一定せず、有効性は不明である。この様に多くの問題が山積しているが、その最大の要因はリンパ輸送機能を定量的に評価出来る方法が存在しない事である。最も一般的なリンパ輸送機能の検査法はリンパシンチグラフィである。リンパシンチグラフィでは、リンパの鬱滞や逆流、リンパ流の途絶などは判別出来るものの、輸送機能を定量的に評価することは出来ず、空間解像度も不良である。近年、新しい検査法としてインドシアニングリーン (ICG) を用いた蛍光リンパ管造影法が広まってきている。蛍光リンパ管造影法は解像度が高く、リンパ流の動態も観察可能であるが、深部は観察できず、輸送機能の定量的評価も出来ない。

2. 研究の目的

上記のような問題を打開するため、実験動物におけるリンパ輸送機能の定量的評価法を確立することが本研究の目的である。インドシアニンググリーンや IRDye PEG などの高分子蛍光物質を皮内に注射すると、これらの物質はリンパ管に吸収され、リンパ液とともに輸送されて静脈角より血中に入る。そこで、注射部位に残存する蛍光物質を *in vivo* イメージングを用いて経時的に測定すれば、蛍光物質の消失速度からリンパ輸送機能を定量することが可能と考えられる。また、血中で比較的安定な IRDye PEG などを用いれば、血中濃度を経時的に測定することにより、血中への流入速度からリンパ輸送機能を定量できる。このような検査方法を用いて、正常な動物だけでなく鬱血や虚血、リンパ浮腫モデルにおけるリンパ輸送機能を定量的に評価し、検査方法の妥当性・信頼性を検証することが目的である。

3. 研究の方法

蛍光物質の検討 (*in vivo* イメージング)

Fluorescent Dextran

Wistar 系ラットの後肢趾間に注入し、*in vivo* イメージングシステム (Xenogen IVIS Lumina) で経時的に注入部位の蛍光強度を計測した。Fluorescent Dextran の濃度と投与量について条件を検討した。

ICG

Wistar 系ラットの後肢趾間に 0.25mg/ml の ICG を 0.1ml 注入し、*in vivo* イメージングシステム (Xenogen IVIS Lumina) で経時的に注入部位の蛍光強度を計測した。

ICG は体内のアルブミンやリポ蛋白と結合してはじめて蛍光を発するようになるため、蛍光物質として使用するためにはアルブミンやリポ蛋白と結合させ蛍光特性を有する状態で投与する必要がある。そこで Bovine serum albumin (BSA) や血清と混合しどの程度で飽和するか検討した。

0.25mg/ml の ICG を 20 μ l と 1%~40% (W/V) の BSA 溶液 180 μ l を混合し、吸光度比 (805nm /785nm) と蛍光強度 (励起 760nm、蛍光 830nm) をプレートリーダーで測定した。

100 μ l の血清と 1.0~0.001mg/ml の ICG を 1 μ l 混合し、吸光度比 (805nm /785nm) と蛍光強度 (励起 760nm、蛍光 830nm) をプレートリーダーで測定した。

IRDye PEG

Wistar 系ラットと BALB/c マウスの後肢趾間に注入し、*in vivo* イメージングシステム (Xenogen IVIS Lumina) で経時的に注入部位の蛍光強度を計測した。IRDye 800CW PEG の濃度と投与量について条件を検討した。

血中濃度測定

Wistar 系ラットの後肢趾間に 25mg/ml に PBS で溶解した Fluorescein Dextran (70,000MW) を 0.05ml 皮内注射し、頸静脈より注入前、注入 15 分後、30 分後、60 分後、120 分後に 0.05ml ずつ採血を行った。採血した検体を室温で 1 時間以上静置した後に、4 で 1000g で 30 分間遠心し血清を分離した。分離した血清を蛍光プレートリーダーにて励起 494nm で 521nm の蛍光強度を測定した。

上記と同様にして、注入後に注入部位をマッサージした場合の血清蛍光強度を注入前、注入 15 分後、30 分後 60 分後に測定した。

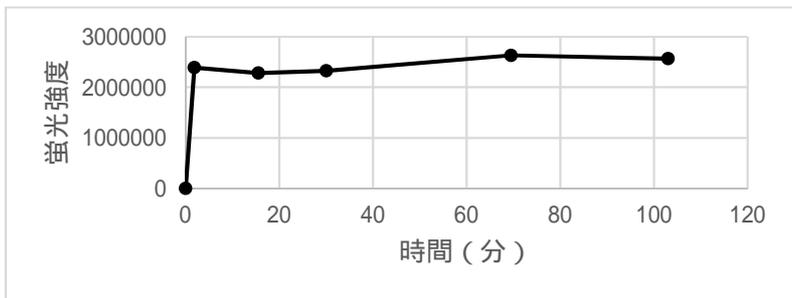
4. 研究成果

蛍光物質の検討 (*in vivo* イメージング)

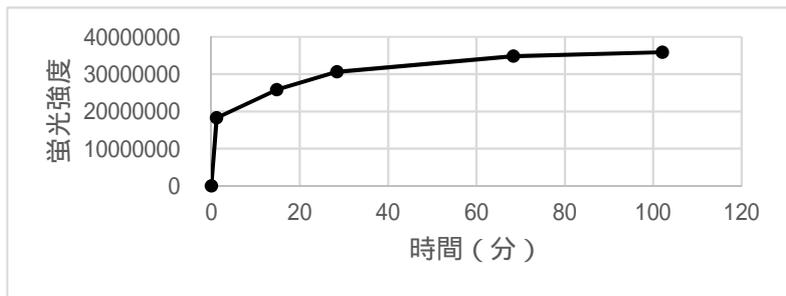
Fluorescent Dextran

0.025mg/ml の Fluorescent Dextran を 10 μ l 投与した場合の経時的变化を下図に示す (0

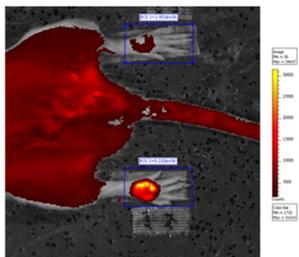
分は投与前)



0.25mg/ml の Fluorescent Dextran を 50 μ l 投与した場合の経時的变化を下図に示す (0分は投与前)。高濃度で投与量が多いほど、蛍光強度は経時的に上昇する傾向を示した。

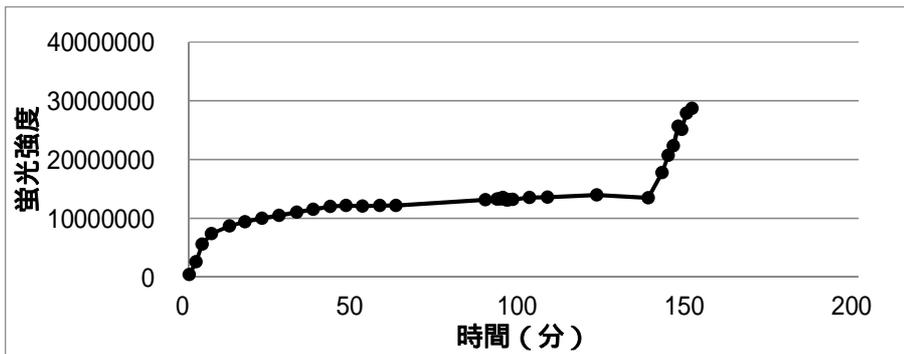


実際の in vivo イメージングの画像を下図に示す。毛による自家蛍光が強い事が分かった。

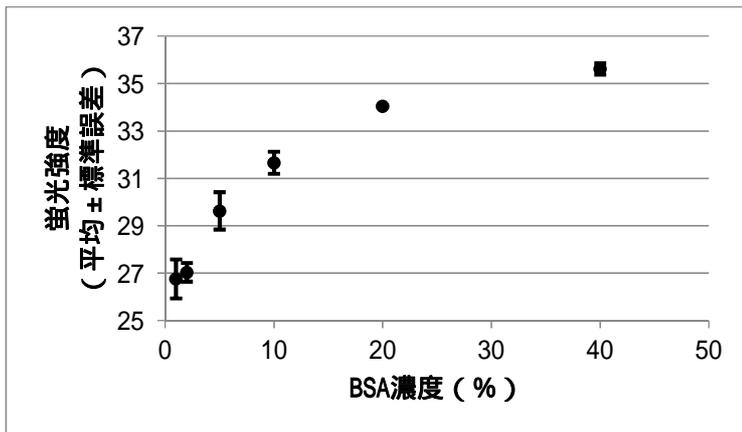
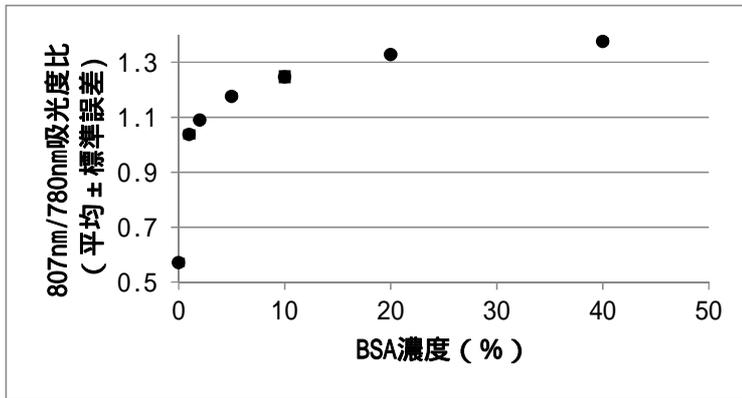


ICG

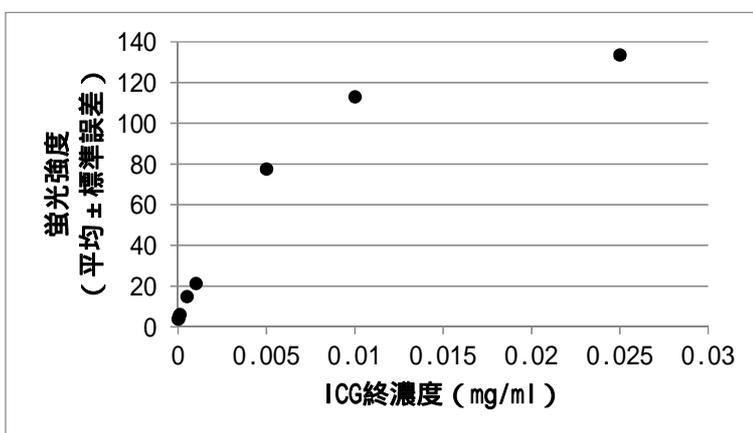
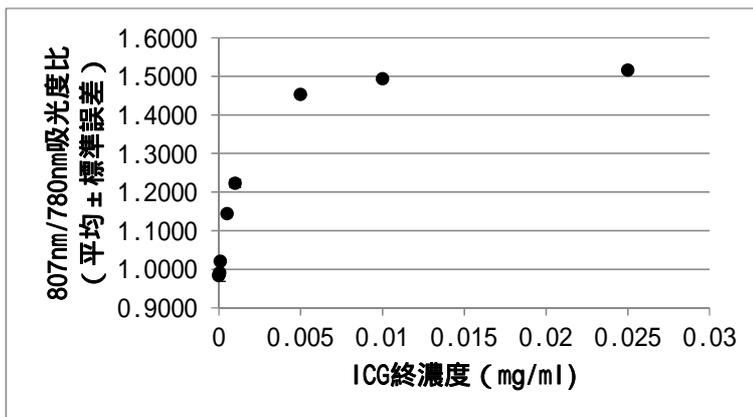
in vivo イメージングシステムで計測した、ラット後肢に注入した ICG の蛍光強度の経時变化を下図に示す (0分は投与前)。注入後から蛍光強度は経時的に上昇し、注入後2時間以上経過しても蛍光強度はほとんど減衰せず、注入部位をマッサージするとさらに急激に増加した。注入した ICG が体内のリポ蛋白やアルブミンと結合し、蛍光を発する様になり、蛍光強度が経時的に上昇したのと考えられた。



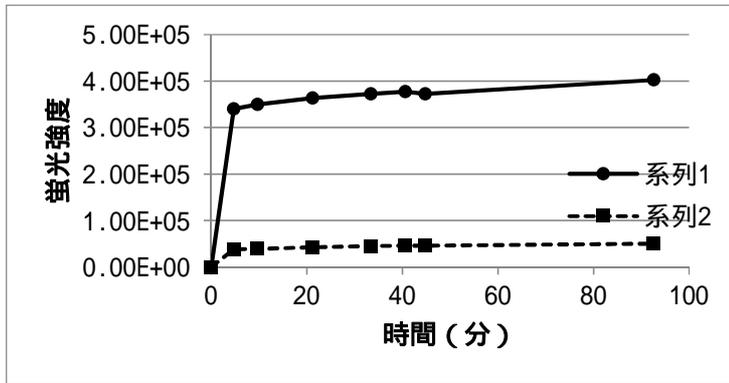
ICG と BSA の混合溶液の吸光度比 (807nm / 780nm) と蛍光強度 (励起 760nm、蛍光 830nm) を下の図に示す。20%を超えるようなかなり濃い濃度の B S A でも飽和しない事が分かった。



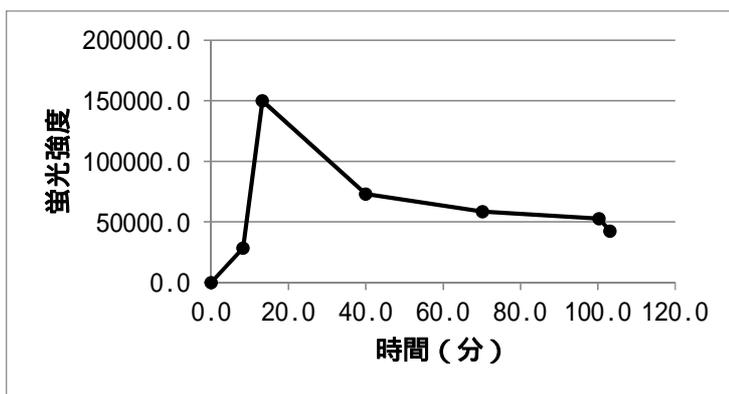
ICG と血清の混合溶液の吸光度比 (807nm / 780nm) と蛍光強度 (励起 760nm、蛍光 830nm) を下の図に示す。ICG 終濃度が 0~0.005 mg/ml の範囲では ICG 濃度と蛍光強度は $y = 14625x + 4.9077$ で $R^2 = 0.99699$ と線形の相関を認めた。



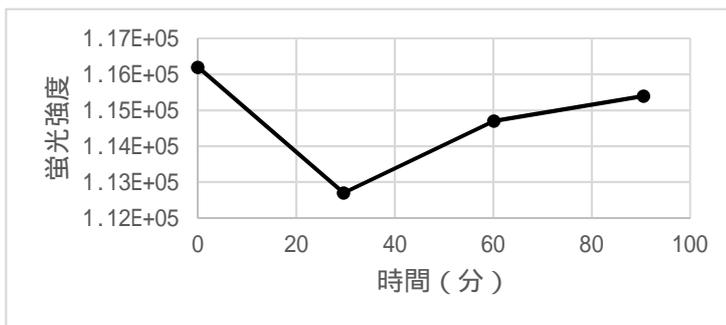
ラット後肢に $1\text{pmol}/\mu\text{l}$ (系列1) と $0.1\text{pmol}/\mu\text{l}$ (系列2) の IRDye PEG を $10\mu\text{l}$ 投与した場合の経時的变化を下図に示す (0分は投与前)。いずれも経時的に漸増し、投与後90分間では減衰しなかった。



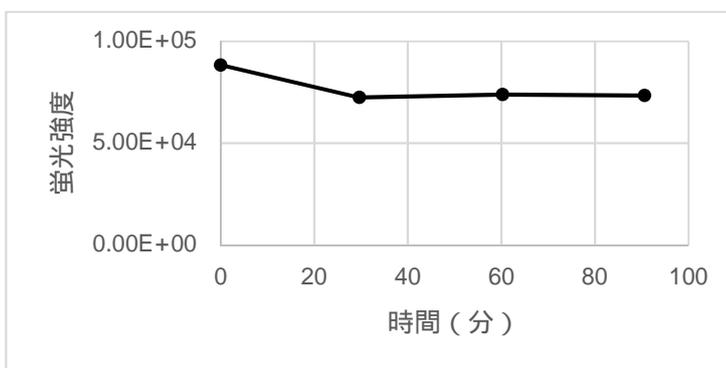
ラット後肢に $1\text{pmol}/\mu\text{l}$ の IRDye PEG を $1\mu\text{l}$ 投与した場合の経時的变化を下図に示す (0分は投与前)。投与後90分で蛍光強度の減衰を認めた。



マウス後肢に $1\text{pmol}/\mu\text{l}$ の IRDye PEG を $1\mu\text{l}$ 投与した場合の経時的变化を下図に示す (0分は投与直後)。



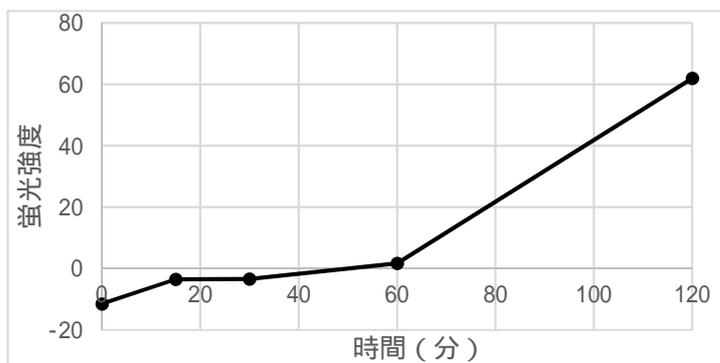
コントロールとして完全に離断したマウス後肢に $1\text{pmol}/\mu\text{l}$ の IRDye PEG を $1\mu\text{l}$ 投与した場合の経時的变化を下図に示す (0分は投与直後)。



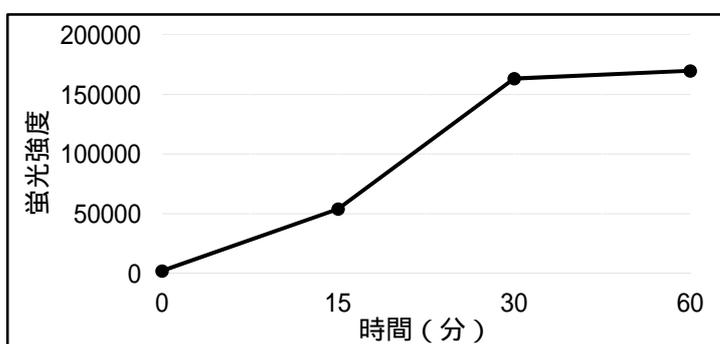
コントロールでも蛍光強度は減衰を認めた。

血中濃度測定

下のグラフに示す如く、蛍光強度は注入後 60 分まではほとんど上昇しなかったが、120 分後には大きく上昇した。



注入後にマッサージをした場合、下のグラフに示す通り、15 分後から蛍光強度は急激に上昇した。



以上の結果より、様々な条件を検討したが in vivo イメージングではリンパ輸送系の機能を検出することが困難であった。血中濃度測定では、リンパ輸送機能を評価できる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

研究協力者氏名：木股敬裕

ローマ字氏名：Kimata Yoshihiro

研究協力者氏名：山田潔

ローマ字氏名：Yamada Kiyoshi