

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2006~2008

課題番号:18500356

研究課題名(和文) リンパ管壁における水溶性物質移動に関する研究

研究課題名(英文) Hydrophilic substance transport via lymphatic wall.

研究代表者

小野伸幸 (ONO NOBUYUKI)

長野工業高等専門学校・電子制御工学科・教授

研究者番号:60214186

研究成果の概要:

今回リンパ管壁を介する水溶性物質の移動において、水溶性物質の分子量依存性と水溶性物質の移動に対するリンパ管内皮細胞の影響を中心に調査および研究を行った。その結果、リンパ管壁を介する水溶性物質の移動には分子量依存性があり、さらにリンパ管内腔に TNF- $\alpha$  あるいは Y-27632 を作用させると透過する分子量サイズは増加した。これらの現象は、リンパ管内皮細胞の形態的あるいは機能的な変化が要因である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,300,000	0	1,300,000
19年度	1,600,000	480,000	2,080,000
20年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	690,000	4,290,000

研究分野:

科研費の分科・細目:人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード:リンパ, リンパ循環, 水溶性物質, 透過性

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ循環系は、毛細血管床や細静脈から漏出する血漿タンパク質や体液の回収路として機能するのみならず、高分子タンパクの濃縮や輸送に深く関与することが知られている。さらには、免疫細胞の循環系や腫瘍の転移路として臨床的・病態生理学的に重要な意味を持つ循環系である。

このようなリンパ循環系の一つの役割と

して、高分子タンパクの回収およびそれらを濃縮して輸送する機能が知られている。高分子タンパクが濃縮される現象は、低分子タンパクがリンパ管内腔から外腔に漏出する結果としてもたらされるものであることが予想できるが、これらのメカニズムについては十分に解明されておらず、その挙動は臨床的・病態生理学的な側面から炎症などの疾患と関連して重要な意味を持つものである。

## 2. 研究の目的

前述の背景に示すように、リンパ輸送系においてリンパ管壁を介する水溶性物質の移動は、リンパ輸送における高分子タンパクの濃縮・輸送機能のメカニズムを解明する上で重要な意味を持ち、かつ、炎症等に代表されるリンパ循環の変化を要因とする病態の解明において、臨床的・病態生理学的側面からも重要な課題である。本研究では、リンパ管壁を介する水溶性物質の移動において、その分子量依存性や、移動メカニズムにおけるリンパ管内皮細胞の影響について解明することを目的とする。

以上の目的に対して、本研究では以下の点について調査・研究を実施した。

- (1) リンパ系における水溶性物質の移動様式の解明。特にリンパ管壁を介する水溶性物質の透過性と分子量依存性との関連についての調査。
- (2) リンパ管内皮細胞と水溶性物質透過性の関連についての検討。

## 3. 研究の方法

- (1) リンパ管壁を介する水溶性物質移動の定量的評価法の確立

図1にリンパ管内から漏出する水溶性物質の移動を観察する実験装置の概要を示す。実験にはペントバルビタール-Na (50mg/kg 腹腔内投与)にて麻酔後屠殺したWistar系ラット(7~9週齢, 雄)から摘出した腸骨リンパ節輸送リンパ管(内径~250 $\mu$ m)を用いた。摘出したリンパ管から結合組織等を丁寧に剥離した後、その両端を臓器槽に取付けたガラスピペットに結紮固定してカニューレションした。臓器槽を倒立蛍光顕微鏡のステージ上に固定して標本外腔側はクレス液(37 $^{\circ}$ C, pH7.4, 20ml/min)にて持続的に灌流した。リンパ管内腔は、流入圧6.5cmH<sub>2</sub>O, 流出圧5.5cmH<sub>2</sub>O, 平均内圧6cmH<sub>2</sub>Oにてクレス液を灌流した。

この状態で、分子量332DのNa-FL(1 $\mu$ M), 分子量4400(4kD, 10 $\mu$ M), 12000(12kD, 1 $\mu$ M), 71200(70kD, 1 $\mu$ M)のFITC-dextranを含む灌流液を内腔に灌流投与し、SITカメラにてリンパ管の蛍光輝度を観察しながら、リンパ管内腔の蛍光輝度が一定になるまで蛍光物質を含む灌流液を充填した。その後、平均内圧を維持したままリンパ管の流出側を閉じ、リンパ管内腔の蛍光輝度の時間的変化を測定した。

図2に顕微鏡下で観察されたリンパ管の蛍光画像を示す。蛍光輝度は、SITカメラで撮影された蛍光画像はビデオキャプチャボードを用いてパーソナルコンピュータに取り

込み、ソフトウェアでリンパ管内腔に該当する部分に設けたウインドウ(図2:A)内に存在する各画素の輝度の平均値として求めた。なお、図中に示したウインドウBはバックグラウンドの輝度に変化が無いことを確認するためのウインドウである。

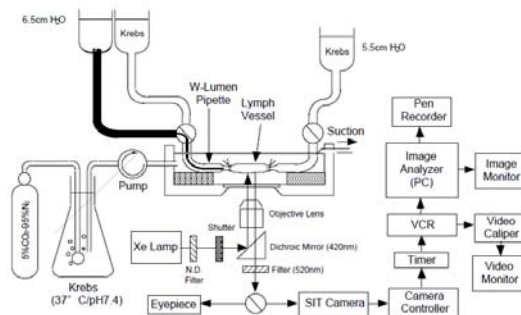


図1 測定方法の概要

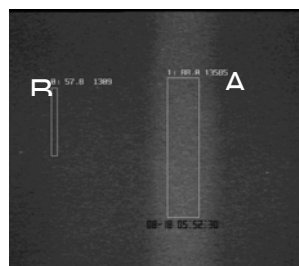


図2 観察されたリンパ管の蛍光画像 (A:測定用ウインドウ B:バックグラウンド確認用ウインドウ)

測定はリンパ管内腔の蛍光輝度の変化がほぼ一定になるまでおよそ灌流停止後から20分行った。この実験系では、充填終了時の濃度を100%とすると、内腔から外腔に水溶性物質の漏出が起こる場合には内腔の濃度は指数関数的に減少し、パイペット系に残留する高濃度の蛍光物質がリンパ管内への流入する流入量とリンパ管の内腔から外腔への漏出量が平衡した時点でリンパ管内部の蛍光色素濃度は一定となる。一方で、リンパ管壁からの漏出がない場合には、リンパ管内の蛍光色素の濃度は一定となる。リンパ管内の蛍光物質の濃度は蛍光輝度から求め、実際にリンパ管内腔から外腔に漏出する量(Net-Flux)は、充填終了直後の輝度(濃度: $C_0$ )と5分後に観察された輝度(濃度: $C_5$ )および、リンパ管の内径dから単位壁周長あたりの透過量とし、Net-Flux(5min)を $(C_0 - C_5) / \pi d$  ( $\mu$ M/ $\mu$ m)と定義して評価した。なお、リンパ管内径はカメラ画像から測定し、かつ、自発性収縮にともなう内径変化を考慮して拡張期の内径を代表値とした。さらに、水溶性物質の移動における内圧の影響を調べるため、平均内圧を4cmH<sub>2</sub>Oおよび8cmH<sub>2</sub>Oの条件

でも実験を行った。また、蛍光輝度と蛍光物質の濃度の関係についてはあらかじめ校正を行い、直線的な関係にあることを確認した。さらに、蛍光物質の退色についても電磁シャッターを用いて照射時間を制限し、実験時間である 20 分間に蛍光物質の退色現象がほとんど見られないことを確認した。

(2) TNF- $\alpha$ , Y-27632 および内皮剥離処置による水溶性物質透過性の変化に関する実験

腫瘍壊死因子として発見された TNF- $\alpha$  は、リンパ管における物質透過性を亢進させる作用があるとされている。また Rho 結合キナーゼ拮抗剤の Y-27632 はリンパ管内皮細胞に対して F-actin の生成を阻害する。これらリンパ管内皮細胞に作用する脈管作動物質に対するリンパ管壁の水溶性物質透過性の変化ならびに、内皮細胞を剥離した状態での影響について実験を行った。

前記 (1) の実験方法において標本の安定時間を経た後、TNF- $\alpha$  (0.625  $\mu$ g/ml) および Y-27632 (10<sup>-5</sup>M) をそれぞれ含む灌流液を標本内腔に投与し、TNF- $\alpha$  においては 90 分の処置を行った後 30 分間灌流液で洗浄、Y-27632 では 30 分の処置後 15 分洗浄し、12kD および 70kD の FITC-dextran を内腔に充填して同様の実験を行った。

内皮剥離には trypsin(100 unit/ml) を用いた。Trypsin を含む灌流液を内腔に投与し、10 分処置後に 12kD および 77kD の FITC-dextran を内腔に充填して同様の実験を行った。なお、trypsin 処置による内皮剥離の状態は、内皮細胞の抗体免疫染色により確認した。

(3) TNF- $\alpha$  および Y-27632 によるリンパ管内皮細胞に与える影響の検討

実験にはラット胸管より摘出・培養したリンパ管内皮細胞を用いた。TNF- $\alpha$  および Y-27632 を含む培養液で培養細胞を 24 時間処置した後、抗体免疫染色で内皮細胞内の F-actin を染色し、蛍光顕微鏡でその配向を観察した。

4. 研究成果

(1) リンパ管壁を介する水溶性物質の移動

図 3 に今回開発した実験系で観察されたリンパ管の蛍光画像の時間的変化の典型例を示す。図 3(A および B) は、安定時の可視光画像である。図 3(A0, B0) は内腔にそれぞれ Na-FL および 70kD の FITC-dextran を充填した時点で観察された蛍光画像であり、図 3(A20, B20) は充填完了から 20 分経過した時点で観察された蛍光画像である。充填直後と

20 分後の画像を比較すると、Na-FL では顕著にリンパ管内腔の輝度が低下しているが、70kD の FITC-dextran では輝度の変化がほとんど見られなかった。

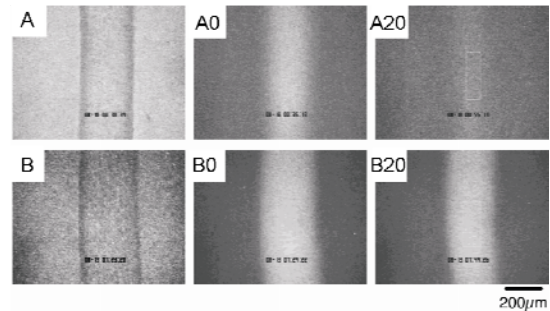


図 3 観察されたリンパ管蛍光画像の時間的变化(A:Na-FL, B:70kD FITC-dextran)

このような蛍光輝度の変化を、各水溶性物質について充填時の蛍光輝度を 100% として時系列的に示した結果を図 4 に示す。

図 4 に示すように、時間経過と共に Na-FL および 4kD の FITC-dextran においては蛍光輝度が顕著に低下するが、12kD および 70kD の FITC-dextran においては蛍光輝度の低下はほとんど見られない。

図 5 に Net-Flux の変化を各水溶性物質について求めた結果を示す。Net-Flux で比較すると Na-FL および 4kD の FITC-dextran の透過量は 12kD および 70kD の FITC-dextran における透過量に対して大きく、Na-FL および 4kD の FITC-dextran はリンパ管壁を介して内腔から外腔に有意に透過するが、12kD および 70kD の FITC-dextran はほとんど透過しないと考えられた。また、リンパ管内圧は水溶性物質の分子量に依存せず、その透過量に対して有意に影響しなかった。

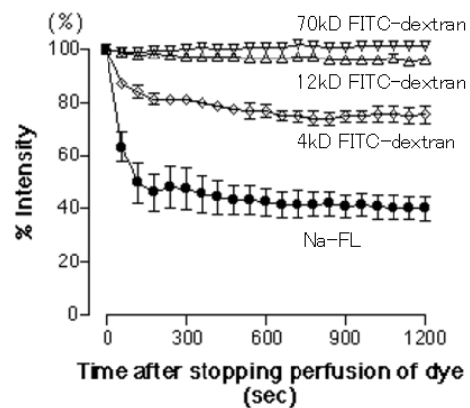


図 4 リンパ管内の蛍光輝度の時系列的変化 (n=4)

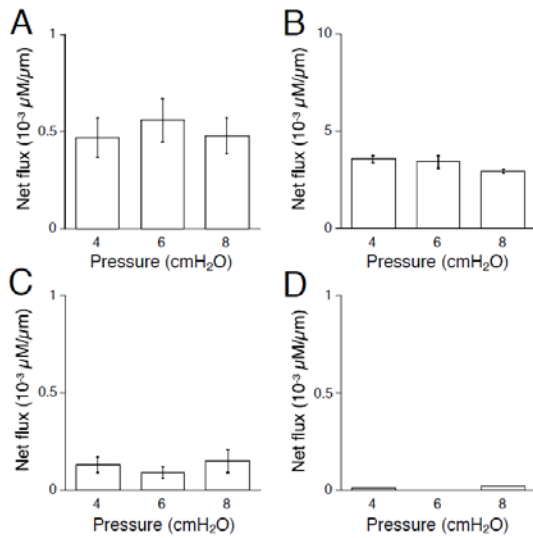


図 5 各水溶性物質およびリンパ管内圧に対する Net-Flux の変化 (n=4) (A: Na-FL B: 4kD FITC-dextran C: 12kD FITC-dextran D: 70kD FITC-dextran)

以上の結果より、本研究で開発したリンパ管からの水溶性物質の移動の定量的な評価法は、リンパ管における水溶性物質の透過量に対する分子量依存性を評価することが可能であり、およそ 4kD 以上の分子量を有する水溶性物質はリンパ管壁を介して内腔から外腔にほとんど透過しないことが確認された。さらに透過量を制御する因子としてリンパ管内圧は関係しないことが示された。

(2) TNF- $\alpha$ , Y-27632 および内皮剥離によるリンパ管水溶性物質透過性の変化

実験方法 (2) に基づき、TNF- $\alpha$  および Y-27632 の水溶性物質透過性への影響を調べた結果を図 6 および 7 に示す。

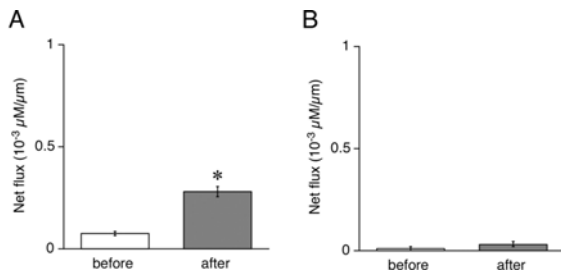


図 6 TNF- $\alpha$  による水溶性物質透過性の変化 (A: 12kD B: 70kD FITC-dextran) (n=4)

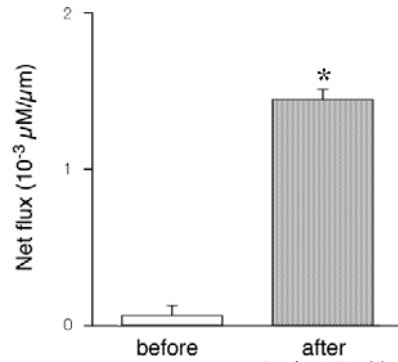


図 7 Y-27632 による水溶性物質透過性の変化 (12kD, n=4)

図 6 に示すように、TNF- $\alpha$  による処置前 (before) および処置後 (after) において、分子量 12kD の FITC-dextran の Net-Flux は処置後に有意に上昇した。一方で 70kD の FITC-dextran では処置前後に有意な差は見られなかった。同様に図 7 に示す Y-27632 の処置前後における Net-Flux の変化においては、TNF- $\alpha$  と同様に 12kD の FITC-dextran の Net-Flux は処置後において有意に増加した。また、図示はしていないが、Y-27632 における 70kD の FITC-dextran においては処置前後における Net-Flux に有意な差は見られなかった。

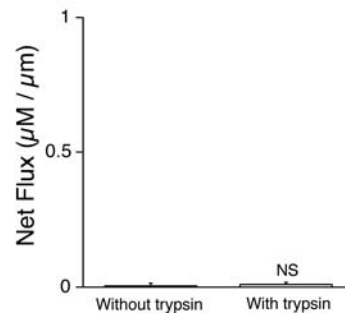


図 8 trypsin 処置による水溶性物質の透過性の変化 (77kD, n=4)

図 8 に trypsin 処置による内皮剥離前後での 77kD FITC-dextran の Net-Flux の変化を示す。内皮を剥離したにも関わらず、剥離前後における透過性の変化にほとんど差は見られなかった。なお 12kD の FITC-dextran では Net-Flux が上昇する傾向が得られた。

以上の結果より、TNF- $\alpha$  および Y-27632 の処置により、ほとんど透過しなかった 12kD 程度の分子量を持つ水溶性物質が有意に透過するようになり、これらの結果はリンパ管壁における水溶性物質の透過調節機構において内皮細胞が関与している可能性を示した。一方で、70kD の FITC-dextran の透過性はいずれの物質においても有意に上昇しな

かった。さらに内皮細胞を剥離しても 70kD 程度の分子量の水溶性物質はリンパ管壁をほとんど透過しない。これらの結果は、リンパ管壁において 70kD 程度の物質の透過性に対しては内皮細胞に依存することなく、内皮細胞下の基底膜あるいはリンパ管平滑筋マトリクスが水溶性物質の透過に対するバリアとして作用している可能性が示された。

### (3) TNF- $\alpha$ および Y-27632 がリンパ管内皮細胞に与える影響

図9に培養内皮細胞に対して TNF- $\alpha$  および Y-27632 処置を行った前後のリンパ管内皮細胞における F-actin の走行の状態を示す。

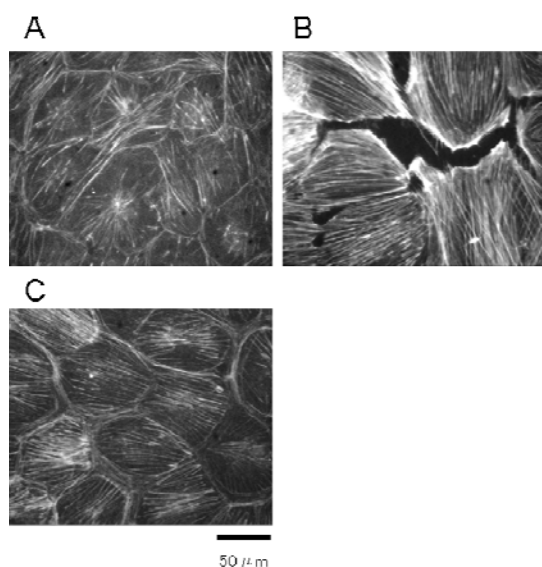


図9 TNF- $\alpha$  および Y-27632 処置前後におけるリンパ管内皮細胞の F-actin の走行変化 (A: Control B: TNF- $\alpha$  処置後, C: Y-27623 処置後)

図9に示すように、TNF- $\alpha$  処置後の F-actin の走行 (B) は、コントロールである (A) と比較して増強し、細胞間隙が開いていることが確認できる。一方 Y-27632 の処置後では F-actin の走行 (C) は減少した。

これらの結果と水溶性物質透過性の関係より、リンパ管内皮細胞の形態の変化がリンパ管における水溶性物質透過性の変化に対する一つの要因である可能性が示された。さらに 70kD 程度の大きな分子量の透過については、内皮細胞以外の組織で抑制されていると考えられたことから、TNF- $\alpha$  および Y-27632 の処置により 12kD の FITC-dextran の透過性が上昇したことは、これら水溶性物質の透過メカニズムにリンパ管内皮細胞の機能や形態の変化が何らかの調節因子として作用しているものと考えられた。

## 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 1 件)

1. Xiangjun Li, Risuke Mizuno, Nobuyuki ONO, Toshio Ohhashi : Glucose and Glucose Transporters Regulate Lymphatic Pump Activity through Activation of the Mitochondrial ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel, The Journal of Physiological Sciences, 査読有, Vol. 58 No.4, 2008, 249-261

[学会発表] (計 3 件)

1. Risuke Mizuno, Nobuyuki Ono, Toshio Ohhashi, Roles of reactive oxygen species (ROS) in the regulation of pump activity of isolated rat lymph vessels, 第 85 回日本生理学会大会, (2008.3), 東京
2. Mizuno, R., Kawai, Y., Hosaka, K., Ikomi, F., Kobayashi, M., Nakayama, J., Ono, N. and Ohhashi, T., A novel preparation of isolated rat lymph nodes for selective collection of the intranodal cells. Cordon Research Conference, (2006, 10), スイス
3. 水野理介, 河合佳子, 保坂佳代子, 伊古美文隆, 小野伸幸, 大橋俊夫, 摘出リンパ節灌流標本からの選択的細胞採取システムの開発. 第 47 回日本脈管学会総会, (2006. 10), 神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野 伸幸 (ONO NOBUYUKI)  
長野工業高等専門学校・電子制御工学科・教授  
研究者番号 : 60214186

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者