

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：15301  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010 ～ 2012  
 課題番号：22591996  
 研究課題名(和文) 過酸化水素法による小動物のリンパ系のマクロ解剖とリンパ管変性と再生のメカニズム  
 研究課題名(英文) Demonstrating the lymphatic system with microinjection during its regeneration process  
 研究代表者  
 木股 敬裕 (KIMATA YOSHIHIRO)  
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
 研究者番号：50392345

研究成果の概要(和文)：過酸化水素水を用いた色素注入法により、ラットリンパ管の走行を明らかにした。また、ラットリンパ浮腫モデルを作成し、その治癒過程を色素注入法と ICG を用いた蛍光リンパ管造影法により観察した。リンパ浮腫の軽快に伴って毛細リンパ管の発達が見られた。組織学的観察において、術後 7 日以降でリンパ管数が増加していることが判明した。リンパ浮腫の治癒過程でリンパ管の新生があることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to elucidate the pathway of lymphatic system during its degeneration and regeneration process in the lymphedema. We first developed a rat experimental model of lymphedema. The recovery process was observed by microinjection with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and a blue ink or by lymphangiography with ICG. Histological examination revealed that the number of lymph vessels significantly increased during the recovery. This research model using is too useful to carry out further studies to elucidate cellular and molecular mechanisms underlying lymphedema.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：形成再建外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：リンパ管 リンパ浮腫 リンパ管再生

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) リンパ浮腫

リンパ浮腫はリンパ郭清を伴う悪性腫瘍手術後、あるいは特発性に発症し、慢性的に

組織の浮腫、リンパ液の滞留をおこすものである。これにより、日常生活動作が不自由になるだけでなく、感染を起こしやすい状態となり、しばしば患肢に蜂窩織炎を繰り返し、

さらに症状は悪化していく。リンパ節郭清を伴う乳がん術後患者の 20~40%に発症し、当邦では、罹患者数は約 10~15 万と推定されている。また、途上国においてはフィラリア症によるリンパ浮腫が問題となっており、現在感染者数は 4000 万人以上にのぼる (Addiss DG ら *Filaria J* 2007)。

現在、リンパ浮腫の治療の基本はマッサージや弾力包帯、弾性ストッキングによる圧迫などの理学療法である。手術治療としてリンパ管静脈吻合術やリンパ組織移植などが行われているが、いずれもエビデンスのある手術方法とはなっていない。また、同手術、同治療を行った患者間でも症状の出現の有無、重症度はさまざまであり、リンパ浮腫発症のメカニズムはいまだ解明されていない。研究協力者である須網の研究により、形態学的には集合管から真皮の毛細リンパ管への逆流現象がみられ、弁の機能不全が示唆される。さらに、浅リンパ管同士、あるいは浅深リンパ管間でのバイパス形成がみられることがわかっている。(Suami ら *Plast. Reconstr. Surg.* 2007)

## (2) リンパ管解剖

組織学においてはリンパ管内皮を特異的に標識するマーカー (LYVE-1 抗体等) の出現により、免疫組織化学染色によるリンパ管の同定が可能になり、腫瘍学におけるリンパ行性転移とリンパ管再生の励起物質との関連性の研究がはじまっている。その一方で形成外科医が実際に手術の支柱とするリンパ系のマクロ解剖学についての情報は現行の解剖学書においても非常に乏しい。

屍体を用いて、水銀注入法により描出する手法などが用いられてきたが (Sappey ら *Adrien Delahaye (Paris) 1874*)、まだ不十分な状態であった。研究協力者の須網は新しいリンパ管研究手法 (過酸化水素法) を開発し、ヒト屍体をもちいて集合リンパ管に直接造影剤を注入し、リンパ浮腫の成因に大きな役割を持つ集合リンパ管の描出に成功している。(Suami ら *Plast. Reconstr. Surg.* 2005)

## (3) リンパ浮腫動物モデル

エビデンスのある治療法のために、多くの研究者たちが後天性リンパ浮腫のモデル実験系を作ろうと試みてきたが、恒久的なリンパ浮腫モデルを作るのは困難である (Catarina ら *Cancer Res.* 2008)。実験的にリンパ組織、皮膚皮下組織の除去手術と放射線照射を行ったラットにおいては数ヶ月の浮腫期間を持続することが可能である (Mitchel A ら *Plast. Reconstr. Surg.* 1990)。一方、実験的に作られたリンパ浮腫モデルは必ず治癒することから、治癒過程の肉眼的、組織学的な観察により、リンパ管再生のメカニズムの解明に近づけると、我々のグループは着想した。

## 2. 研究の目的

(1) ラット下肢のリンパ系のマクロ解剖を解明する。リンパ節の位置、浅、深リンパ集合体の走行などを明らかにする。

(2) ラットのリンパ浮腫モデルを作成する。

(3) ラットのリンパ浮腫モデルの治癒過程を、形態学的手法を用いて観察し、リンパ管変性と再生のメカニズムを解明する。

(4) ラットのリンパ浮腫モデルを用い、実際にリンパ浮腫に対する手術治療 (リンパ管静脈吻合術や血管柄つきのリンパ組織移植術) を行い、エビデンスのある外科的手術手技の確立を目指す。将来的には、ヒトに応用することを念頭に置き、リンパ浮腫の治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

本実験ではいずれも 250~300 g の Wistar ラット (雄) を用いた。

### (1) ラット下肢のリンパ系のマクロ解剖

ラットの下肢の趾尖に色素を混ぜた 6% 過酸化水素水を注入する (図 1-a)。注入された過酸化水素水は組織中の酵素と反応し、酸素の気泡を発生させる。足背から中枢に向かって注意深く皮膚を切開し、皮下組織の剥離を行うと、酸素気泡により膨らんだリンパ管構造が見出さ



れる (図 1-b)。リンパ管を同定後、プラーで引き伸ばしたガラス (先端径 0.1mm 程度) を用いて色素を徒手的に注入する。リンパ管に注入された染色液は容易に中枢へ移行し、単径部や腹腔内リンパ節まで染色される。(図 1-c) 下肢のリンパ集合管の走行を観察し、走行分布の記録を行った。

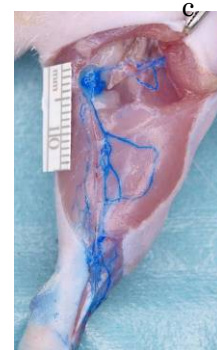


図 1

(2) ラットのリンパ浮腫モデルの作成  
計画書では単径部でリンパ集合体を含む皮膚、皮下組織を 5mm 幅で全周で除去することにより、リンパ浮腫モデルを作成する予定であったが、この方法では術後の浮腫の強さや治癒の速度が一定でないため、より安定したモデルとして、足切断モデルを作成した。

大腿部を完全切断する。大腿骨はほぼ中央

で、動静脈は大腿動静脈を単径靭帯の5 mm末梢で切断する。また、単径リンパ節は中枢に含むようにする。完全に切断した後に、同部位に再接着を行う。骨固定を行い、筋肉は疎に縫合し、動静脈吻合を行う。最後に皮膚を縫合する。浮腫の評価はラット足関節、足背の周径で行った。

(3) ラットのリンパ浮腫モデルの治癒過程の観察

- ① 肉眼的観察：上記(1)の色素注入法と ICG を用いた蛍光リンパ管造影法（以降 FLG-ICG 法）での肉眼的観察：6 肢の足切断再接着術後 1～6 日、10、14 日のリンパ管の形態を観察・撮影記録した。
- ② 組織学的観察：正常ラット、リンパ浮腫作成術後 7 日、14 日のラットそれぞれ 3 匹において大腿全体をホルマリン固定、脱灰し、膝関節部における水平断の組織標本を作成した。これに podoplanin による免疫組織化学染色を行い、下肢全体に存在するリンパ管の数、形態の変化を観察した。

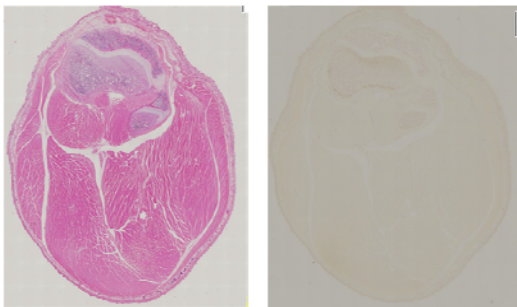


図 2 ラット下肢断面 左：HE 右：podoplanin による免疫染色

(4) ラットリンパ浮腫の外科的治療法の模索

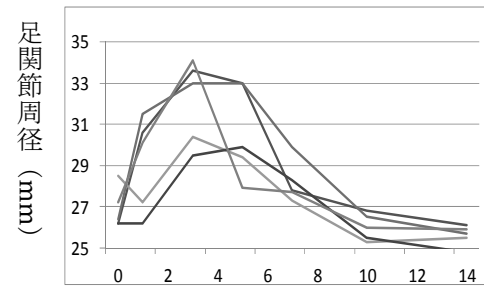
当初の計画では現在広く臨床で行われているリンパ管静脈吻合術を行い、その効果を比較検討する予定であったが、ラット末梢での同手術は極めて困難であることが判明したため、血管柄つきリンパ節移植術、リンパ管腹腔内シャント作成術を行った。しかしながら本実験におけるリンパ浮腫モデルの治癒期間が短く、手術・非手術例での比較が困難であった。そのため、当初の計画にはなかったが、恒久的リンパ浮腫の作成を試みている。

#### 4. 研究成果

(1) ラット下肢のリンパ系のマクロ解剖 趾尖皮下のリンパ管は足背に集まり、外側伏在静脈、坐骨静脈に沿って上行し、膝窩リンパ節を経て腹側へ向かい、大腿動静脈に沿

て上行することが判明した。足内側からのリンパ管は内側の伏在静脈、大腿動静脈に沿って上行し、両者は合流し、主に単径靭帯をくぐり、腹腔内のリンパ節へ流入していた。また、大腿動静脈に沿って上行した後に浅下腹壁動静脈と並走し、腹壁皮下へ向かい、単径リンパ節に流入する経路があることも明らかになった。ラットのリンパ系の解剖が明らかになったことで、リンパ浮腫に関連する研究のみならず、癌におけるリンパ節転移に関する、動物を用いた基礎研究においても応用が期待される。

(2) ラットのリンパ浮腫モデルの作成 浮腫は術後 3 日でピークとなり、術後 14 日



術後日数 (日) 図 3

でほぼ消退することが分かった。(図 2)

(3) ①肉眼的観察：術後 2 日目から下肢全体にび慢性にリンパ液のリンパ管外への漏出が観察され始めた。4 日目以降で皮下の毛細リンパ管が描出され始めた。5 日目以降に切断部を超えて中枢のリンパ管へ流入する様子が観察され始め、同時にび慢性の漏出は減少していった。(図 4) これは、上記(2)

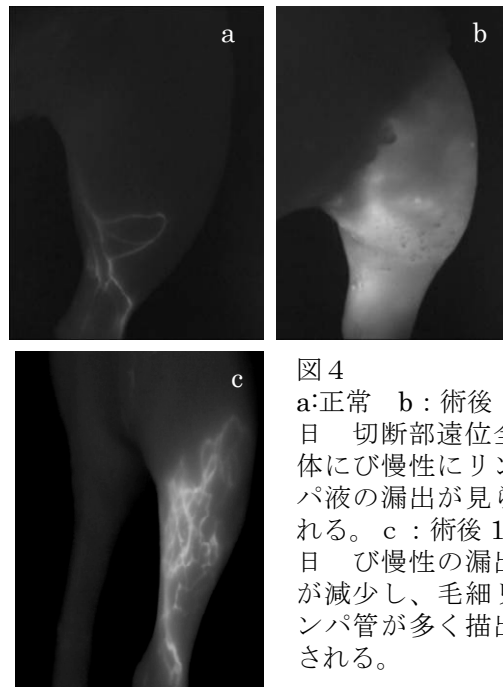


図 4 a:正常 b:術後 3 日 切断部遠位全体にび慢性にリンパ液の漏出が見られる。c:術後 14 日 び慢性の漏出が減少し、毛細リンパ管が多く描出される。

の結果と併せ、術後 1 から 2 日では既存のリンパ系ルートが途絶したことによりリンパ

管外の組織内にび慢性に漏出し、術後4日目以降で毛細リンパ管が機能し始めることにより次第にリンパ浮腫が軽快していると考えられる。この毛細リンパ管が、既存のものであるが、あるいは術後の何らかの因子により新生されるのかを確かめるために、次項の組織学的観察で確認を行った。

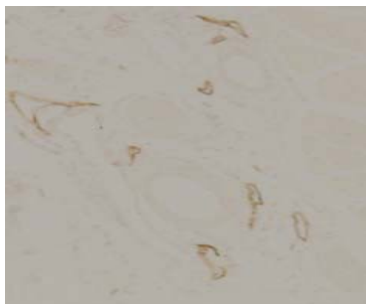


図5

②組織学的観察：リンパ管数の平均値は正常ラットで318、術後7日のものは523、術後14日のものは581で術後にリンパ管数が増加することが明らかとなった。そのリンパ管の形態に関しては術後の方が管腔面積が大きいものが多かった。(図5) 現在統計処理を行っているが、この結果によりリンパ浮腫となった後に毛細リンパ管が新生していることが示唆された。

#### 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 10件)

① Suami H, Chang DW, Matsumoto K, Kimata Y. Demonstrating the Lymphatic System in Rats with Microinjection, *The Anatomical Record*, 査読有、vol.294, 2011, 1566–1573, doi:10.1002/ar.21446

② Suami H, Chang DW, Yamada K, Kimata Y. Use of Indocyanin Green Fluorescent Lymphography for Evaluating Dynamic Lymphatic status, *Plastic and Reconstructive Surgery* 査読有、vol.127, 2011, 74e-76e, doi: 10.1097/PRS.0b013e3182063639.

[学会発表] (計 12件)

① 山田潔、岡山大学におけるリンパ浮腫の研究と治療、第3回光生病院リンパ浮腫セミナー、2013年3月17日、岡山

① 松本久美子、木股敬裕、顕微鏡下リンパ管注入法によるラット集合リンパ管のマクロ解剖解析、第34回日本リンパ学会総会、2010年6月25日、東京

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

木股 敬裕 (KIMATA YOSHIHIRO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：50392345

##### (2) 研究分担者

山田 潔 (YAMADA KIYOSHI)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号：10319965

小阪 淳 (KOSAKA JUN)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：40243216

##### (3) 研究協力者

須網 博夫 (SUAMI HIROO)  
M. D. Anderson Cancer Center,  
Houston, Texas

松本 久美子 (MATSUMOTO KUMIKO)  
岡山大学・岡山大学病院・医員  
研究者番号：20616049