

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20310

研究課題名(和文)ラットを用いたリンパ管静脈吻合動物モデルの作成

研究課題名(英文)A Novel Lymphaticovenular Anastomosis Rat Model

研究代表者

小野田 聡 (Satoshi, Onoda)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00423301

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)：我々はラットの腰部のリンパ管及び腸腰静脈を用いた新しいLVAの実験モデルの作成を行い、次にこのモデルを用いて術後開存率の測定及び組織学検討を行った。この結果、実際のLVAにおいて長期間開存を保つ理想的な吻合法について考察した。ウイスターラット20匹を用いてLVAを行った。吻合部の開存率は吻合直後・1週間後・1ヶ月後の時点でそれぞれ100%・70%・65%であった。今回の検討から、内皮下組織の内腔への露出を防ぐことが、長期間の開存を保つために最も重要な要素であると考えられた。また、今回の瘤様構造の部分が直接の閉塞の要因とならなかった様に、過度に密な吻合は必要ないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The experimental LVA model was created using lumbar lymph ducts and iliolumbar veins of Wistar rats. We performed LVA under a microscope and reviewed the details of postoperative histological changes using optical and electron microscopy. In addition, electron microscopy and histology were used for detailed examination of the area in the vicinity of the anastomotic region in cases with patency and obstruction. The patency rate immediately after LVA, one week and one month after surgery was 100%, 70% and 65% respectively. In cases with patency, there was no notable transformation of the endothelial cells, which formed a smooth layer. In contrast, in obstruction cases, the corresponding region of the endothelium became irregular in structure. Vessel obstruction after LVA may be associated with irregular arrangement of the endothelial layer, leading to the exposure of subendothelial tissues and platelet formation.

研究分野：形成再建外科学

キーワード：リンパ管静脈吻合術 動物実験モデル 組織学的変化 開存 閉塞

### 1. 研究開始当初の背景

リンパ浮腫の治療法は保存的治療と外科的治療に大別される。外科的治療法として、過去には高度進行例を対象として脂肪吸引術等の容量減少手術が行われてきた。近年、1mm以下の血管やリンパ管を顕微鏡下に吻合するスーパーマイクロサージャリー技術の発達に伴い、リンパ管静脈吻合術 (Lymphaticovenular anastomosis: 以下 LVA) や血管柄付きリンパ節移植術が普及してきた。このうち LVA は比較的安全に、手術侵襲が少なく、また局所麻酔下でも施行可能なことから、現在多くの施設でリンパ浮腫の外科的治療の第 1 選択の術式となっている。

LVA はリンパ流の鬱滞によってリンパ管内に貯留したリンパ液を静脈に還流するリンパ流改善術であるが、実際の臨床現場で、保存的治療や体重変化等の影響を除外した純粋な手術結果の評価は困難である。このため、術後評価は患肢の周計変化や浮腫症状の変化を通じて間接的に行われている。(図 1) また、リンパ管と静脈という組織学的に異なる構造物を吻合するが、術後の経時的な開存率、開存期間、閉塞要因等の詳細に関しては不明な部分が多い。臨床の現場においては、過去に LVA を行った部位を再度開創する機会はほとんど無く、加えてリンパ流改善手術という観点から吻合部を



図 1: 右上肢リンパ浮腫に対する LVA

採取して組織学的に検討することは出来ない。また、過去に動物実験モデルを用いたリンパ系解剖に関する報告や実験動物を用いた微小血管吻合モデルの報告は数多くあるが、LVA に関する動物実験モデルの報告はほとんど無い。

### 2. 研究の目的

これらの現状を踏まえ、我々は LVA に関する詳細な検討を行うためには、人体における LVA と近似した実験モデルの作成及び同モデルを用いた術後変化の組織学的検討が必須であるとの考えに至った。

今回、我々はラットの腹腔内リンパ管及び静脈を用いた簡便な LVA モデルを開発し (参考文献 ) 同モデルを用いて吻合部の開存率及び、閉塞要因の組織学的検討を行い (参考文献 ) LVA において長期間吻合部の開存を維持するための要点について考察した。

### 3. 研究の方法

ラットを用いた LVA 実験モデルの作成  
LVA 動物実験モデルの作成にあたり、取り扱いが容易で汎用性が高く、また微小血管吻合のトレーニングモデルとして広く用いられているラットを用いることとした。吻合に用いるリンパ管として、開胸等の侵襲が大きい手術手技を必要とせず、比較的

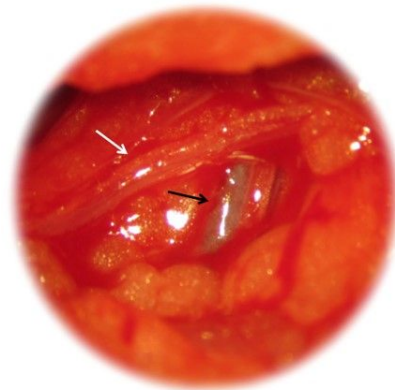


図 2: ラット腰部リンパ管及び腸腰静脈

大きい径のリンパ管が得られる部位として

腰部リンパ管を選択した。また、吻合する静脈として腰部リンパ管の近傍に存在する腸腰静脈を選択した。

(図2)実験に用いるラットは、450g~500g程度の比較的大きな個体を選択した。10匹の雄ウィスターラットを用いて、開腹後に左右の腰部のリンパ管及び腸腰静脈を同定し、その直径を測定した。また、実際にこ

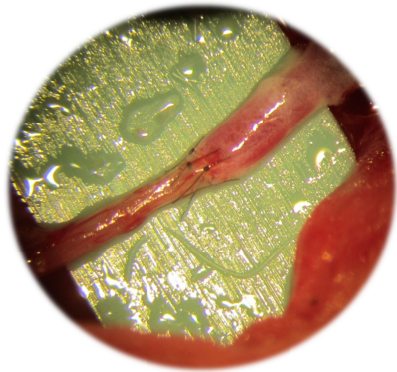


図3: ラットにおけるLVA

れらを用いてLVAを行った。(図3)比較対象として、過去臨床においてリンパ管静脈吻合を行った8症例・28本のリンパ管及び静脈に関して、後方視的にその直径を測定した。

ラット腰部リンパ管及び腸腰静脈20本の直径の平均はそれぞれ0.61mm、0.81mmであった。一方、実際の臨床症例におけるリンパ管及び静脈の直径の平均はそれぞれ0.58mm、0.76mmであった。また、左右のLVAを施行するのに要した時間の平均は42.2分であった。行ったLVAに関しては、吻合後全例において開存を確認可能であった。加えて、今回の手術手技においてラットに致死的な合併症は生じなかった。統計学的に用いたラットの「リンパ管及び静脈の直径と過去にLVAを施行したリンパ管及び静脈の直径に有意差を認めなかった。これらの結果から、今回作成したラットLVAモデルは、リンパ管及び静脈の直径、その性質、吻合

後のリンパ流等が人体におけLVAと類似しており、LVAの動物実験モデルとして有用であると考えられた。

#### LVA 術後変化の組織学的検討

続いて作成したラットLVAモデルを用いて、組織学的検討を行った。雄のウィスターラット20匹を用いて、ラットの腰部リンパ管及び腸腰静脈を用いてLVAを行った。全ての実験手技は、過去に微小血管吻合術及びリンパ管静脈吻合術の経験がそれぞれ100例以上ある著者が術者となって行われた。

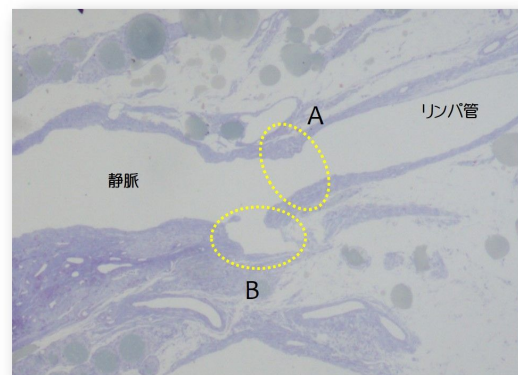
ラット腰部リンパ管及び腸腰静脈20本の直径の平均はそれぞれ0.61mm、0.81mmであった。吻合部の開存率は吻合直後・1週間後・1ヶ月後の時点でそれぞれ100%・70%・65%であった。一方、コントロールケースとして吻合を行ったリンパ管及び静脈の開存率はそれぞれ術後1ヶ月の時点で100%であった。

(組織学的検討)

#### LVA 開存例

##### リンパ管及び静脈の断面像

静脈は3層構造を保持しており、数層の内皮細胞層を覆うようにして内弾性板が認められた。中膜は非常に薄く、平滑筋層の外側に外膜が認められた。また、血管の栄養血管も確認された。リンパ管に関しては、1層の内皮細胞を数層の平滑筋が取り囲む構



造となっていた。各層は静脈と比較して非

図4: 開存例におけるリンパ管静脈吻合

常に薄い構造であった。リンパ管内の弁構造も確認された。静脈・リンパ管とも内腔に血球細胞を認めず、通常解剖構造を保っていた。

）リンパ管静脈吻合部

吻合部付近では癒痕様の組織によって壁の肥厚が確認された。加えて、一方の壁に仮性瘤様の隆起が形成されていた。(図：4) 吻合部付近を電子顕微鏡で観察すると、内腔に平行に弾性繊維の増生と膠原繊維の厚い層構造が確認された。未分化な血管が再生機構の活性化を示唆していた。一方、内膜自体の変性はほとんど無く、吻合部を含めてリンパ管から静脈に向けてスムーズな移行が見られた。

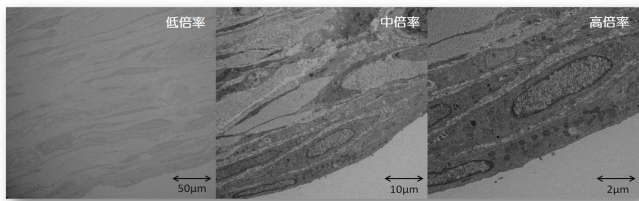


図 5: リンパ管静脈移行部の電子顕微鏡像

(図：5)仮性瘤様の部分では、皮下組織は内腔に向かってやや直行するような構造となっているが、内膜レベルでは他の吻合部にリンパ管から静脈に向けてスムーズな移行が見られた。

**LVA 閉塞例**

）リンパ管及び静脈の断面像

静脈の内皮細胞及び静脈の内弾性板は縮小

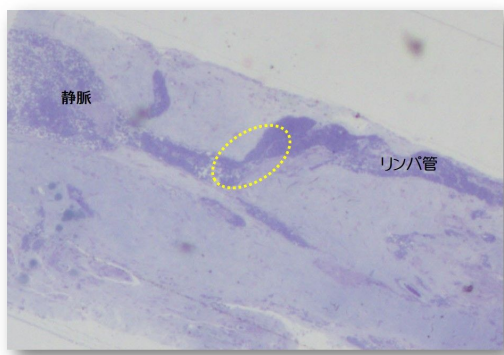


図 6: 閉塞例におけるリンパ管静脈吻合

し、静脈の内腔は狭小化していた。静脈壁内に空泡を認め、また、開存例では静脈壁内に認められた栄養血管も途絶しており、血管周辺組織との剥離が認められた。リンパ管も部分的に内膜の連続性は途絶えており、内腔は認めるものの血球細胞が充満し閉塞していた。

）リンパ管静脈吻合部

リンパ管と静脈の吻合部付近で内腔は狭小化していた。吻合部を含めリンパ管及び静脈の内腔は血球細胞で充満していた。(図：6) 吻合部付近を電子顕微鏡で確認すると、内膜の移行が不整で内膜下の組織が内腔に

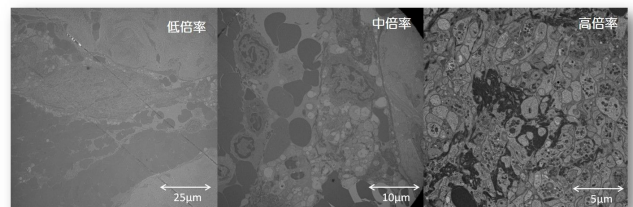


図 7: リンパ管静脈移行部の電子顕微鏡像

露出している部分に一致して、血小板の凝集が見られた。(図：7)

血小板周囲には変形した赤血球が集属し、血管内腔に充満していた。一方、吻合付近でもリンパ管から静脈への内膜移行のスムーズな部分においては、変形した赤血球は認めるものの、血小板の凝集は認めなかった。(図：7)

4. 研究成果

光嶋らは、電子顕微鏡を用いたリンパ浮腫患者のリンパ管構造の組織学的変化に関する検討について報告している。また、LVA術後の開存率の評価としては、インドシアニングリーン蛍光造影法(以下: ICG)を用いて体表から観察を行っている報告が散見される。一方、動物実験を含めても狩猟し得た範囲内でLVA術後の組織学的変化に関する報告は無く、今回の検討が初めての報告

であると考えられる。

(術後の吻合閉塞のメカニズム)

今回の検討では、コントロールケースはいずれも長期間の開存を保っており、閉塞の原因は単純な技術的要因ではなく、その他の要因であると考えられた。Pachett 及び Gloviczki らは、犬のリンパ浮腫モデルを用いた LVA 術後の経時的な開存率の検討を行っており、この報告によるといずれも経時的に開存率は減少している。前川らの LVA 術後患者における ICG を用いた検討でも同様に経時的な開存率の減少を認めている。これらの開存率の減少は浮腫によるリンパ管内圧の上昇が LVA によって解消されることで、リンパ管への血液の流入が起こり閉塞が惹起されると推測している。一方、今回の LVA モデルは正常のリンパ管及び静脈を用いたモデルでありリンパ管内圧の上昇は無く、これらの推論の検討は出来ない。今後、リンパ管圧と開存率の関係に関しては検討していく必要がある。一方、術後1週間の時点での開存例の大半が術後1ヶ月の時点で開存していたことから、吻合部開存の成否は主に吻合時に決定しているものと考えられた。

今回の検討では別の閉塞要因が示唆された。閉塞例においてはリンパ管と静脈の吻合部付近での内膜の移行が不整となっている部分があり、血管内腔に露出した内皮下組織に血小板が凝集している像が認められた。血小板の凝集は血管内腔の狭小化や赤血球等の他の血球細胞の変形及び接着を惹起したものと推測された。閉塞例においても内皮の移行がスムーズな部分では閉塞の原因となる血小板の凝集像は認めなかった。反対に開存例においては、内皮細胞の移行はスムーズで内皮下組織の内腔への露出は認めなかった。吻合部付近に認められた瘤様構造の部分では、内皮細胞の移行はスムーズであり、吻合時の縫合部のピッチが広

い部分に一致して瘤様構造を形成したものと考えられた。

(LVA における要点と注意点)

今回の検討から、内皮下組織の内腔への露出を防ぐことが、長期間の開存を保つために最も重要な要素であると考えられた。この点から、LVA の吻合様式として過去に報告されているリンパ管の静脈への挿入法、静脈角形成術や側端吻合・側々吻合における連続吻合術では内皮下組織が内腔に露出しやすく、術後に閉塞を来しやすいことが推測された。一般にリンパ管は静脈と比較して非常に脆く薄い。この為、術中にリンパ管の断端を確認するのは困難であり、吻合時にテクニカルエラーを起こしやすい。それゆえに、丁寧に断端を確認し、正確に外反する様に吻合を行うことが開存を得るために最も重要と考えられた。また、今回の瘤様構造の部分が直接の閉塞の要因とならなかった様に、過度に密な吻合は必要ないと考えられた。今回の実験モデルは、LVA の術後開存率と閉塞要因の検討に関するものであるが、今後、追加実験として各種吻合様式の比較検討や LVA の開存率とリンパ浮腫患者における浮腫の改善との関係に関する検討等を行うことで、LVA に関する更なる詳細な検討が可能になると考えられた。

#### 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 2 件 )

Onoda S, Kimata Y, Matsumoto K, Yamada K, Tokuyama E, Sugiyama N. Histologic Evaluation of Lymphaticovenular Anastomosis Outcomes in the Rat Experimental Model: Comparison of Cases with Patency and Obstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2016 Jan;137(1):83e-91e. ( 参考文献 )

Onoda S, Kimata Y, Matsumoto K. A Novel Lymphaticovenular Anastomosis Rat

Model. Ann Plast Surg. 2016 Mar;76(3):332-5.

(参考文献)

〔学会発表〕(計4件)

第24回日本形成外科学会基礎学術集会  
一般演題：ラットを用いたリンパ管静脈吻合モデルの作成 小野田聡、松本久美子、木股敬裕 2015年10月8日(盛岡)

第25回日本形成外科学会基礎学術集会  
パネルディスカッション：ラット実験モデルを用いたリンパ管静脈吻合術後の組織学的検討：より効果的なLVAの施行に向けて 小野田聡、木股敬裕、松本久美子、山田潔、杉山成史、松本洋、妹尾貴矢、越宗靖二郎 2016年9月16日(大阪)

第43回日本マイクロサージャリー学会学術集会  
ラット実験モデルを用いたリンパ管静脈吻合術後の組織学的検討 小野田聡、木股敬裕、松本久美子、山田潔、杉山成史、松本洋、妹尾貴矢、越宗靖二郎 2016年11月17日(広島)

The Meeting-American Society of Plastic Surgery 2016- Satoshi Onoda, Yoshihiro Kimata, Kiyoshi Yamada  
Histological Evaluation of Lymphaticovenular Anastomosis Outcomes Using a Novel Rat Experimental Model Plastic Surgery September 26, 2016 Los Angeles

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
小野田聡 (ONODA SATOSHI)  
岡山大学医歯薬学総合研究科形成再建外科・助教  
研究者番号：00423301