

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11931

研究課題名(和文) マウスを用いたリンパ浮腫発生機序から浮腫軽減や線維化を防止する効果的なケアの開発

研究課題名(英文) Development of effective treatment to reduce edema and prevent fibrosis based on the pathogenesis of lymphedema in mice

研究代表者

浅野 きみ (ASANO, Kimi)

金沢医科大学・看護学部・講師

研究者番号：10735351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、リンパ閉塞後の迂回路出現の機序が明らかとなった。集合リンパ管を結紮し、リンパ管閉塞後に出現した迂回路を組織学的に特定したところ、集合リンパ管は結紮部手前より前集合リンパ管を通して迂回し、迂回路の終焉では徐々に集合リンパ管に繋がっていた。また、リンパ管新生の所見はなかった。浮腫の軽減や線維化の防止策までは到達できなかったが、前集合リンパ管が集合リンパ管として結紮部位のリンパの排出の役割を担っていたことは、ヒトでのリンパ浮腫における浮腫軽減のアプローチに繋げて役立つ可能性があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでヒトにおけるリンパ節切除後のリンパ流やリンパ節については、新しいリンパ管がどのように出現するかまでは言及されていなかった。本研究結果より、マウスでのリンパ閉塞後の迂回路出現の機序が明らかとなったことは、リンパ管の閉塞が側副リンパ管や迂回路の形成に有用である可能性がある。今後のさらなる研究によって、ヒトでのリンパ浮腫の発症予防や治療、効果的なケアにつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed the developmental mechanism of detoures after lymphatic obstruction. After ligating the collecting lymphatic vessels, we histologically identified detoures due to lymphatic obstruction. The collecting lymphatic vessels coursed through the pre-collecting lymphatic vessels from the ligation site. At the termini of the detoures, the collecting lymphatic vessels were gradually connected without lymphangiogenesis. Although neither edema reduction nor fibrosis prevention was achieved, the pre-collecting lymphatic vessels were demonstrated to be involved in lymph drainage as collecting lymphatic vessels at the ligation site, suggesting their potential usefulness in edema reduction in human lymphedema.

研究分野：基礎看護学

キーワード：リンパ浮腫 リンパ管迂回路 前集合リンパ管 リンパ閉塞 ICG EdU

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳がん関連リンパ浮腫は世界的にも最も多く報告されているリンパ浮腫である。リンパ節郭清に伴う乳がん術後患者は術後にリンパ浮腫発生のリスクを伴うが、実際に発症する患者と発症しない患者がいる。リンパ浮腫を発症し進行すると、身体的、心理的な生活の質の低下だけでなく、感染や皮膚病変などの合併症発生の可能性が高まる (Taghian et al., 2014)。しかしながら、リンパ浮腫に対する根本的な治療法やその予防の選択肢、効果的なケアに対してまだ確立の途中である。

成人のリンパ排泄経路における再構築のメカニズムについてはあまり知られていない。リンパ浮腫の患者のリンパシンチグラムでは、複数の大きく曲がりくねったリンパ管が示され (Mikami et al., 2011)、重度のリンパ浮腫を有する患者では、リンパ流の中断や側副リンパ路の存在、真皮逆流像などが観察される (Lu et al., 2012; Szuba et al., 2016)。

我々の以前の研究では、マウスの鼠径リンパ節を郭清すると、その数日後に迂回路が出現することが明らかになった。これらのマウスはリンパ浮腫を発症しなかったため、この迂回路が側副路としてリンパを排泄し、リンパ浮腫の発症予防に寄与していると考えた。同様に、他の以前の研究では、リンパ節郭清後に迂回路が示されている (Abe et al., 1976; Maegawa et al., 2010; Pecking et al., 2008)。

しかしながら、リンパ管閉塞後にこれらの迂回路がどのように形成されるかは不明のままであり、ヒトやマウスではまだ解明されていない。したがって、リンパ浮腫発症を回避するためにはリンパの排出経路となる迂回路について、迂回路の発達やその構造、機能を明らかにする必要があり、本研究を立案した。

2. 研究の目的

マウスにおけるリンパ流遮断後の迂回路の形成機序を解明する。

3. 研究の方法

10~16 週齢の BALB/cCrSlc 雄性マウスを用い、1.75% イソフルラン麻酔後、3% (w/v) エバンスブルー色素 25 μ l を両後肢に皮下注射し、鼠径リンパ節を通過する腹壁の集合リンパ管を同定した。右側を実験側、左側を偽手術側とした。右側の腹壁の集合リンパ管から背側 5 mm の部位を 1 cm 皮膚切開し、皮下組織の集合リンパ管を露出させ、実体顕微鏡下で集合リンパ管の頭側と尾側の 2 か所を 5 mm 間隔で、6-0 ナイロン糸にて結紮した。結紮後は切開部を 6-0 ナイロン糸で 3 針縫合した。偽手術側は、実験側と同様の位置を切開し、縫合のみ行った。リンパ管結紮後のリンパ流は、インドシアニングリーン (ICG) (2.5 mg/ml) を後肢に 2 μ l 注射し、近赤外蛍光イメージングシステムを使用して、結紮後 30 日まで観察した。リンパ管新生の評価には、組織採取日の前日および 3 時間前に、分裂増殖した細胞の核を標識する 5-ethynil-2'-deoxyuridine (EdU) を 100 μ g 腹腔内投与した。

組織観察には、結紮後 10、12、15、18、21、24 日目に、3% (w/v) エバンスブルー色素 25 μ l を両後肢に注射後、結紮部とその周囲の組織を採取した。亜鉛固定溶液で固定後、凍結包埋し、7 μ m 厚の連続切片を作成した。リンパ管マーカーとして抗 Podoplanin 抗体を免疫組織化学染色して観察した。金沢大学動物実験倫理委員会に承認された (AP-153596)。

4. 研究成果

(1) リンパ結紮後のリンパ流

集合リンパ管結紮後のリンパ流の経路は、結紮後 15 日目には迂回路を通過して元の経路へ繋がる、元の経路を通る、描出されないの 3 つのパターンを示した (図 1)。結紮後 30 日目には (5/8 匹) か、(3/8 匹) のどちらかのパターンを示した。偽手術側は正常なリンパ流を示し (8/8 匹)、鼠径リンパ節を通過して腋窩リンパ節に流入していた (表 1)。

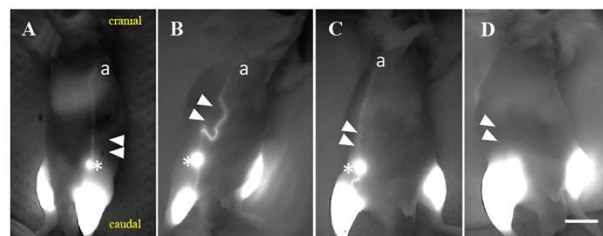


図 1 30 日目に観察したリンパ流像

(A) 偽手術肢側のリンパ流、(B) 迂回路出現、(C) 元の経路、(D) 検出されない * は鼠径リンパ節

	No. of detours	No. of original routes	No. with no detected route
Day 15	2 (25.0)	1 (12.5)	5 (62.5)
Day 21	4 (50.0)	2 (25.0)	2 (25.0)
Day 27	5 (62.5)	2 (25.0)	1 (12.5)
Day 30	5 (62.5)	3 (37.5)	0 (0.0)

Percentages (%), n = 8 on each day.

表 1 リンパ結紮後 30 日目までの経路別のリンパ流数

(2) 迂回路の組織学的検討

迂回路の連続組織像

30日目の手術側のリンパ造影像(図2A)で示す、迂回路の部位を赤線の部位より黄色線の部位まで矢印示す頭側の方向に連続切片で観察した。図2Bには結紮した腹壁のリンパ管aとaより内側に存在する腹壁のリンパ管bが示されている。集合リンパ管結紮部位間で観察された迂回路は、拡張した不規則な形状で弁(図2F 矢印)を持ち、Podoplanin 陽性細胞であった。この迂回路は皮下組織の皮筋より上部に位置し、結紮部付近で皮筋を貫通し、結紮部を超えた位置で皮下組織の皮筋より下部にある集合リンパ管に繋がっていた(図2F から2F)。

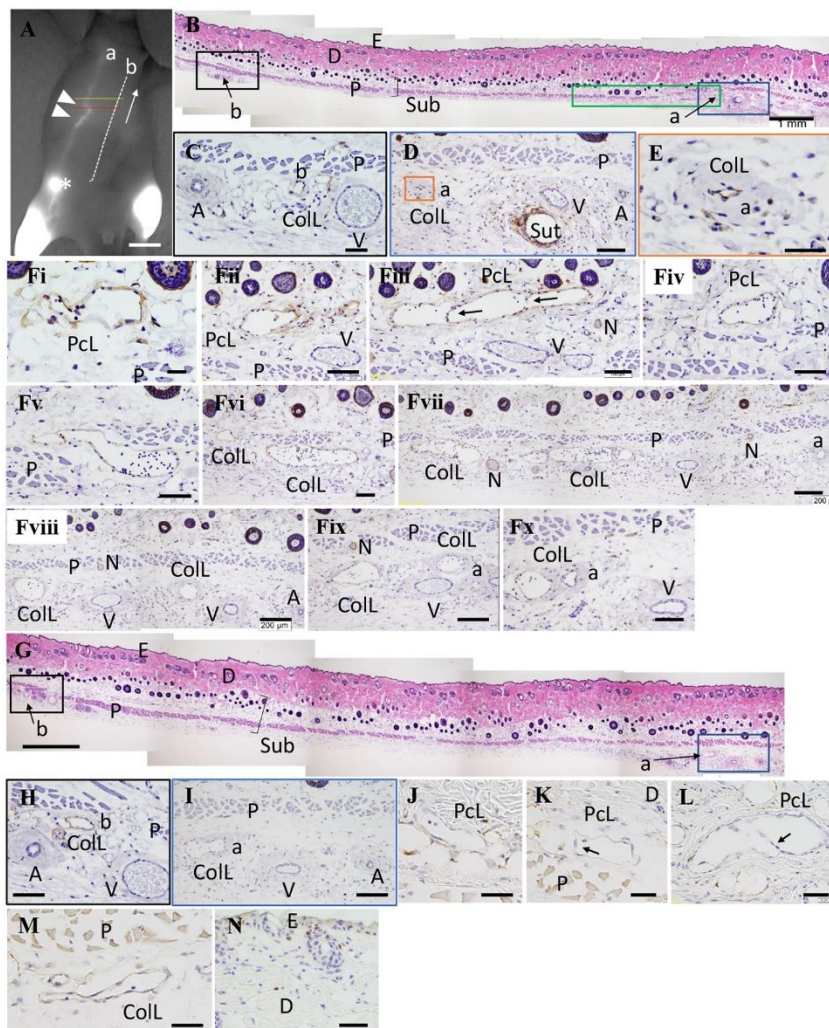


図2 近位手術部位での迂回路の代表的な組織像

迂回路は新生か既存のものか

EdU 陽性細胞は、ケラチノサイトや毛包で観察されたが、迂回路では観察されなかった。偽手術側は、皮筋より上部で拡張したリンパ管は観察されず、皮筋より下部の集合リンパ管との繋がりも観察されなかった(図2JからN)。

(3) 結論

以上の結果より、リンパ管結紮後に出現した迂回路は、リンパ管新生ではなく前集合リンパ管が拡張して形成されたと考えられ、集合リンパ管のように機能してリンパを排泄していた。この迂回路が発達するメカニズムについては、今後も実験を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kimi Asano, Yukari Nakajima, Kanae Mukai, Urai Tamae, Mayumi Okuwa, Junko Sugama, Chizuko Konya, Toshio Nakatani	4. 巻 15
2. 論文標題 Pre-collecting lymphatic vessels form detours following obstruction of lymphatic flow and function as collecting lymphatic vessels.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0227814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kanae Mukai, Yukari Nakajima, Kimi Asano, Toshio Nakatani	4. 巻 14
2. 論文標題 Topical estrogen application to wounds promotes delayed cutaneous wound healing in 80-week-old female mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0225880	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakajima Yukari, Asano Kimi, Mukai Kanae, Urai Tamae, Okuwa Mayumi, Sugama Junko, Nakatani Toshio	4. 巻 8
2. 論文標題 Near-Infrared Fluorescence Imaging Directly Visualizes Lymphatic Drainage Pathways and Connections between Superficial and Deep Lymphatic Systems in the Mouse Hindlimb	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-25383-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mukai K, Komatsu E, Yamanishi M, Hutakuchi M, Kanzaka K, Uno Y, Yamazaki S, Kato S, Yamamoto T, Hattori M, Nakajima Y, Urai T, Asano K, Murakado N, Okuwa M, Nakatani T	4. 巻 29
2. 論文標題 Effectiveness of changing the application of Japanese honey to a hydrocolloid dressing in between the inflammatory and proliferative phases on cutaneous wound healing in male mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Wounds	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 浦井珠恵, 浅野きみ, 中島由加里, 向井加奈恵, 中谷壽男	4. 巻 15
2. 論文標題 肥満マウスにおける円形皮膚全層欠損創の創形保持を目的とした板状皮膚保護材使用の有用性	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 形態・機能	6. 最初と最後の頁 57-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Urai Tamae, Nakajima Yukari, Mukai Kanae, Asano Kimi, Okuwa Mayumi, Sugama Junko, Nakatani Toshio	4. 巻 9
2. 論文標題 Does Obesity without Hyperglycemia Delay Wound Healing in an Obese Mouse Model Induced by a High-Fat Diet?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Health	6. 最初と最後の頁 1660 ~ 1679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/health.2017.912122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tamae Urai, Haryanto, Kanae Mukai, Tatsuhiko Matsushita, Kimi Asano, Yukari Nakajima, Mayumi Okuwa, Junko Sugama, Toshio Nakatani.	4. 巻 8
2. 論文標題 The Relationship between Cutaneous Wounds Made on Obese Mice or Those with Decreased Body Weight and Serum Leptin Level.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Health	6. 最初と最後の頁 1015-1028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4236/health.2016.811105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kanae Mukai, Tamae Urai, Kimi Asano, Yukari Nakajima, Toshio Nakatani.	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation of effects of topical estradiol benzoate application on cutaneous wound healing in ovariectomized female mice.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0163560	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Komatsu E, Nakajima Y, Mukai K, Urai T, Asano K, Okuwa M, Sugama J, Nakatani T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Lymph Drainage During Wound Healing in a Hindlimb Lymphedema Mouse Model.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Lymphatic Research and Biology	6. 最初と最後の頁 32-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/lrb.2016.0026.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計20件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中谷壽男, 浅野きみ, 中島由加里, 向井加奈恵
2. 発表標題 マウス集合リンパ管結紮後に出現する迂回路の特徴
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島由加里, 浅野きみ, 向井加奈恵, 浦井珠恵, 大桑麻由美, 須釜淳子, 中谷壽男
2. 発表標題 インドシアニンググリーン蛍光造影法によるマウス下肢リンパ排泄経路の同定と下肢リンパ浮腫モデルへの応用
3. 学会等名 第20回日本褥瘡学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中谷壽男, 中島由加里, 浅野きみ, 向井加奈恵
2. 発表標題 マウス単径 リンパ節郭清後に出現する迂回路は交通リンパ管の可能性がある
3. 学会等名 第78回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅野きみ, 中島由加里, 向井加奈恵, 浦井珠恵, 大桑麻由美, 須釜 淳子, 紺家千津子, 中谷壽男
2. 発表標題 マウスのリンパ管結紮後に出現する迂回路の役割
3. 学会等名 第48回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中谷壽男, 浅野きみ, 中島由加里, 向井加奈恵
2. 発表標題 マウス集合リンパ管結紮後に出現する迂回路の特徴
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島由加里, 浅野きみ, 向井加奈恵, 浦井珠恵, 大桑麻由美, 須釜淳子, 中谷壽男
2. 発表標題 マウス鼠径リンパ節切除後の下肢皮膚の組織学的特徴
3. 学会等名 第19回日本褥瘡学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中島由加里, 浅野きみ, 向井加奈恵, 浦井珠恵, 大桑麻由美, 須釜淳子, 中谷壽男
2. 発表標題 マウス下肢慢性リンパ浮腫モデル作製に向けて
3. 学会等名 第5回看護理工学会学術集会 第11回看護実践学会学術集会 国際リンパ浮腫フレームワーク・ジャパン研究協議会 第7回学術集会 合同学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中島由加里, 浅野きみ, 向井加奈恵, 大桑麻由美, 須釜淳子, 中谷壽男
2. 発表標題 インドシアニングリーン蛍光造影を用いたマウス下肢リンパドレナージに貢献する新たなリンパ管の同定
3. 学会等名 第47回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakajima Y, Asano K, Urai T, Mukai K, Okuwa M, Sugama J, Nakatani T
2. 発表標題 Establishment of a chronic lymphedema model in mice
3. 学会等名 第46回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Nakajima Y, Mukai K, Urai T, Asano K, Ohta M, Kato I, Kawaguchi A, Kinoshita Y, Kumagai Y, Sakashita A, Sawazaki T, Yamazaki A, Nakatani T
2. 発表標題 Effects of honeydew honey on wound healing.
3. 学会等名 5th congress of World Union of Wound Healing Societies (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>金沢医科大学 研究室一覧 成人看護学 http://nurse-adult.kanazawa-med.labos.ac/one/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	紺家 千津子 (KONYA Chizuko) (20303282)	石川県立看護大学・看護学部・教授 (23302)	
研究 分担者	向井 加奈恵 (MUKAI Kanae) (30755335)	金沢大学・保健学系・准教授 (13301)	