

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11529

研究課題名(和文) 超音波技術を用いた経皮リンパ管アクセスとナノ粒子を用いた経リンパ管DDSの確立

研究課題名(英文) Percutaneous Access to the Lymphatic System Using Ultrasonography and Translymphatic DDS Using Nanoparticles

研究代表者

秋田 新介 (Akita, Shinsuke)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00436403

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)：ヒトリンパ浮腫におけるリンパ節と、リンパ節に出入りするリンパ管の変化について超音波を用いて観察し、リンパのうっ滞の病期によってリンパ節の大きさ、輸出リンパ管の口径に有意な差が生じることを示した。

超音波検査にて検索を行ったリンパ管を目標に皮膚切開を行い、顕微鏡下、皮膚小切開下でのリンパ管に針を穿刺する手技の確立に成功し、ヒトリンパ管を色素を用いて染色する方法を確立した。さらにリンパ管の染色は、リンパ浮腫の進行度によって成功率が異なることを見出した。リンパ管に針を穿刺する手技の手技的な困難さの克服と成績の安定を目的として、3Dプリンタを用いたリンパ管穿刺専用手術機器を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ浮腫に対するリンパ管静脈吻合の有効が示されている反面、リンパ外科には高度な技術が要求される。本研究で得られた成果は、リンパ管へのアクセスを容易とし、吻合に適したリンパ管の同定を確実にを行うことを助けることで、リンパ外科を広く一般に取り組むことが可能な手技とすることに貢献したと考えられる。経リンパ管(薬剤)治療研究の今後の発展にも寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Changes in human lymph nodes and afferent and efferent lymphatic vessels were observed using ultrasound. There were significant differences in lymph node size and diameter of efferent lymphatic vessels according to the stage of lymphatic stasis. The skin incision was made with the aim of the lymphatic vessels searched by ultrasonography, and the lymphatic cannulation technique was successfully established under the microscope and under the small incision of the skin, and the efferent lymphatic staining method in human lymphatic vessels was established. Exported lymphatic staining was found to have different success rates depending on the stage of lymphedema. For the purpose of overcoming the technical difficulty of the lymphatic cannulation technique and stabilizing the result, the equipment for 3D printing from Computer assisted design was developed.

研究分野：形成外科

キーワード：リンパ浮腫 リンパ管 超音波 カニューレーション リンパ管静脈吻合 リンパ外科

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンパ管をリアルタイムで三次元、高精度で描出する方法は確立しておらず、経皮的にリンパ管をカニューレションする技術はこれまで存在しない。このため、カニューレション可能な血管では可能な正確な流量の測定、検体採取、直接投薬などの技術は確立していない。リンパ管系に造影剤や薬剤を投与するには、血管や皮下注射を経由してリンパ管への取り込みに期待することになる。こうした手法では取り込み時間、濃度は不安定であり、解像度の高い描出や、リンパ管内に安定した濃度の薬剤を投与することなどは難しい。また、外科治療においてもリンパ管を適切に描出可能となれば、リンパ管の評価や治療対象の選択、治療自体の確実性の向上など有用性は大きいと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的はリンパ管カニューレション技術とリンパ管内に造影剤、薬剤を直接届ける技術を確立し、リンパ浮腫治療に新展開をもたらすことである。本技術は、経リンパ管医療を用いた他疾患への応用も検討できる。

申請者らはインドシアニングリーン(ICG)の皮下注射によるリンパ管機能測定の有用性を報告してきたが (Akita S, PRS 2013, Akita S, PRS 2016)、深部の観察は困難な点、解像度の高い描出や定量評価はできないなどの課題を残してきた。超音波検査によるリンパ管の描出は目覚ましい進歩を遂げており、ICG 所見と超音波の描出をベースとして、低侵襲なリンパ管のカニューレション技術、造影、染色方法を確立することで、リンパ外科の判断の新しい基準や、リンパ管薬剤投与の経路の確立など、新たな治療分野の礎を築くことが本研究の主たる目的であった。

3. 研究の方法

ヒトにおけるリンパ管の超音波データについて、これまでに十分に観察結果の検証がなされていない鼠径リンパ節に関連したリンパ流について、詳細に観察研究を行った。具体的には、18 MHz の超音波検査機器 (Aplio Mx; Toshiba, Tokyo, Japan) を使用し、46 肢の鼠径部、62 個のリンパ管における超音波所見を評価した。ICG 検査の dermal back flow (DBF) 所見に基づいた病期分類別の差を検証した。

リンパ浮腫に対するリンパ管静脈吻合においてリンパ管の染色を行う手技を rabbit ear モデルを用いて検証した。Rabbit ear 基部の腫瘍血管に伴走するリンパ管を用いて、ICG, Patent blue によるリンパ管の造影を、35G 針を用いた直接カニューレションによって行った。

ヒト輸出リンパ管吻合を行うにあたって、輸出リンパ管の正確な同定方法を確立するべく、術前評価と術中リンパ管描出、吻合部の確認の一連の手技の検討を行った。

- の過程での手技上の困難な点を整理し、リンパ管のカニューレションと漏出のない薬剤の注入を安定して施行することのできる機器の開発を行った。

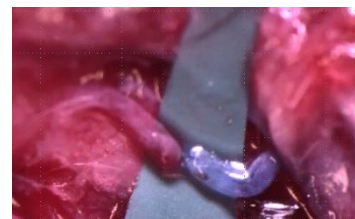
4. 研究成果

リンパ節の大きさは、対象群と、DBF stage 0-2 のリンパうっ滞の合計 4 群での比較において、One-way ANOVA で有意差を認め (図表 1)、Tukey-Kramer test にてすべてのペアに有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。輸出リンパ管の径は One-way ANOVA で有意差を認め (図表 1)、Tukey-Kramer test にて、Stage 0, Stage 1 では、Stage 2 や Normal と比較して、有意に径が大きいことが示された。

ICG DBF Stage	Control	Stage 0	Stage 1	Stage 2
Lymph Node Size (mm)	3.8 ± 0.2	5.4 ± 0.2	4.5 ± 0.1	3.0 ± 0.2
One-way ANOVA $p < 0.01$				
Efferent Lymphatic Diameter (mm)	0.45 ± 0.03	0.65 ± 0.03	0.69 ± 0.03	0.45 ± 0.03
One-way ANOVA $p < 0.01$				

図表 1 リンパのうっ滞の程度によって、リンパ節の大きさ、輸出リンパ管の直径は異なる。

Rabbit ear lymphedema model を作成し、リンパ管解剖ならびに病理所見を含め確認した。さらに、安定したリンパ管静脈吻合 (lymphaticovenular anastomosis: LVA) が可能であることを示すとともに、0, 25mm の直径までのリンパ管のカニューレションは顕微鏡下に可能であることが確認されたが、刺入部からの漏出、突き破ったことによる漏出は径が小さいほど高頻度に生じた (図表 2)。



図表 2 Rabbit ear における LVA(40 倍)

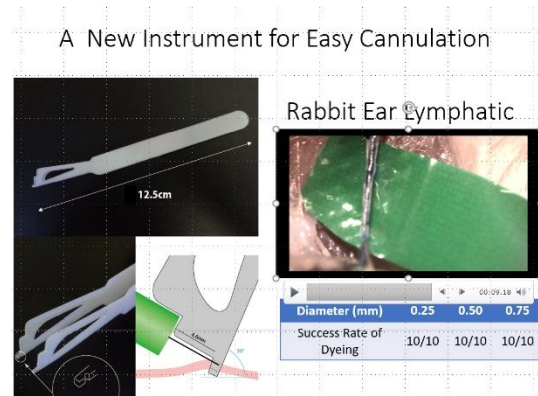
ヒトにおいて輸出リンパ管の同定方法を確立するにあたって、術前ICG蛍光リンパ管造影、超音波検査所見をもとに輸入リンパ管をまず剥離し、輸入リンパ管カニューレーションを行って、青色色素注入によってリンパ節を経由して輸出リンパ管を染色する方法を確立した。輸入リンパ管経由での輸出リンパ管の造影、染色について、対象群と、DBF stage 0-2 のリンパうっ滞の合計4群での比較において、One-way ANOVAで有意差を認め(図表3)、Steel-Dwass testにてStage 1とStage 2の間に有意差を認めた( $p = 0.04$ )。また注入薬剤は針先のブレにより容易に漏出したことが課題と考えられた。

ICG DBF Stage	Control	Stage 0	Stage 1	Stage 2
Success Rat of Dyeing	13/15	13/15	18/18	9/14

One-way ANOVA  $p = 0.04$

図表3 リンパのうっ滞の程度によって、輸出リンパ管の染色の成功率は異なる。

標準的なマイクロサージャンであれば容易にリンパ管のカニューレーションを安定して行うことが可能なデバイスの開発を目標として、リンパ管カニューレーション補助機器の開発を行った。34G針、注入用の助手なしでの施術を前提とし、リンパ管把持器具の作成と修正を繰り返し行い、安定した穿刺と注入が可能な機器の開発にいたった(図表4)。一方、漏出や片手捜査への安定性の向上が必要であり、今後のさらなる開発を要する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akita Shinsuke, Yamaji Yoshihisa, Kuriyama Motone, Tokumoto Hideki, Ishigaki Tatsuya, Tezuka Takafumi, Ogata Hideyuki, Kubota Yoshitaka, Mitsukawa Nobuyuki	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Intraoperative Detection of Efferent Lymphatic Vessels Emerging from Lymph Node during Lymphatic Microsurgery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reconstructive Microsurgery	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0038-1677039	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 Yamaji Yoshihisa, Akita Shinsuke, Akita Hidetaka, Miura Naoya, Gomi Masaki, Manabe Ichiro, Kubota Yoshitaka, Mitsukawa Nobuyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Development of a mouse model for the visual and quantitative assessment of lymphatic trafficking and function by in vivo imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-23693-9	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 秋田新介、山路佳久、手塚崇文、緒方英之、徳元秀樹、栗山元根、窪田吉孝、三川信之
2. 発表標題 Lymphatic microsurgeryにおける輸出リンパ管の同定
3. 学会等名 第45回日本マイクロサージャリー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinsuke Akita, Yoshihisa Yamaji, Nobuyuki Mitsukawa
2. 発表標題 How to maximize the effect of surgical treatment of lymphoedema
3. 学会等名 第10回国際マイクロサージャリー学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山路佳久 秋田新介 三川信之
2. 発表標題 リンパ輸送能の定量評価を目的とした腹部リンパシステム可視化マウスモデルの作成
3. 学会等名 第26回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋田新介 山路佳久 窪田吉孝 手塚崇文 笹原資太郎 三川信之
2. 発表標題 リンパ浮腫非侵襲評価方法の確立と侵襲的定量評価方法の開発
3. 学会等名 第44回日本マイクロサージャリー学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshihisa Yamaji, Shinsuke Akita, Nobuyuki Mitsukawa
2. 発表標題 A novel mouse model for visualized and quantitative assessment of lymphatic function using an in vivo imaging system
3. 学会等名 26th World Congress of Lymphology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋田新介 山路佳久 徳元秀樹 手塚崇文 緒方英之 島内香江 小坂健太郎 窪田吉孝 三川信之
2. 発表標題 Lymphatic microsurgeryにおけるリンパ節からのドレナージ路の確保
3. 学会等名 第25回日本形成外科手術手技学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	三川 信之  (Mitsukawa Nobuyuki)  (40595196)	千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授   (12501)	
研究分担者	山口 匡  (Yamaguchi Tadashi)  (40334172)	千葉大学・フロンティア医工学センター・教授   (12501)	
研究分担者	秋田 英万  (Akita Hidetaka)  (80344472)	千葉大学・大学院薬学研究院・教授   (12501)	