

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16988

研究課題名(和文) Bio Tubeを用いた集合リンパ管再生研究

研究課題名(英文) Study for regeneration of collecting lymphatics using Bio tube

研究代表者

吉田 周平 (Yoshida, Shuhei)

広島大学・病院国際リンパ浮腫治療センター・准教授

研究者番号：80380921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Biotubeは0.3mm、ラットの腹腔内リンパ管は0.2mmと口径が大変小さいため特殊な吻合法を開発し実施した。7-0から9-0のナイロンモノフィラメントをリンパ管へガイドナイロン糸として挿入しておくことで6-0や5-0のより口径の大きいナイロンモノフィラメントが挿入しやすいことを発見した。この口径の大きいナイロンモノフィラメントをステントして11-0、12-0のマイクロ糸針で吻合を行った。この方法で0.1mm以下口径の脈管も吻合できるようになった。論文にまとめて報告した。biotubeの開存率はほぼ100%であるが長期開存は確認できない。コラーゲン性であるため術後の狭窄が原因であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで人類が可能な脈管吻合の最小口径の限界は0.2mmであったが、これを突破できた。リンパ管及びリンパ流はリンパ管再生の重要な因子の一つと考えられ、外科治療の新規開発においてはSupermicrosurgeryを超えたより細い正確な脈管吻合でリンパ管を吻合しリンパ流を再開させる技術が必要となる。本法を用いることでSupermicrosurgeryを超えた吻合が可能であり臨床や基礎実験を通じ新たな治療法の開発につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：A special anastomosis technique was developed and implemented for the very small diameter, because the diameter of Biotube is 0.3 mm and that of rat intra-abdominal lymphatic duct is 0.2 mm. We found that inserting nylon monofilaments from 7-0 to 9-0 into the lymphatic vessels as guide nylon threads makes it easier to insert nylon monofilaments with larger diameters such as 6-0 and 5-0. This larger-diameter nylon monofilament was stented, and lymphatics were anastomosed successfully with Bio tubes using 11-0 and 12-0 micro needles. By this method, vessels with a diameter of 0.1 mm or less can be anastomosed successfully. The fact was reported and published in a paper. The immediate patency rate of Biotube is almost 100%, but long-term patency cannot be confirmed. It is considered to be caused by postoperative contracture owing to collagen characteristics.

研究分野：形成外科

キーワード：Supermicrosurgery

1. 研究開始当初の背景

進行したリンパ浮腫の腫大した患肢は日常生活に影響を及ぼし、頻発する蜂窩織炎に悩まされ、血管肉腫の発生母地となることもあり、血管肉腫発症後はほぼ致死的である。

リンパ管静脈吻合が一定の効果を得ているが問題点もある。

リンパ浮腫の患肢は慢性炎症状態にあり皮下組織は次第に線維硬化していく。これはリンパ管に対しても同様で、線維硬化で機能を失い最終的には線維組織の中に消失していく。このような状態ではリンパ管静脈吻合は効果を発揮することはできず、血管柄付リンパ管移植を行なっている。しかしリンパ管は動脈や静脈に比べると数が非常に少ないため移植する事の出来る量や部位は限定される。よってリンパ浮腫治療は消失していく集合リンパ管或いは移植するための集合リンパ管をどれだけ再生出来るか、という問題に最終的になっていく。リンパ管静脈吻合をリンパ浮腫患者に行なっているが、進行した症例ではリンパ管が高度に硬化線維化して消失してしまっている症例をみる。そこで従来 of 外科療法に変わる手段として脂肪幹細胞を用いたリンパ管の再生療法実験を以前行なった。貯留した液の排出路が得られ組織学的にもリンパ管の再生を得ることができたが、組織学的に集合リンパ管が再生した所見を得ることはできなかった。

リンパ管の新生は既存する機能しているリンパ管からの出芽、伸長が主体であり、ある程度の大きさのリンパ管、例えば集合リンパ管などではリンパ管上皮細胞や平滑筋細胞及びその前駆細胞が生着、遊走する足場の存在がある方が再生には有利である。これまで申請者はリンパ管を再生させる手段として3つの実験を行なった。

1つは脂肪幹細胞を用いたリンパ管再生実験である。

マウスを用い下肢にリンパ浮腫モデルを作製し脂肪幹細胞を投与しリンパ浮腫の改善とリンパ管新生が起きることを調べた。

また、ラットの下肢に虚血手術を行ない、その下肢に脂肪幹細胞移植と血管柄付組織移植を行い血管柄付組織移植術が血管再生に対し有利に働く事も調べた。

もう一つは血管柄付のリンパ組織移植実験で、血管柄付リンパ組織移植がリンパ管新生に有利に働くことも調べた。

2. 研究の目的

リンパ浮腫では集合リンパ管の障害や機能不全等を原因として、リンパ液の輸送障害が持続する状態である。患肢は慢性炎症状態にあり皮下組織は次第に線維硬化し最終的にはリンパ管は消失する。よって、最終的にリンパ浮腫治療は消失していくリンパ管をどれだけ再生出来るか、という問題になる。リンパ管を再生させる試みの一つとして BioTube と呼んでいる生体内で作製されるコラーゲンで構成される人工脈管を用い集合リンパ管の再生を試みる。本研究で使用する BioTube は生体のコラーゲンで構成され、細胞の足場としては非常に好ましく実際に動脈での使用では生体動脈への置き換わりができていく所見が得られている。Bio tube をリンパ管に使用する事で動脈と同様のリンパ管への置き換わりが出来ることを期待している。リンパ管再生の基本要件は、1.成長因子、2.既存の機能しているリンパ管やリンパ節、3.前駆細胞、それらに加えて、4.前駆細胞や既存リンパ管からのリンパ上皮細胞や平滑筋細胞が遊走定着伸長していく足場であると考え。1から3に関しては既報があるが4の足場については報告例が見受けられない。生体コラーゲンより構成作製される Bio Tube は4の足場として非常に有効と考えられるため、それを証明するのが本研究の趣旨である。

本研究の目的はリンパ浮腫治療において「鍵」となる集合リンパ管を生体内で再生させる事にある。これまで VEGF-C などの成長因子や間葉系幹細胞を用いたリンパ管再生研究が動物実験で行なわれていて、リンパ流の改善やリンパ管の再生が得られるなどの好結果をだしている。しかし、いずれも皮内リンパ管などの毛細リンパ管レベルの再生である。リンパ浮腫改善において最も重要な集合リンパ管の再生を組織学的に証明した結果はまだ得られていない。

またこれまで一定の大きさ以上の脈管組織の再生を行なう試みは生体外でシート培養を堆積させ加工したり、3D のプリンターに代表されるような生体外で行なわれることがほとんどであった。本実験で用いる BioTube はステンレスの微小棒とシリコン性のチューブで構成される鑄型で様々な大きさ形状の物が容易に作成可能である。

この鑄型を動物の皮下に埋め込むと2週間から2ヶ月程度で鑄型周囲に異物反応によってコラーゲン被膜が形成される。

コラーゲン被膜が形成された鑄型を生体外へ取り出し、シリコンフレームやシリコンチューブ、ステンレスの微小棒を取り出すとコラーゲンで形成された微小管腔構造体が形成される。必要に応じて微修正を加え成形した後、目的とするリンパ管へ吻合移植する(図5)。この Bio Tube は動脈では既に研究が進んでおり良好な結果を出している。数年にわたり開存している症例や、ほぼ生体動脈と置換している事も報告されている。また動脈壁を栄養する微小栄養血管が増生している事も報告されている。これはコラーゲンは生体親和性がよく、細胞増殖・遊走移動において必要な物質であり脈管の再生において非常に有利な条件を作っているからだと考察され

る。

動脈などの脈管においては研究が行なわれているがリンパ管においては研究の前例がなく、本
法で集合リンパ管の再生、更にリンパ管への栄養血管の流入も確認出来ればリンパ浮腫治療に
おいて画期的な治療法へ繋がる可能性がある

3. 研究の方法

Bio tube 鑄型の作製は国立循環器病センターの中山泰秀先生に依頼し行なって頂いていた。
各種サイズの Bio tube の作製が可能で現在内径は 0.3mm のものが作製可能である。現在、長
さ 3 cm 程度の鑄型で実験を行なっているが更に長い鑄型も作製可能である。

ラット皮下へ 0.3~0.5mm 用 bio tube 鑄型を埋め込む。1 回で 3~6 個埋め込み一度に大量に
作製する事も可能である。2 週~2 ヶ月後に取り出す。長期埋め込んでいても特に問題はない。
周囲に異物反応によりコラーゲン被膜が形成された鑄型を手術により取り出す。作製された
Bio Tube は 70-90%のエチルアルコールに浸すことで簡易的に脱細胞化でき長期保存また異種
間での移植も可能である。

作製された Bio tube を腹腔内のリンパ管へ interposition させるように吻合する。腹腔内の
リンパ管と bio tube は硬さや壁の厚みの違い、内径の違いがあり吻合には難渋する。そのた
め、吻合においては Ivas 法を用い吻合する。吻合はその場で ICG 注射行なって PDE で確認、
あるいはパテントブルー注射で確認する。1 ヶ月後に開腹し開存状態を確認する。吻合状態は
手術直後同様、PDE あるいはパテントブルー局注で確認する。肉眼的な性状や栄養血管の流入
は手術用顕微鏡または写真での所見で比較判断する。

吻合した Bio Tube は摘出して組織学的精査行なう。Biotube を一定間隔で薄切して、H.E.
免疫染色行なう、弁形成の有無、リンパ管上皮細胞・平滑筋細胞、栄養血管の再生の有無や性
状・量を分析する。

4. 研究成果

Bio tube 鑄型をラット皮下へ埋め込み、4 週間後に鑄型周囲に形成されたコラーゲン組織を取
り出し高濃度アルコールに浸けて脱細胞化した。脱細胞化した Biotube はラットの腹腔内のリン
パ管へ吻合する。Biotube は 0.3mm、ラットの腹腔内リンパ管は 0.2mm と口径が大変小さい
ため特殊な吻合法を開発し実施した。7-0 から 9-0 のナイロンモノフィラメントをリンパ管へ
ガイドナイロン糸として挿入しておくことと 6-0 や 5-0 のより口径の大きいナイロンモノフィラ
メントが挿入しやすいことを発見した。この口径の大きいナイロンモノフィラメントをステント
して 11-0、12-0 のマイクロ糸針で吻合を行った。この方法で 0.1mm 以下口径の脈管も吻合で
きるようになった。これまで人類が可能な脈管吻合の最小口径の限界は 0.2mm であったが、こ
れを突破できた。多くの動物種においてリンパ管は大変細く、小動物ではさらに細い。またリン
パ浮腫の患者ではリンパ管は細く狭窄していることが多く、従来の Supermicrosurgery の吻
合手技のみでは対応できないことがある。

加えて、リンパ管及びリンパ流はリンパ管再生の重要な因子の一つと考えられ、外科治療の新
規開発においては Supermicrosurgery を超えたより細い正確な脈管吻合でリンパ管を吻合しリン
パ流を再開させる技術が必要となる。本法を用いることで Supermicrosurgery を超えた吻合
が可能であり臨床や基礎実験を通じ新たな治療法の開発につながると考える。

論文にまとめて報告した。

ラットの腹腔内リンパ管と吻合した biotube の開存率が非常に低い。biotube をラットの腹腔
内リンパ管に吻合するがその後のフォローで biotube が開存していない。直後の開存率はほぼ
100%であるがその後フォローでリンパ管の開存が確認できていない。恐らく biotube がコラ
ーゲン性であるため術後の狭窄が起こりやすいためであると考ええる。動脈など内圧が強かか
っている脈管ではコラーゲンの収縮力が内圧と拮抗して開存や内圧による tube の破損を防い
でいると考えるが、リンパ流のように流量が少ない脈管ではコラーゲンの収縮力が勝って狭窄
してしまうことが考えられる。Bio tube の集合リンパ管再生については実際は閉塞が起こり
実現は困難な見通しではあるが本実験で得られた超微小循環外科技術の確立でリンパ浮腫の臨
床での大きな成果を得た。

具体的にはリンパ浮腫が創傷治癒阻害因子となることでリンパ管静脈吻合を行うことで創傷治癒
を改善させることができるということ。またリンパ浮腫治療には多数リンパ管静脈吻合を行う
必要があり、従来手術用顕微鏡を複数台用いておこなっていたが手術用顕微鏡と手術用ルーペ
で効率的にリンパ管静脈吻合を量産できる方法を開発した。また従来より加齢によりリンパ管
収縮力は低下していくと動物実験では示されていたが今回初めて人間においても加齢によりリン
パ管収縮力は低下し加齢性リンパ浮腫となりうることを、リンパ管静脈吻合で改善させうるこ
とを発見した。さらに肥満患者においてリンパ浮腫が発症することは言われていたがそのメカ
ニズムについては不明な点が多かった。今回肥満によりリンパ浮腫を発症した患者にリンパ管
静脈吻合を行うことで、実際に肥満患者のリンパ管を観察できた。肥満性リンパ管は通常より
も著明に拡張しており肥満患者においては全体的なリンパ流量の増加或いはうっ滞が起こって
いることを直視下に発見した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshida S	4. 巻 10
2. 論文標題 Lymphaticovenous Anastomosis for Age-Related Lymphedema.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 5129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10215129.	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 -
1. 著者名 Yoshida S	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of Postoperative Compression Therapy on the Success of Liposuction in Patients with Advanced Lower Limb Lymphedema.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 4852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10214852.	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 -
1. 著者名 Yoshida S	4. 巻 41
2. 論文標題 Investigation of flow velocity in recipient perforator artery for a reliable indicator for the flap transfer with perforator to perforator anastomosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microsurgery.	6. 最初と最後の頁 550-556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/micr.30783.	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 Yoshida S	4. 巻 74
2. 論文標題 Modified intraoperative distal compression method for lymphaticovenous anastomosis with high success and a low venous reflux rates.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Plast Reconstr Aesthet Surg.	6. 最初と最後の頁 2050-2058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjps.	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 Yoshida S	4. 巻 20
2. 論文標題 Combined Lymphovenous Anastomosis and Great Saphenous Vein Stripping for Comorbid Lymphedema and Varicose Veins.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lymphat Res Biol.	6. 最初と最後の頁 213-219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/lrb.2019.0076.	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 Yoshida Shuhei	4. 巻 84
2. 論文標題 Microscope-Induced Thermal Burns During Lymphaticovenular Anastomosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Plast Surg .	6. 最初と最後の頁 e24-e26.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SAP.0000000000002116.	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 Yoshida Shuhei	4. 巻 8
2. 論文標題 Characteristics and outcomes of lymphaticovenular anastomosis in older patients with bilateral involvement versus younger patients with unilateral involvement in lower extremity lymphedema	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Vasc Surg Venous Lymphat Disord .	6. 最初と最後の頁 646-657.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvsv.2019.10.013.	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 Yoshida Shuhei	4. 巻 73
2. 論文標題 Role of lymphaticovenular anastomosis for treatment of lymphorrhea in lower limbs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Plast Reconstr Aesthet Surg .	6. 最初と最後の頁 1357-1404.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjps.2020.02.029.	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 Yoshida Shuhei	4. 巻 8
2. 論文標題 Simple Method for Deep Insertion of Drainage Tube through a Small Skin Incision	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plast Reconstr Surg Glob Open	6. 最初と最後の頁 e2951.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/GOX.0000000000002951.	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 Yoshida Shuhei	4. 巻 8
2. 論文標題 Lymphovenous Anastomosis for Morbidly Obese Patients with Lymphedema.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plast Reconstr Surg Glob Open.	6. 最初と最後の頁 e2860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/GOX.0000000000002860.	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 Yoshida Shuhei	4. 巻 8
2. 論文標題 Indocyanine green lymphography findings in older patients with lower limb lymphedema	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Vasc Surg Venous Lymphat Disord .	6. 最初と最後の頁 251-258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvsv.2019.03.021.	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 Yoshida Shuhei	4. 巻 8
2. 論文標題 Lymphovenous Anastomosis Aids Wound Healing in Lymphedema: Relationship Between Lymphedema and Delayed Wound Healing from a View of Immune Mechanisms.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv Wound Care (New Rochelle).	6. 最初と最後の頁 263-269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/wound.2018.0871.	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 Yoshida Shuhei	4. 巻 72
2. 論文標題 Line production system for multiple lymphaticovenular anastomoses.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Plast Reconstr Aesthet Surg.	6. 最初と最後の頁 1334-1339.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjps.2019.03.038.	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 Yoshida Shuhei	4. 巻 82
2. 論文標題 Mechanical Dilatation With a Nylon Monofilament for 0.1-mm Anastomoses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Plastic Surgery	6. 最初と最後の頁 233-236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SAP.0000000000001632	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 吉田周平
2. 発表標題 内径0.1mm以下脈管での吻合テクニック
3. 学会等名 第26回日本形成外科手術手技学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Yoshida
2. 発表標題 COMBINED LYMPHOVENOUS ANASTOMOSIS AND GREAT SAPHENOUS VEIN STRIPPING FOR COMORBID LYMPHEDEMA AND VARICOSE VEINS
3. 学会等名 28th World Congress of Lymphology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Yoshida
2. 発表標題 INDOCYANINE GREEN LYMPHOGRAPHY FINDINGS IN OLDER PATIENTS WITH LOWER LIMB LYMPHEDEMA
3. 学会等名 28th World Congress of Lymphology, (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Yoshida
2. 発表標題 LVA (Lymphovenous anastomosis) aids wound healing in lymphedema: Relationship between lymphedema and delayed wound healing from a view of immune mechanisms,
3. 学会等名 28th World Congress of Lymphology, (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shhei Yoshida
2. 発表標題 Modified Intraoperative Distal Compression Method for Lymphaticovenous Anastomosis with High Success and a low Venous Reflux Rates,
3. 学会等名 28th World Congress of Lymphology, (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Yoshida
2. 発表標題 Mechanical Dilatation With a Nylon Monofilament for 0.1-mm Anastomoses
3. 学会等名 American Society for Reconstructive Microsurgery 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田周平
2. 発表標題 Mechanical Dilation法による内径0.1mm以下脈管吻合法の開発
3. 学会等名 日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田周平
2. 発表標題 Mechanical Dilation法による内径0.1mm以下脈管吻合法の開発
3. 学会等名 日本マイクサージャリー学会
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関