

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592144

研究課題名（和文） 小型実験動物におけるリンパ管マッピングー頭頸部を中心にー

研究課題名（英文） Lymphatic architecture of the small experimental animals.
ーHead and neck regionsー

研究代表者

藤村 朗 (FUJIMURA AKIRA)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：80173459

研究成果の概要（和文）：小型実験動物マウスの口腔領域の詳細なリンパ管構築を検索した。その結果、歯根膜および顎骨内以外の口腔領域にはリンパ管が存在した。粘膜下には盲端を有するリンパ管網が亀甲状を呈して存在し、部位によってその分布量が異なっていた。すなわち、薬剤投与の観点から、投与部位としては歯肉が有効であると推測された。特に歯間乳頭部や歯肉溝上皮下のリンパ管構築は有効に使えるものと思われた。

研究成果の概要（英文）：I have studied the detail of lymphatic architecture in the oral region of mouse as a small experimental animal. There were lymphatic vessels in the oral region except for in the periodontal ligament or in the mandible. There were hexagonal network of the lymphatic vessels which had the blind-end lymphatic vessels beneath the mucosal epithelium and the quantity of lymphatic vessels differed in each parts. From the drug administration point of view, the gingiva was good part for drug administration. Especially, I think that the lymphatic vessels in the interdental papilla and beneath the sulcal epithelium were very useful.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）

1. 研究開始当初の背景

近年の癌治療における化学療法の発達、歯周疾患の予防および治療、さらには浮腫の治療の観点から、リンパ管による局所の吸収機能に注目が集まっている。しかしながら、リンパ管に関する記載のほとんどは肉眼解剖的に観察可能な胸管およびリンパ本幹についてであり、各臓器のリンパ管構築の特徴は一切検索されていない。頭頸部領域において

は諸臓器のリンパ管構築および所属リンパ節への経路すら未だ不明確である。その理由にはリンパ管が切片にした場合、組織化学的、免疫組織化学的に血管系、特に細静脈との鑑別が確実ではなく、これらの手法が臓器の全体像を把握するには程遠い手法であること、頭頸部領域、特に口腔周囲では骨、歯の存在から切片作成には脱灰操作が必要なため、酵素および抗体の活性が低下、または喪失し、

染色が困難であることが挙げられる。

2. 研究の目的

過去にリンパ管の三次元再構築像作成のための技術開発、さらにその結果を元にマウス頭頸部全体のリンパ管構築を三次元的に系統的にまとめた上で、周囲組織、特に血管との関係を統合的に解明する。加えて、リンパ管構築の観点から、腫瘍、感染等の転移経路、感染経路を明確にした上でリンパ管を薬剤輸送経路として応用し、用量依存性に発生する副作用を惹起させない量の薬剤による有効な投与方法、部位を実験動物であるマウスにおいて検索することを目的としている。

3. 研究の方法

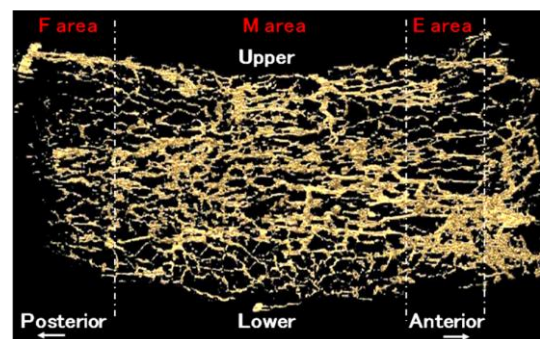
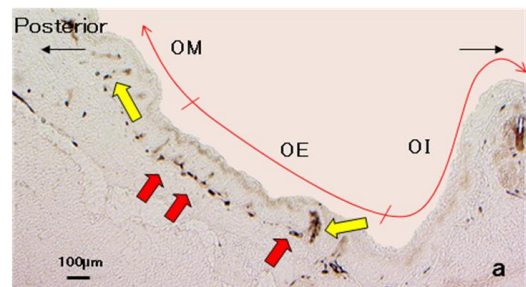
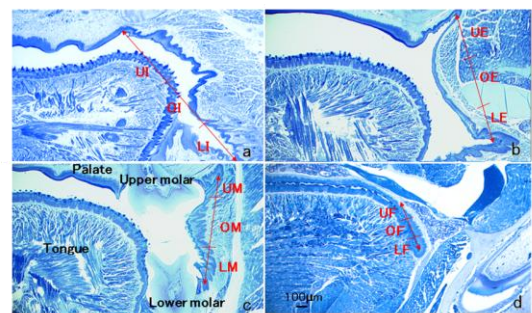
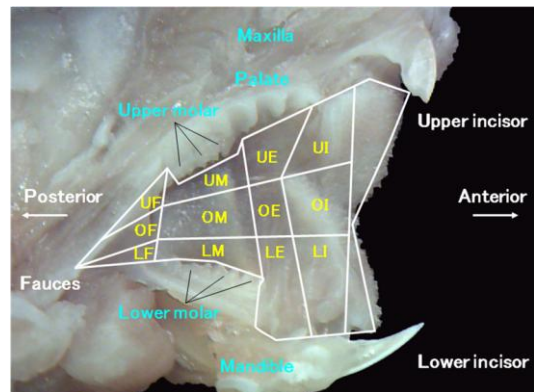
岩手医科大学実験動物センターにて飼育しているマウス成体頭頸部および全身(岩手医科大学動物倫理委員会承認済)を非脱灰のまま、また、一部は10%EDTA-4Naにより、マイクロウェーブ(現有)照射下にて迅速脱灰を施す。磷酸緩衝液にて洗浄後、試料を液体窒素にて凍結包埋し、試料台に付着する。大型クライオスタット(Bright社製、現有)または試料ステージにブロック温度を設定する機能のついたリサーチ用高機能凍結マイクローム(ライカ社製、現有)にて5 μ m連続切片(前額断、矢状断、水平断)をフィルム・トランスファー法(クライオ・キット:ファインテック社)にてタングステンカーバイド刃および替刃(凍結切片用)にて作成した。切片は組織像を把握するためにトルイジン・ブルー染色を施し、染色を終えた切片は全体像および目的とする観察部位の拡大像を二次元画像としてコンピュータに入力した。困難であるため、別途ステージが必要となる。入力した二次元画像は、スライドガラス上での切片の方向が様々であるため、軸合わせを行った。脈管のみの観察では全体の走行を統合的に把握できないので、頭頸部の骨、筋等の基本構造の三次元再構築像が必要となる。局所の観察撮影を行った二次元画像の軸合わせを施した後、リンパ管および血管、神経、その他の構造を抽出し(画像処理ソフト:Adobe PhotoShop ver.6.0、現有)、閾値処理後、ボリュームレンダリング法によって三次元再構築(三次元再構築ソフト:VayTec, Voxblast ver.2.3.3、現有)を施した。再構築後、アニメーション機能により、回転画像を作成し、リンパ管構築を様々な方向から観察し、それぞれの構築の特徴を見出す。

4. 研究成果

頬粘膜下リンパ管構築

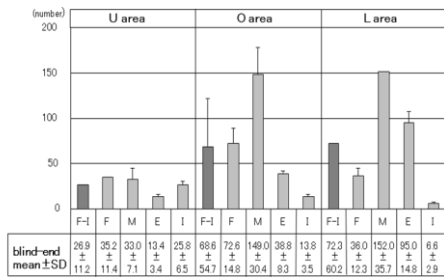
マウスを用いて頬粘膜下リンパ管構築とその分布を酵素組織化学染色とコンピューターグラフィックを併用した三次元再構築法で検索した。組織像の検索から頬粘膜を上下的には、咬合平面相当領域頬粘膜、咬合平面相当領域より上方の頬粘膜、咬合平面相当領域より下方の頬粘膜の3区分に、前后的には、切歯相当領域の

頬粘膜、無歯部相当領域の頬粘膜、臼歯相当領域の頬粘膜、口峡部の4区分に分け検討を行った。リンパ管は、頬粘膜上皮皮下で、網目を構成していた。



網目は血管網より細かな網目であった。咬合平面相当領域頬粘膜では、粘膜直下の筋膜上の集合リンパ管に向かう前集合リンパ管が確認できた。盲端は丈の低い結合組織乳頭にも侵入しており、数としては、下顎臼歯相当

頰域の頰粘膜、咬合平面相当領域で臼歯相当領域の頰粘膜で、最も多かった。次いで、下顎無歯部相当領域の頰粘膜、咬合平面相当領域の口峽部の順であった。



	UF	UM	UE	UI	OF	OM	OE	OI	LF	LM	LE	LI
shape	S	S	S	S	G & S	G & S	G & S	S	S	S	S	S
length	short	short	short	short	long	long	short & long	short	short	short & long	short & long	short
thickness	thin	thin	thin	thin	thin	thick	thick	thin	thin	thin	thin	thin
network	small	large	large	large	large	large	large	small	small	small	small	large

粘膜炎の角化層の厚さや上皮層全体の厚さは薬剤浸透性に影響を及ぼすと考えられるが、即効性の必要な薬剤については上顎臼歯相当領域の頰粘膜が浸透性の観点から有効であり、分子量の大きな薬剤に関しては咬合平面相当領域で臼歯相当領域の頰粘膜が投与部位として有効であると推測できた。

歯根膜リンパ管構築

矯正力に対する歯周組織の変化の把握は、歯の移動機構解明のために重要である。過去の研究において歯の移動時に歯根膜脈管系が大きな変化を示し、血管が骨改造現象に深く関与する報告は多くなされている。そこで我々は、骨改造現象に際して、微小血管動態を的確に捉えるには、排導系の一端を担うリンパ管も同時に観察する必要があると考えた。本実験は、マウス下顎骨の歯根膜リンパ管の分布状況をLYVE-1免疫組織化学染色によって明らかにし、今後のマウス臼歯移動実験の基礎データを作成することを目的とする。

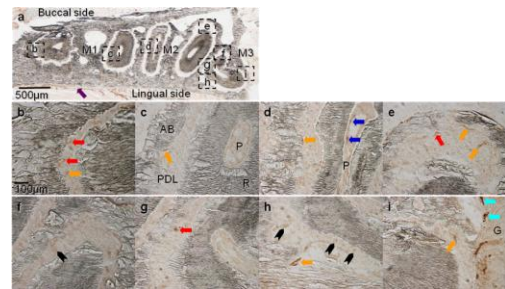
実験方法としては、凍結切片によるfilm-transfer法を用いて、非脱灰2μm連続切片を製作し、LYVE-1免疫組織化学染色を実施した。

歯根膜のLYVE-1陽性リンパ管は、歯根膜血管や周囲組織のリンパ管と比較して非常に粗な分布を呈し、その免疫活性は低かった。いずれのLYVE-1陽性リンパ管も根尖部歯根膜内の歯槽壁に近接して存在していたが、水平方向の吻合は認められず、網目の形成も無かった。

特に歯根中央1/3には、LYVE-1陽性リンパ管はほとんど認められなかった。

また血管と異なり、歯根膜から歯肉・骨髄へ連絡する経路は確認されなかった。根尖部歯根膜のLYVE-1陽性リンパ管は、傘の骨組み状に走行し、歯髄のリンパ管と共に下顎管内集合リンパ管に連絡していた。

この歯根膜のLYVE-1陽性リンパ管の粗な分布は、歯根膜リンパ管の吸収機能が非常に低いことを示しており、血管透過性が高まる炎症が歯根膜に発生した際には、他の組織より浮腫改善能力が低いことを形態学的に示していると思われる。

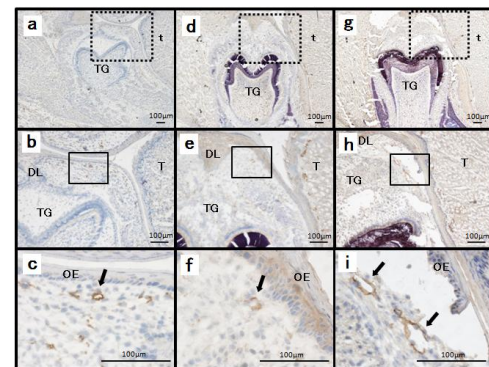


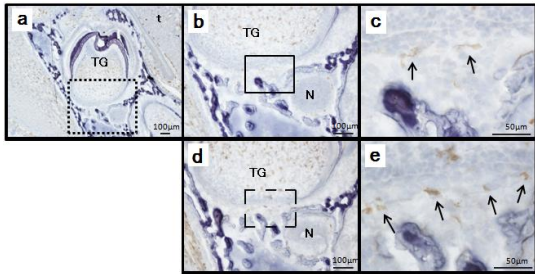
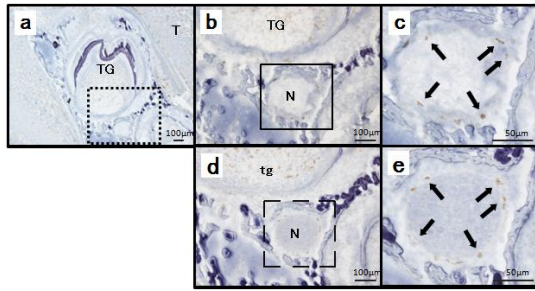
これは矯正臨床において、歯の移動時に歯根膜に血溜り帯が生じた場合も同様で、組織液貯留による歯根膜の内圧上昇につながり、歯の移動時の疼痛発現の一因となると考えられる。

歯根の発生中の歯根周囲リンパ管

出生直後から2週齢までのマウス科学第一臼歯の歯根形成期の歯根周囲（歯根膜）リンパ管を観察した。前述の完成歯根周囲にはリンパ管が根尖部にしか観察されなかったが、歯根発生中にも存在しないのか、すなわち、最初から形成されないのか、できたものが消失するのかを検証した。

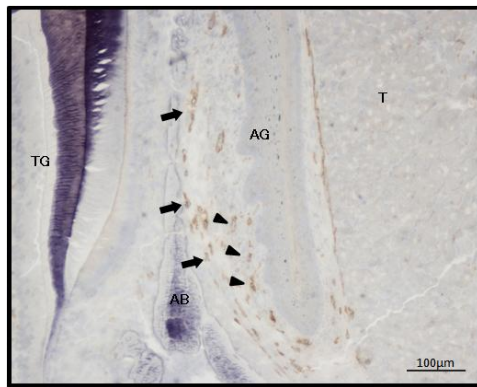
結果は、口腔上皮にはリンパ管網は存在するが、歯根および、歯小囊周囲にはLYVE-1陽性リンパ管の出現を認めなかった。





成体で観察された根尖部リンパ管も2週齢マウスの下顎管内には認めるものの、下顎第一臼歯歯根形成端にはリンパ管を認めなかった。

すなわち、ヘルトヴィッヒ上皮鞘が存在する部位にはLYVE-1陽性リンパ管を認めなかったということになる。本研究はネガティブデータではあったが、外胚葉性中胚葉という特殊な環境におけるリンパ管の発生を観察したという意味では重要であると考えられる。



外胚葉から発生する皮膚、粘膜下にはすでにLYVE-1陽性リンパ管が確認できている。

また、筋肉内でもリンパ管を確認できているにも関わらず、外胚葉性中胚葉存在部位にはリンパ管が発生しないということに何らかの阻害因子の存在を考える必要があることを示唆しているものと考えられる。

自由歯肉のリンパ管構築

頭頸部領域のリンパ管構築の検索は実験動物に関する研究報告が主である。リンパ管

を同定するための検査法が発達した現在でも諸臓器の個別の検索はあまり進展しておらず、ヒトの口腔内に関する報告もほとんどない。薬物投与経路としてリンパ管の利用を視野に入れ臨床研究を行うにあたり、ヒトの試料を用いて歯肉のリンパ管の形態学的特徴を知ることはきわめて重要である。そこで今回、歯周外科治療時に切除した歯周炎罹患歯肉を用いて歯肉上皮下のリンパ管構築の検索を行った。

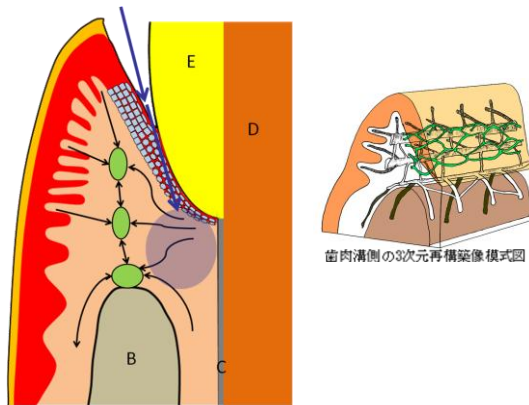
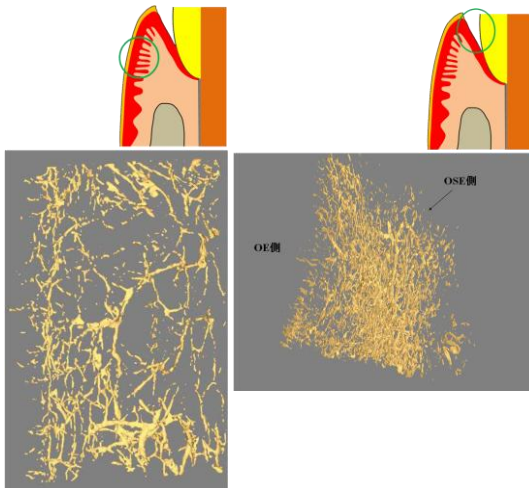
歯肉リンパ管 (5'-Nase像)



リンパ管内皮の酵素活性は、血管内皮の酵素活性と異なる。5'-Nucleotidase酵素活性はリンパ管で高く、血管で低い。5'-Nase反応(鉛法)では、リンパ管内皮の反応生成物であるリン酸鉛を硫化アンモニウム溶液で反応させ、硫化鉛の黒褐色の呈色を得る。

口腔上皮側

歯肉溝上皮側



歯肉断面図:リンパの流れ

歯肉溝側の3次元再構築像模式図

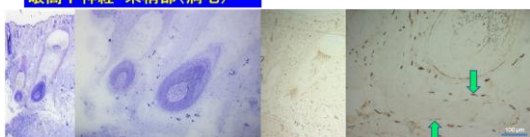
臨床的に正常と判定した歯肉のうち、遊離歯肉の口腔上皮側のリンパ管形態には大きな差異は確認されず、上皮下のリンパ管網から結合組織乳頭中にリンパ管の盲端が派出し

ていた。歯肉溝上皮下にも網目の粗いリンパ管網が確認され、形態学的には口腔上皮側のリンパ管網の方が吸収効率の高い形態を示した。しかし、臨床応用として歯肉を経由した薬物投与を考慮した場合、口腔上皮側は角化層に覆われているが、付着上皮側は細胞間隙が広く、物質の透過性も高いので、歯肉溝を経由した薬物投与の方が有効であろうと考えられた。また、正常と判定した歯肉と病態歯肉の盲端部のリンパ管の形態の差異は、炎症における組織液の吸収効率等が関係していることが示唆された。

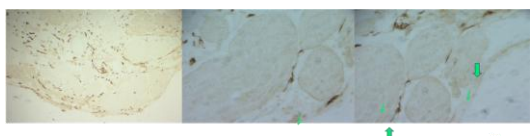
末梢神経内リンパ管構築

高齢者のアンチエイジングにおける顎骨の改造現象には脈管系の動態が重要であり、治療における骨の再生には血管新生が必須となる。この脈管系の改善の根幹は栄養と酸素供給および排出のバランスであり、臓器の再生には脈管系の再生が先行する。特に、排導系の静脈とリンパ管の再生（新生）は最も重要である。血管系はすでに臓器ごとの構築の特徴が検索され、臨床にも応用されているが、リンパ管に関しては存否そのものが確定していない臓器もみられ、その構築はほとんど検索されていない。我々はすでに組織再生に重要な役割を担っているリンパ管の口腔領域各臓器の構築を動物やヒトにおいて報告しており、さらに薬剤投与経路としての応用の観点から、薬剤吸収経路の検索およびリンパ管指向性薬剤の開発の方向に研究を進めている。一方、臓器の再生には神経の再分布も不可欠であり、その神経を養っている脈管系の構築は重要である。

眼窩下神経 末梢部(洞毛)



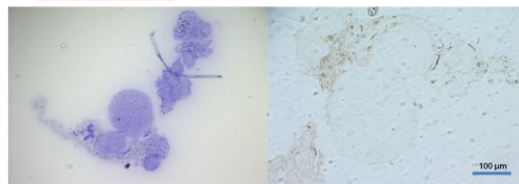
眼窩下神経 眼窩下孔付近



眼窩下神経のリンパ管観察は、眼窩下孔付近と洞毛根付近の2か所を観察した。洞毛根付近の神経線維束は神経周膜(100 μm)に包まれており、その周囲には10-20 μmのリンパ管が存在したが、周膜内への侵入は認められなかった。一方、眼窩下孔付近では複数の神経周膜に包まれた神経束がさらに神経上膜につつまれて300x1500 μmの束となって存在した。神経上膜の周囲にはリンパ管(5-10 μm)が存在し、上膜内に侵入し、さらに神経周膜(100 μm)周囲のみならず、

周膜内にもリンパ管(5 μm)は侵入していた。しかしながら、リンパ管は多くて2本、ほとんどは1本観察されるのみであった。

顔面神経



坐骨神経



比較として観察した顔面神経は神経上膜(100-200 μm)内で神経周膜につつまれた神経線維束が密に認められ、上膜内には血管とリンパ管の侵入を観察できたが、周膜内への侵入は観察できなかった。坐骨神経ではリンパ管が数本神経上膜内に観察されたが、神経周膜は観察できなかった。

眼窩下神経と顔面神経のリンパ管の分布の相違が、知覚神経と運動神経の違いによるものなのかは解明できなかったが、単に太さの違いではないことは明らかであった。

今回の報告では、神経周膜内にもリンパ管が、数は少ないが存在することを明らかにすることができた。神経周膜内でのリンパ管の分布が少ないことは、逆に考えると、神経再生時に1本のリンパ管の果たす役割が大きいことを認識すべきであると考えた。

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8件)

- 佐藤 大, 藤村 朗: 頬粘膜下リンパ管の構築と分布量, 岩手歯誌 34(1):7-17, 2009
- Mikiko Masuyama, Akira Fujimura: Lymphatic distribution in the mouse periodontal ligament., MVRC 3(1):2-10, 2010
- Min-Ying Liao and Akira Fujimura: The distribution of lymphatic vessels in gingiva., MVRC 2(1):2-7, 2008
- 藤村 朗, 野坂 洋一郎: 口腔領域のリンパ管構築 - 薬剤投与経路としての応用 -, リンパ学 31:2-5, 2008
- Sera, K., Itoh, J., Goto, S., Saitoh, Y., Fujimura, A., Nosaka, Y., Noda, Y., Nishizuka, S. and Wakabayashi, G.: Quantitative Analysis of Very Small Quantity of Organs Taken from Patients an

d Experimental Animals; Standard-free Method for Organ Samples., Int'l Journal of PIXE 18 -3, 4 111-122, 2008

- Yoshinori Ando and Akira Fujimura: Lymphatic architecture of human periodontal tissue beneath the oral epithelium of the free gingiva., MVRC 3(1): 17-24, 2010
- Atsumi Chiba, Akira Fujimura: Architecture of blood vessels in the mouse infraorbital nerve., MVRC 4(1): in press, 2011
- Munenori Kikuchi, Akira Fujimura: The distribution of lymphatic vessels in the periodontal ligament during tooth root formation., MVRC 4(1): in press, 2011

[学会発表] (計 12 件)

- 藤村 朗: 頭頸部領域の排導系: 第 115 回日本解剖学会全国学術学会, 2010. 3.
- Akira Fujimura, Ikumi Sugiyama, Yasuyuki Sadzuka, Yohichiro Nozaka: The development of sustained release preparation. -Local administration using the lymphatic system-: 第 35 回日本微小循環学会, 2010. 2.
- 千葉淳実、藤村 朗、鹿島悠子、鎌田 俊、佐藤雅仁、野坂洋一郎、城茂治: 神経ブロック後の眼窩下神経再生に伴う血管構築変化 -健常マウスの眼窩下神経内血管構築-: 第 37 回日本歯科麻酔学会学術集会, 2009. 10.
- 藤村 朗、小野寺政雄、大澤得二、野坂洋一郎: 顔面皮下のリンパ管分布: 日本解剖学会第 55 回東北・北海道連合支部学術集会, 2009. 9.
- 菊池宗法、藤村 朗、小野寺政雄、大澤得二、清野幸男、野坂洋一郎、三浦廣行: 歯周組織のリンパ管構築の発生: 第 51 回歯科基礎医学会学術大会, 2009. 9.
- 藤村 朗、安藤禎紀、菊池宗法、千葉淳美、桑島幸紀、小野寺政雄、野坂洋一郎: ヒト顔面の皮下リンパ管構築: 第 33 回日本リンパ学会総会, 2009. 7.
- Yoshinori Ando, Atsumi Chiba, Masao Onodera, Akira Fujimura, Kazushi Kunimatsu and Yohichiro Nozaka: Lymphatic vessels in healthy and diseased human gingiva.: 第 34 回日本微小循環学会, 2009. 2.
- 安藤禎紀、藤村 朗、村井 治、野坂洋一郎、國松和司: ヒト歯肉のリンパ管構築 -正常と病態-: 第 51 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2008. 10.
- 藤村 朗、安藤禎紀、古城慎太郎、香木千尋、小野寺政雄、大澤得二、野坂洋一郎: ウサギ耳介のリンパ管構築: 第 50

回歯科基礎医学会学術大会, 2008. 9.

- 藤村 朗、安藤 禎紀、佐藤 弘樹、佐藤 大、小野寺 政雄、野坂 洋一郎: 口腔領域のリンパ管構築 -マウス上顎舌側歯肉-: 第 32 回日本リンパ学会総会, 2008. 6.
- 藤村 朗、野坂 洋一郎、世良耕一郎: 頬粘膜および口蓋粘膜経由の抗癌剤投与: 第 14 回 NMCC 共同利用研究成果発表会, 2008. 5.
- 藤村 朗、小野寺政雄、野坂洋一郎: 口腔領域のリンパ管構築 -薬剤投与経路としての臨床応用-: 第 113 回日本解剖学会全国学術学会, 2008. 3.

[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

藤村 朗 (FUJIMURA AKIRA)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号: 80173459

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: