

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09874

研究課題名(和文)細胞外微小環境の制御による次世代のリンパ節移植術の開発

研究課題名(英文)Development of non vascularized lymph node transfer by regulation of ECM

研究代表者

古川 洋志 (FURUKAWA, Hiroshi)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：00399924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管吻合の不要なリンパ節移植の開発を、ラットのリンパ節移植モデルを作成し移植後4週間で、リンパ流の再開通と移植リンパ節の病理組織学的検討を行った。移植リンパ節の63%にリンパ流の再開通を認め、63%にリンパ節の構造を認めた。他は変性や壊死を認めた。成績向上を目指して、リンパ節を破碎して懸濁液として移植する試み(マイクログラフト法)、懸濁液のゲル化(コラーゲンとフィブリン)や、人工真皮併用による移植方法へ研究を進めた。セルブロック法での懸濁液の観察は、細胞塊が観察されたが、ゲル化し移植した結果は移植組織の同定が困難であった。人工真皮併用では移植した人工真皮とその内部にリンパ節の細胞を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のリンパ節移植術では、リンパ節の構造の温存を優先して、細胞の生着やリンパ管新生のポテンシャルを後回しにしているのではと考えた。そこで臨床で既に使用されている組織破碎器を用いて、リンパ節の構造を一旦破碎して移植するマイクログラフト法を検証することとした。細胞外微小環境の制御としてコラーゲンゲルとフィブリンゲルを用いて、破碎された組織の足場として破碎リンパ節と共に移植した。移植には成功しなかったが、人工真皮では組織の定着を認めた。リンパ節などの小器官は、マイクログラフト法により、血管吻合を要しない次世代の移植へと進むと思われる。

研究成果の概要(英文)：We try to develop non vascularized lymph node transfer by regulation of ECM using rat model. By simple lymph node transfer model, 4 weeks after transfer, 63% transferred lymph nodes presented lymph flow detected by patent blue, and 63% re-harvested nodes presented normal structure by histopathological examination. Then, the transfer methods were modified as follows; fragmentation of lymph node was performed by RegeneraTM. ECM gel (collagen and fibrin) was conjugated before transfer, but 4weeks later, transferred tissue could not be detected. Then the group of artificial dermis conjugated fragmented lymph node was tried and lymph node cells were detected after 2 weeks later.

研究分野：形成外科学

キーワード：リンパ節移植術

1. 研究開始当初の背景

近年リンパ浮腫に対して血管柄付きリンパ節移植やリンパ管静脈吻合が行われているが、どちらも高度な技術を必要とし一般的に普及しているとは言えないのが現状である。Cornlissenらの報告によるとリンパ節移植の際に血管吻合を行うとリンパ節の生存確率は向上するが、リンパ管の開通率に有意差は認めなかったと報告している。2016年に研究代表者らは血管吻合の不要なリンパ節移植についての研究を開始した。研究代表者らはマウスを用いて、膝窩リンパ節を切除した群、切除した後にリンパ節を移植した群でリンパ流の回復を検証した。その結果、移植リンパ節に蛍光標識デキストランの集積も確認され、リンパ管との連続性が確認された(Maeda T, et al. *Lymphat Res Biol.* 2018)。一方Ishikawaらの報告によると、ラットでリンパ節移植を行なった際に、移植リンパ節の組織学的所見として、周囲の炎症と線維の増加、辺縁洞の肥厚がみられたと報告している。そこで我々は移植リンパ節周囲の瘢痕形成を抑制するために、リンパ節の破碎や、懸濁液のgel化などの工夫によりリンパ管の再開通の確率が上昇するのではないかと仮定し、実験を行った。

2. 研究の目的

ラットにおける血管吻合の不要なリンパ節移植 の開発

3. 研究の方法

【実験1：破碎しないリンパ節移植】本研究では、分子生物学的手法を用いるが、動物モデル作成はルーペの使用により実施可能（スーパーマイクロサージャリーが不要）であることを目的とするため、マウスではなくラットによる研究に変更した。6匹のリタイヤラットを使用した。全身麻酔下にパテントブルー皮内注射によるリンパ節の同定、摘出、そして摘出部位への血管吻合を行わない状態での再移植を行った。その後ラットをそれぞれ2日、4日、1週間、2週間、4週間、8週間後に再度全身麻酔を行いパテントブルー皮内注射によるリンパ管の再開通の有無を調査した。また一部のリンパ節に関してはパラホルムアルデヒドで固定した後HE染色を行いリンパ節や周囲組織の観察を行った。

【実験2：破碎したリンパ節移植(マイクログラフト法)】200gのラットに対し三種混合麻酔を腹腔内注射し全身麻酔を行い、両鼠蹊部からパテントブルーで染色したリンパ節を採取した。リジェネラ®を用いて粉碎化したリンパ節の組織懸濁液を作成した。懸濁液のgel化を行い、移植床内での定着を目指した。gel化はcollagen gelとfibrin gelを用いて行なった。次に人工真皮を用いた移植法を検討した。懸濁液を人工真皮に浸透させ、リンパ節を採取した右鼠蹊部に移植し閉創した。対照として生理食塩水を浸透させた人工真皮を左

鼠蹊部に移植した。1週間後に移植した周囲の軟部組織を摘出し、HE染色を行い切片を比較した。移植前の懸濁液の検証をセルブロック法で固定しHE染色して確認した。

4. 研究成果

【実験1】6例中2例で再摘出されたリンパ節のパテントブルーによる染色を認めた。またHE染色では移植後1週間のものと2週間のもの双方で節内細胞の細胞核の脱失等の壊死所見を認めた。移植後1週間の時点でリンパ節の壊死が生じていた。2週間時点でも壊死を認めたが、一方リンパ管の再開通を示唆するパテントブルーの染色を示すラットも存在した。そこで、再度リンパ節移植モデルを作成し移植後4週間で時間を固定して、パテントブルー染色によるリンパ流の再開通と移植リンパ節の病理組織学的検討を行った。リンパ流の再開通を示すのは63%、病理学的に構造を維持していたのも63%であった。それぞれは必ずしも1対1対応ではなかった。他は病理学的に変性や壊死、消失を認めた(第31回日本形成外科学会基礎学術集会にて研究分担者の有沢が報告)。これにより無細胞になったリンパ節であっても、リンパ液を還流する器官として機能する可能性があると思われた。



図1

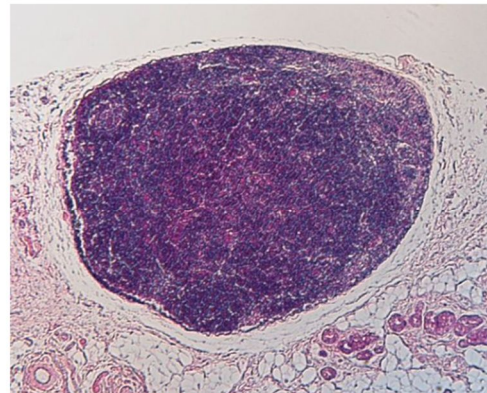


図2

上図:移植後4週間で再度摘出されたラット鼠蹊リンパ節の肉眼所見とHE染色。図1:パテントブルーで中央が染色された移植後4週間のリンパ節。図2:同一のリンパ節のHE染色。リンパ節の構造は保たれている。

【実験2】セルブロック法での懸濁液の観察は、細胞塊が観察されたが、gel化し移植した切片では吸収が早く、移植部分の同定が困難であった。人工真皮を用いた移植法では移植した人工真皮とその内部に粉碎したリンパ節と思われる細胞を確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有沢宏貴、梅本泰孝、田中真美、坪井憲司、早川将史、古川洋志、渡辺秀人
2. 発表標題 ラットを用いた新しいリンパ節移植の開発
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022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	有沢 宏貴 (ARISAWA Kouki) (50850707)	愛知医科大学・医学部・助教 (33920)	
研究分担者	渡辺 秀人 (WATANABE Hideto) (90240514)	愛知医科大学・付置研究所・教授 (33920)	
研究分担者	梅本 泰孝 (UMEMOTO Yasutaka) (90465526)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	
研究分担者	田中 真美 (茂利真美) (TANAKA Mami) (00634156)	愛知医科大学・医学部・助教 (33920)	

6. 研究組織（つづき）

	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	石川 早紀 (ISHIKAWA Saki) (20768915)	愛知医科大学・医学部・助教 (33920)	
研究分担者	安村 恒央 (YASUMURA Tsuneo) (60436607)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	

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