

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23890081

研究課題名（和文）

肥満がむくみに及ぼす影響の検討ーリンパの流れに着目してー

研究課題名（英文）

Effect of obesity on lymph flow in rats

研究代表者

佐伯 街子 (MACHIKO SAEKI)

名古屋大学・医学系研究科（保健）・助教

研究者番号：60610756

研究成果の概要（和文）：

リンパ浮腫の増悪因子として肥満があるといわれているが、その根拠となる情報は不足している。本研究では正常体重(control)ラットと肥満ラットに対し、MRI、免疫組織学、ICG 蛍光リンパ管造影を行い、肥満がリンパの流れに及ぼす影響を検討した。肥満ラットの MRI 画像では大腿部において脂肪+水の層の肥厚が観察された。この肥厚部位の組織に対し HE 染色を施行したところ、脂肪組織の肥厚と脂肪細胞の肥大が観察された。加えて、リンパ管内皮細胞を識別する抗 Podoplanin 抗体による免疫染色を施行した。この結果、リンパ管は脂肪組織周囲の結合組織に存在し、肥満ラットと control ラットではリンパ管の形状に大きな違いは認められなかった。ICG 蛍光リンパ管造影では control ラット、肥満ラットとも liner 状に走行するリンパ管が観察され、浮腫を示す所見は認められなかった。肥満だけではリンパの流れに大きな影響を与えるほどの変化は起こりにくいことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Obesity has been considered as one of the risk factors for lymphedema. However, the evidence indicating such risk is still scarce. In the present study, we examined the influences of obesity on lymph flow. Using magnetic resonance imaging (MRI), indocyanine green (ICG) fluorescent imaging, microscopic observation of hematoxylin-eosin staining sections and immunohistochemistry, we revealed morphological and functional characteristics of obesity rats lymph vessels, in comparison with normal (control) rats. In addition, we measured the thickness of the portion of the scapula and the femur by MRI. MRI showed that the fat and free-water fractions in the obese rats were greater than those in the control rats. Microscopic examination revealed that the adipose tissue in the obese rats was thicker than that in the controls. Pathognomonically, the adipocytes in the obese rats were larger than those in the controls. Immunohistochemical staining by anti-podoplanin antibody were useful to identify lymphatic vessels, because its endothelial cells were specific positive in anti podoplanin-reaction. Both of obesity and control rats showed the presence of lymphatic vessels in the connective tissue surrounding the adipose tissue. Between these lymphatic vessels, there were no especially-conspicuous differences in the shape. ICG fluorescent imaging showed a linear pattern of lymph flow which is normal sign and the absence of a dermal backflow pattern which is lymphedema sign. In conclusion, obesity alone does not affect lymph flow.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：看護学・基礎看護学

キーワード：医療・福祉、看護学、肥満、リンパ、浮腫

1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療後のリンパ浮腫の患者が増加しており、臨床の現場において、浮腫を抱える患者に関わる機会が多い。がん治療後のリンパ浮腫は、がん手術時のリンパ廓清によるものや術前術後の放射線療法による組織の線維化によるものなどがあり、難治性である。発症すると身体的苦痛や浮腫による活動制限、これに伴い自立性の低下や仕事上の困難が生じるため、早期発見と早期治療が効果的であると言われている。また、予防することも重要であり、平成 22 年度の医療報酬の改定では、複合的理学療法など、患者にセルフケアを指導することにも力が注がれるようになった。しかし、肥満に関しては、疫学調査においてリンパ浮腫の増悪因子であることが報告されているにも関わらず、そのケアについては医療報酬の観点からは注目度は低い。「リンパ浮腫ガイドライン」では、肥満対策は「ある程度の臨床的合意がある」とされている一方で、「有効性を示す根拠はない」とも指摘されている。言い換えるなら、「肥満はリンパ浮腫に対して良くない」と漠然と感じつつも、その根拠がなく、ケアにつながる研究結果が未だ不足している状態である。

2. 研究の目的

肥満によるリンパ液の貯留には、①肥大した脂肪細胞がリンパ管を物理的に圧迫することでリンパ管を塞栓させる、②組織間隙に分布する膠原線維や弾性線維の過形成によりリンパ液が繁留される、など仮説があるが、肥満に焦点を当てて、明瞭なエビデンスを提示した研究はまだない。本研究では肥満との因果関係の観点から、生きたままのラットで皮下のリンパの流れを、光造影剤として蛍光特性があるインドシアニングリーン(ICG)を使用し経皮的に観察し、肥満があるときに、リンパ流がどのように滞るかを明らかにする。その後、リンパ液の貯留が観察された部位の組織を採取し、脂肪細胞の構造やリンパ管の変化を、通常の光学顕微鏡観察と免疫組織化学の観察を行い、どのような細胞学的障害が起こっているのかを明らかにする。これらによって、看護師が肥満予防を指導する有効性を明確にする

3. 研究の方法

(1)肥満ラットの作製

Wistar ラット(6 週齢・雄・日本 SLC)26 匹を用いた。室温は 24℃、明暗 12 時間周期

とした。13 匹に先行研究で高脂血症、糖尿病、動脈硬化等の発症が報告されている

QuickFat®(日本クレア)を自由摂取させ、肥満ラットを作製した(肥満群)。control 群(13 匹)は CE-2(日本クレア)を自由摂取のもとで飼育した。

(2)MRI を用いた脂肪分布及び水分分布の観察

ラットはイソフルランによる吸入麻酔下にて、小動物用コンパクト MRIminiSA(DS ファーマバイオメディカル株式会社)を用い撮影した(1T、マルチスライスシーケンス、垂直断面スライス厚 2 mmにて連続撮影)。ラットは腹臥位にて撮影し、画像は肩甲骨と上腕骨、脊椎、食道の位置で同定したスライスを「肩甲骨部」、大腿骨と脛骨の位置で同定したスライスを「大腿部」とした。同一部位の T1 強調画像、T2 強調画像にて、脂肪+水分分布を確認した。(環境順応後と 4、8、12 週後の計 4 回実施。ラットの肥大により、サンプルホルダーに格納できないため 24 週は未実施。)

(3)ICG を用いたリンパ管蛍光造影によるリンパ流の観察

ラットは剃毛し、イソフルランによる吸入麻酔下で、皮下組織に ICG を注入した。(前肢第 1 趾と第 2 趾間、後肢第 1 趾と第 2 趾間)リンパの流れは近赤外線カメラシステム(浜松ホトニクス)を用いて記録し、蛍光で標識したリンパの動態を観察した。(環境順応後、4、8、12、24 週後の計 5 回実施)

(4)組織標本の観察

肩甲骨部及び大腿部の皮下組織をパラフィンに包埋し、3µm 厚の切片を作製後、HE 染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。リンパ管の同定、観察には、リンパ管内皮細胞マーカーとしてリンパ管と血管を確実に見分けるために使われる抗ポドプラニン抗体を用い、連続切片に対し免疫染色を施行した。(環境順応後、4、8、12、24 週後の計 5 回実施)

4. 研究成果

(1)MRI による脂肪及び水の層の厚さの比較

①肩甲骨部

肩甲骨部では、背側正中部の皮下組織で脂肪+水の層が肥厚していた。しかし、そのほかの皮下組織では経時的及び肥満による脂肪+水の層の厚さに変化はみられなかった。

(図 1、2)

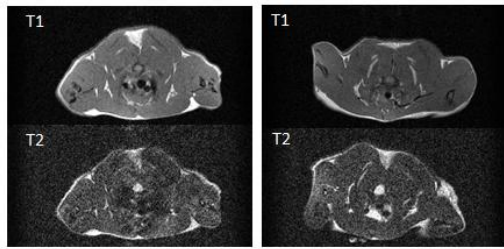


図 1. 肩甲骨部における MRI 画像(飼育 4 週)。

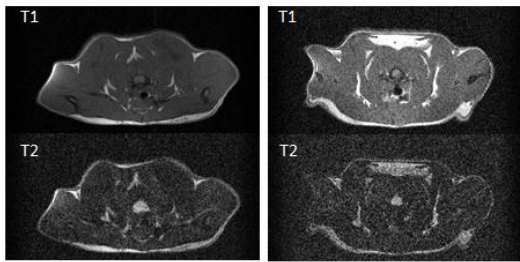


図 2. 肩甲骨部における MRI 画像(飼育 12 週)

②大腿部

大腿部では肥満群においては、内臓脂肪の増加に加え、全周性皮下組織の脂肪+水の層の肥厚(⇒)が観察された。(図 3、4)

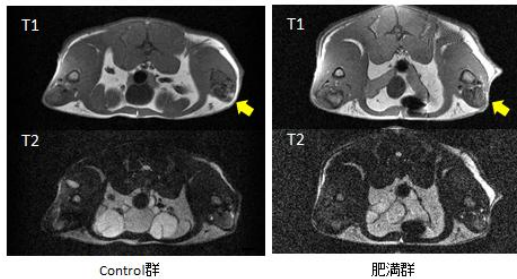


図 3. 大腿部における MRI 画像(飼育 4 週)。

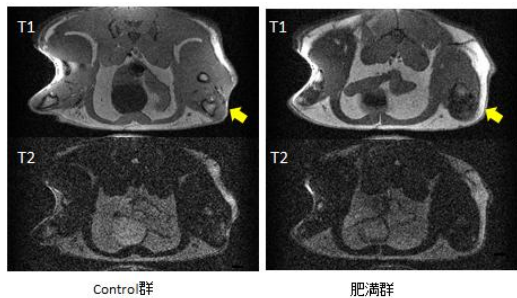


図 4. 大腿部における MRI 画像(飼育 12 週)。

(2)ICG

①肩甲骨部

ICG 注入後、リンパ流は上腕を liner 状に走行し、肩甲骨周囲のリンパ節に達した。(⇒)

リンパ節への到達時間に差はあるものの、control 群、肥満群ともその走行に差はなかった。(図 5)

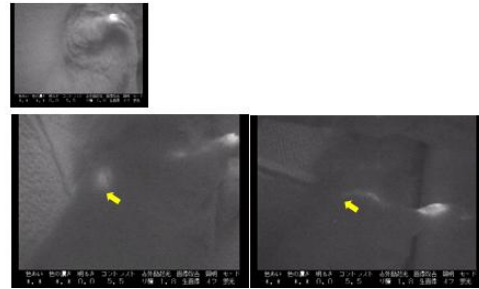


図 5. 肩甲骨部の ICG リンパ管造影(飼育 24 週。)右上: 注入直後 右下: control 群 左下肥満群

②大腿部

ICG 注入後、大腿背面、続いて膝窩に向けて line 状に走行し単径部のリンパ節に達した。リンパ節への到達時間に差はあるものの、control 群、肥満群とも liner 状に走行するリンパ管が観察され、浮腫を示す所見である stardust 様の蛍光は認めなかった。(図 6)

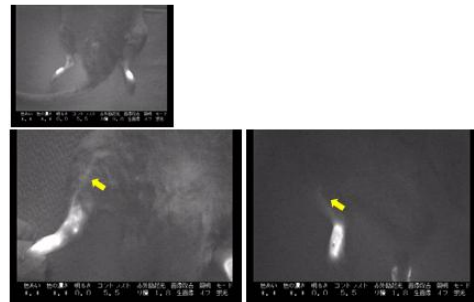


図 6. 大腿部の ICG リンパ管造影(飼育 24 週) 右上: 注入直後 右下: control 群 左下肥満群

(3)HE 染色及び免疫組織学的検討

肩甲骨部と大腿部の組織に対し HE 染色を施行したところ、control 群と比較し、肥満ラット群では脂肪組織の肥厚と脂肪細胞の肥大が観察された。(図 7)

リンパ管内皮細胞を識別する抗 Podoplanin 抗体による免疫染色の結果、リンパ管は表皮に近い部分で多く観察された。また、リンパ管は動・静脈に伴行し、脂肪組織を取り囲む結合組織内に散在していた。連続切片による観察の結果、control 群、肥満ラット群ともにリンパ管内腔の形状は保たれており、大きな違いは認められなかった。(図 8)

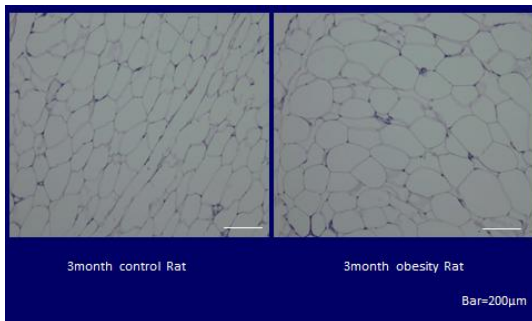


図 7.皮下組織の脂肪細胞の比較(飼育 12 週)

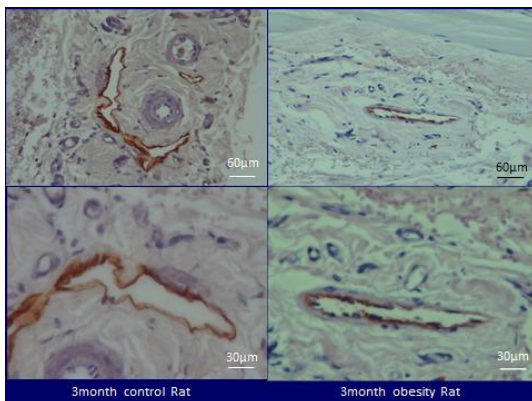


図 8.皮下組織のリンパ管の形状の比較(飼育 12 週)

MRI、ICG 蛍光造影法、組織標本での検討の結果をまとめると、肥満により脂肪組織の肥厚や脂肪細胞の肥大は確認できるものの、肥厚部位のリンパ管は結合組織に囲まれ内腔の形状は保たれていた。研究当初に予測していた脂肪細胞や組織の繊維化によるリンパ管の圧迫は、今回の研究では認められなかった。

以上から、肥満だけではリンパの流れに大きな影響を与えるほどの変化は起こらないことが考えられる。しかし、疫学的には肥満とリンパ浮腫の因果関係について示唆されていることから、今後、リンパの流速やリンパ液の濃度等、リンパの流れに影響を与えると思われる因子について、分子機構の探索を含めた研究が必要であると考えらる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

佐伯街子、大島千佳、永谷幸子、間脇彩奈、竹野ゆかり、林美希、藤本悦子：肥満ラットにおけるリンパの流れについての検討，コ・メディカル形態機能学会第 11 回学術集会，2012 年 09 月 22 日，首都大学東京。

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐伯 街子 (SAEKI MACHIKO)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・助教

研究者番号：60610756

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし