

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592704

研究課題名(和文)皮弁移植後リンパ流を可視化する！～光イメージングを用いた再生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Imaging of lymph flow in mouse model using in vivo imaging system

## 研究代表者

堀内 勝己(HORIUCHI, Katsumi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：60625028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス後肢リンパ浮腫モデルにおいて足底に注入したインドシアニンググリーン(ICG)の蛍光強度の変化をin vivo imaging systemを用いて経時的に測定した。蛍光強度の低下とリンパ流の改善は相関するものと考えた。また足の体積を測定することにより浮腫(むくみ)の程度を定量化し、経時的な観察を行った。浮腫の改善の傾きと、蛍光強度の低下(=リンパ流の回復)の間に一定の相関関係を認めた。

リンパ浮腫の動物モデルを用いた研究において、浮腫の程度を定量化する手法はまだ確立されていない。本研究の結果は今後ひとつの定量化の手法としてリンパ浮腫研究の発展に貢献する可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanism of the improvement of lymphedema using mouse hind limb model, with fluorescence lymphatic imaging using indocyanine green and in vivo imaging system as a fluorescence detector. To evaluate the improvement of lymphedema paw volume was measured using a water displacement plethysmometer. We found a constant correlation between a degree of paw edema improvement and the reduction of the intensity of fluorescence.

研究分野：リンパ浮腫

キーワード：リンパ流 蛍光イメージング In vivo imaging system

1. 研究開始当初の背景

皮膚に外科侵襲を加えた際に寸断された真皮内・真皮下リンパ管網は、術後のリンパ管再生により再開通すると考えられている。その皮弁移行術や植皮術施行後の真皮下リンパ管網の再構築に関しては未だ十分な検討が行われていない。そのためインドシアニングリーン (ICG) と近赤外線光カメラ (PDE) を利用した蛍光イメージング技術を用いてそのメカニズムを解明することを当初の目的としていた。

その後 in vivo imaging system を用いた蛍光強度の測定による浮腫の改善程度の定量化手法の開発へとシフトした。

2. 研究の目的

動物皮弁モデルの作成が困難であったため、マウス後肢リンパ浮腫モデルにおける浮腫の改善の程度と in vivo imaging system で測定した蛍光強度の低下を比較し、浮腫の程度を定量化する新たな手法を開発する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス後肢におけるリンパ浮腫モデルを作成する。

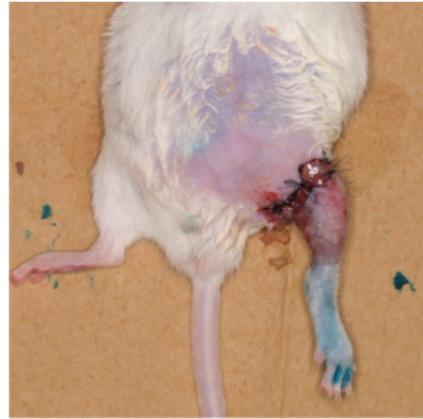
(2) (1) のモデルにおいて術側の足底皮下にジアグノグリーン (ICG:0.1 mg/ml:3 $\mu$ L) を注入し、15分後から300分後までの注入部位の蛍光強度の経時的变化を IVIS を用いて術後2日目から28日目まで測定した。

(3) マウス足容積測定器 (UGO BASILE 社) を用いて経時的に足の容積を測定し、浮腫程度の変化を定量化する。

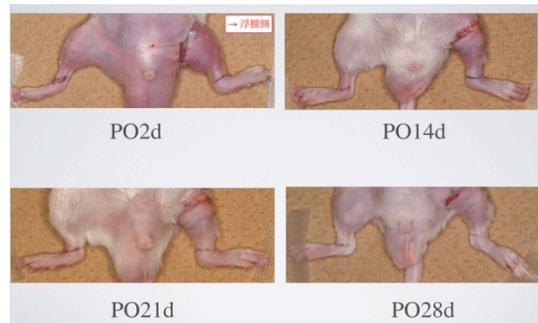
4. 研究成果

(1) マウス後肢リンパ浮腫モデルの作製 (図1、2)

- ① 左後肢の足底に 2%パテントブルーを 5 $\mu$ L 注入
- ② 膝窩リンパ節を摘出
- ③ 中枢、末梢でリンパ管を結紮 (10-0 ナイロン)
- ④ 鼠径部の軟部組織を郭清
- ⑤ 皮膚にギャップを作製し縫合



<図1：リンパ浮腫モデルの作製>



<図2：リンパ浮腫モデルの肉眼的所見>

⑥ 術後2日目より術側の後肢の腫脹を認めた。

⑦ 術後28日目までに経時的な改善を認めた。

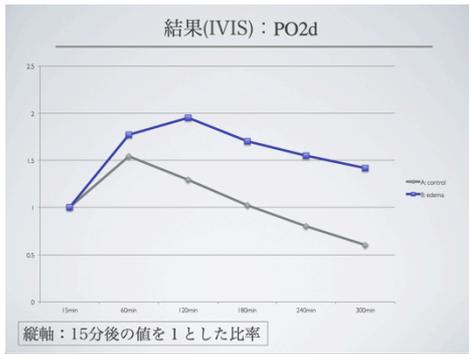
(2) In vivo imaging system を用いた蛍光強度の測定 (図3)

① (1) で作製したリンパ浮腫モデルにおいて測定皮内に ICG (0.1mg/ml:3 $\mu$ L) を注入し経時的に蛍光強度を測定する。

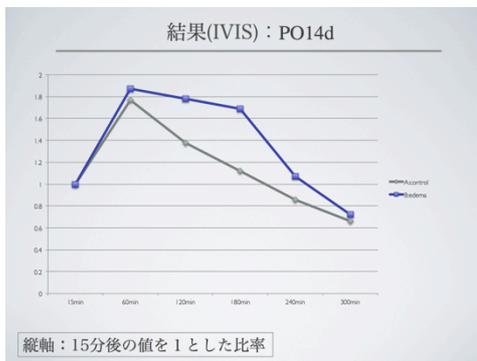


<図3：In vivo imaging system>

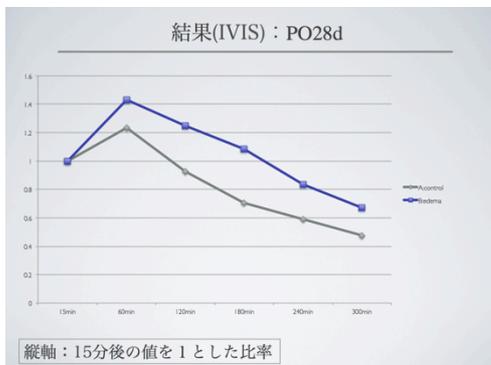
② 15分後から300分後までの注入部位の蛍光強度の経時的变化を IVIS を用いて術後2日目から28日目まで測定した。(図4～6)



<図4：蛍光強度の推移（術後2日目）>



<図5：蛍光強度の推移（術後14日目）>

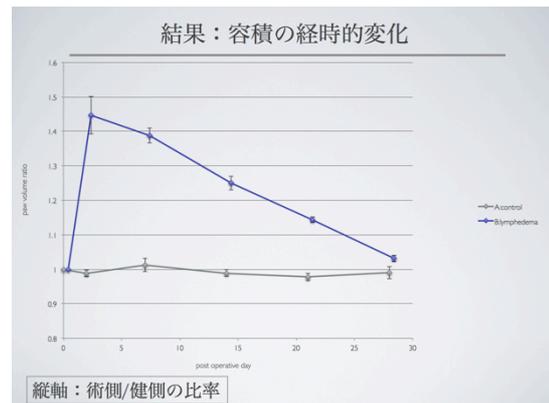


<図6：蛍光強度の推移（術後28日目）>

- ③ 術後2日目においては浮腫モデルにおいて蛍光強度の低下が遷延し、control群との乖離を認めた。
- ④ 術後14日目においては浮腫モデルにおける低下の傾きが改善し、300分後の値はcontrol群とほぼ同じとなった。
- ⑤ 術後28日目になると、浮腫モデル、control群それぞれで蛍光強度低下の傾きがほぼ同程度となり、リンパ流の改善が示唆された。

(3) 浮腫（むくみ）の定量化（図7）  
マウス足容積測定器を用いて浮腫の程度を定量化し、比較する。

- ① 術後期間：2, 7, 14, 21, 28日目に於いて容積の測定を行った。
- ② 浮腫側/健側の比率を計算しグラフ化した。

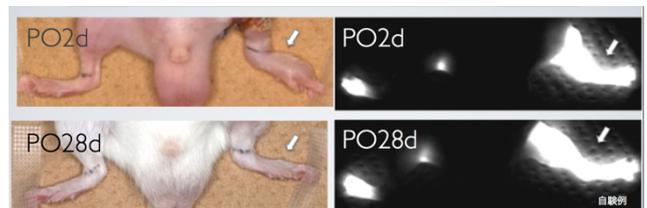


<図7：足容積の推移>

- ③ 術後2日目より、足容積の平均値に乖離を認めた（図7）
- ④ 術後28日目に向かって乖離幅は縮小していき、リンパ流の回復に伴う浮腫の改善が示唆された。

(4) リンパ流のイメージング（図8）  
① インドシアニンググリーン（ICG: 1.0mg/ml）を5  $\mu$ L足底に注入

- ② 20分後に近赤外線カメラ Photo Dynamic Eye（浜松ホトニクス社）を用いて観察



<図8：リンパ流のイメージング>

- ③ PO2dでは著明だった肉眼的な浮腫がPO28dには改善している。しかしイメージング画像ではdermal back flowが残存し、所見の乖離を認めた。

(5) 病理組織学的検討

- ① 病理組織学的検討は本研究期間内に施行することができなかった。
- ② 今後追加する予定である。

(6) 結果の考察

- ① マウス後肢リンパ浮腫モデルの作製ができた。
- ② 経時的な足容積の減少がみられた。
- ③ In vivo imaging systemを用いて蛍光強度を測定し得た。
- ④ ICG は選択的に肝細胞に取り込まれ、胆汁中に排出される物質であり、局所での分解の影響は少ない。
- ⑤ ④より、蛍光強度の低下はリンパ流の改善と相関するものと考えられる。
- ⑥ 蛍光強度の低下 (=リンパ流の改善) と、足容積の減少には相関性がみられた。

以上のことより、In vivo imaging systemを用いた蛍光強度の測定を経時的に行うことで、リンパ浮腫の改善の程度を定量化することが可能と考えられる。

未だ基礎領域における動物リンパ浮腫モデルでの実験で、浮腫の定量化の手法は確立されておらず、本研究の結果は新たな手法として貢献するものと思われる。

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 4 件)

- ① 塩谷隆太, 堀内勝己, 古川洋志, 小山明彦, 舟山恵美, 林利彦, 村尾尚規, 山本有平: In vivo imaging systemによるリンパ流の定量化手法の開発～マウスモデル足容積変化との比較. 第89回北日本形成外科学会北海道地方会, 札幌医科大学記念講堂, 北海道, 札幌市, 2015. 1. 31

- ② 塩谷隆太, 堀内勝己, 古川洋志, 小山明彦, 舟山恵美, 林利彦, 村尾尚規, 山本有平: In vivo imaging systemを用いたリンパ流を定量化する手法の開発～動物モデルにおける足容積変化との比較. 第23回日本形成外科基礎学術集会, キッセイ文化ホール, 長野県, 松本市, 2014. 10. 9
- ③ 塩谷隆太, 堀内勝己, 古川洋志, 小山明彦, 舟山恵美, 林利彦, 村尾尚規, 山本有平: In vivo imaging systemを用いたリンパ流の定量化. 第87回北海道・東北形成外科学会北海道地方会, フラテホール, 北海道, 札幌市, 2014. 2. 8
- ④ 塩谷隆太, 堀内勝己, 古川洋志, 小山明彦, 舟山恵美, 林利彦, 村尾尚規, 山本有平: リンパ流を定量化する手法の開発～In vivo imaging systemを用いて～. 第22回日本形成外科基礎学術集会, コンベンションセンター, 新潟県, 新潟市, 2013. 11. 7

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 勝己 (HORIUCHI, Katsumi)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号: 60625028

(2) 研究分担者

山本 有平 (YAMAMOTO, Yuhei)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 70271674

古川 洋志 (FURUKAWA, Hiroshi)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 00399924

小山 明彦 (OYAMA, Akihiko)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号： 70374486

舟山 恵美 (FUNAYAMA, Emi)  
北海道大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号： 10533630

林 利彦 (HAYASHI, Toshihiko)  
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号： 70507574

大澤 昌之 (OSAWA, Masayuki)  
北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員  
研究者番号： 70625029

関堂 充 (SEKIDO, Mitsuru)  
筑波大学・医学研究科・教授  
研究者番号： 40372255

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：