

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791905

研究課題名(和文)ラットリンパ浮腫モデルにおけるリンパ管再生の経時的変化

研究課題名(英文)regeneration of lymph duct in rat lymphedema model

研究代表者

松本 久美子(Matsumoto, Kumiko)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：20616049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ラット下肢再接着モデルにおいてリンパ管の再生過程の観察を行った。過酸化水素を用いた色素注入法とICGリンパ管造影法による観察では5日目までは色素あるいはICGが再接着部を超えず、リンパ液のうっ帯所見が見られるが、5日目以降にリンパ管新生が起こり、うっ帯は徐々に解消されることがわかった。また、組織学的観察では臨床所見ではうっ帯が解消された7日目、14日目においても皮膚・皮下組織のリンパ管数は著明に増加したままていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the process of regeneration of lymphatic system. We developed the replantation model in rat hind limb. The regeneration process was observed by microinjection with hydrogen peroxide and a blue ink or by fluorescence lymphangiography with ICG. The regeneration started from 5 days after the operation with growth of capillary lymph duct. Histological examination revealed that the number of signed lymph duct in superficial layer (skin and subcutaneous tissue layer) significantly increased in the process of regeneration. This increase persisted at least through 14 days after the operation.

研究分野：形成再建外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：リンパ浮腫 リンパ管再生

1. 研究開始当初の背景

(1)リンパ浮腫

リンパ浮腫はリンパ郭清を伴う悪性腫瘍手術後、あるいは特発性に発症し、慢性的に組織の浮腫、リンパ液の滞留をおこすものである。これにより、日常生活動作が不自由になるだけでなく、感染を起こしやすい状態となる。現在、リンパ浮腫の治療の基本はマッサージや圧迫などの理学療法である。手術治療としてリンパ管静脈吻合術やリンパ組織移植などが行われているが、いずれもエビデンスのある手術方法とはなっていない。また、リンパ浮腫発症のメカニズムはいまだ解明されていない。

(2)リンパ系解剖

組織学においてはリンパ管内皮を特異的に標識するマーカーの出現により、免疫組織化学染色によるリンパ管の同定が可能になり、腫瘍学におけるリンパ行性転移とリンパ管再生の励起物質との関連性の研究がはじまっている。その一方で形成外科医が実際に手術の支柱とするリンパ系のマクロ解剖学についての情報は現行の解剖学書においても非常に乏しい状態であった。わたくしは、色素注入法により、ラットのリンパ系の詳細なマクロ解剖を明らかにし発表した。

(3)インドシアニングリーン(以下 ICG)を用いた蛍光リンパ管造影 (fluorescence lymphography with ICG; 以下 FLG-ICG)

2006年から ICGを用いた蛍光リンパ管造影法が臨床において施行されるようになり、現在、リンパ機能の検査や手術中のリンパ管の走行を確認するために多用されている(Ogataら, *Ann. Plast. Surg.*, 2007)。通常健常部位では注射後ただちに中枢方向に線状に上行するリンパ管が描出されるが、リンパ浮腫の患肢においてはリンパ流の異常所見が見られる。これらの新しい画像所見はリ

ンパ流停滞(手術操作等)が起こった後どの時期から出現し、どのような経過をたどるか、さらに病理組織変化との関係など、全く明らかにされていない。

動物モデルでリンパ浮腫治癒過程の肉眼的解剖学的、組織学的な解析を行うことで、ヒトのリンパ管再生・リンパ浮腫治癒のメカニズムの解明に近づけるのではないかと、ひいては、その形成外科学的治療への科学的なエビデンスを獲得できるのではないかと着想した。申請者は正常解剖を十分理解したうえで、リンパ管再生を観察することができる。さらに、本法、特に色素注入法では生体の実験動物の中にリンパ管を直接肉眼で3次元的に見ることができ、より詳細な観察が可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的はラットの下肢再接着モデルを用いて詳細なリンパ浮腫発症・治癒過程でのリンパ管動態を観察することである。

(1)ラット下肢再接着後の下肢の浮腫の経時的变化を観察する。(2)ラット下肢再接着後のリンパ管再生の経時的变化を色素注入法と FLG-ICG で経時的に形態を観察する。(3)ラット下肢再接着後のリンパ管再生過程での組織標本を作製し、免疫組織化学染色をおこない、リンパ管の組織的な経時的变化を観察する。これらを踏まえて、将来的にはサイトカインや遺伝子レベルの研究をも見据え、リンパ浮腫発症・治癒のメカニズムを解明できると考える。

3. 研究の方法

本実験においては 250g から 300g の Wistar ラット(雄)を用いた。

(1)再接着モデルの作成

麻酔後、鼠径部で右下肢を完全切断し、その後、同部位で再接着術を行った。血管は大腿

動静脈を吻合し、骨固定、筋肉、皮下組織と皮膚をそれぞれ縫合した。

(2) 下肢の浮腫の経時的変化の観察、評価
再接着術後 1~14 日での足関節の周径を測定した。

(3) 術後のリンパ管の経時的変化の肉眼的観察、評価

色素注入法

手術前から再接着術後 28 日で観察した。

FLG-ICG 法

手術前から再接着術後 28 日で観察を行った。

(4) 組織学的な経時的変化を観察、評価
術前、再接着術後 7、14 日の大腿下部の水平断面の組織標本を作成した。H E 染色，リンパ管内皮細胞の特異マーカーである podoplanin による免疫組織化学染色を行い、リンパ管数、分布の変化に関して詳細に観察した。

4. 研究成果

(1) 再接着術後の下肢の浮腫の経時的変化
浮腫のピークは術後 3 日目であり、術前の足関節周径に対し、1、3、5、7 日ではそれぞれ有意差を持って増加していた。(図 1)

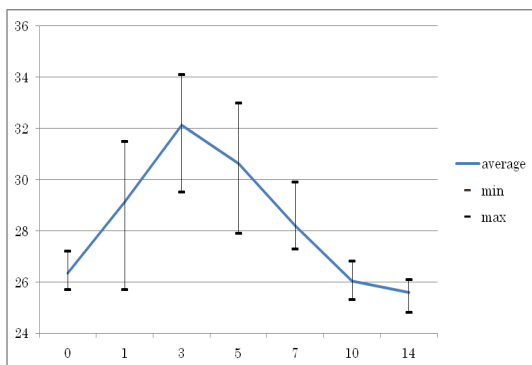


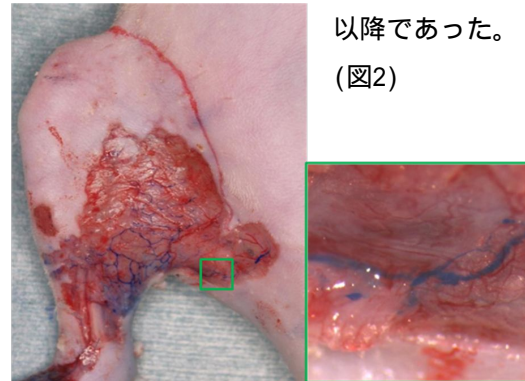
図 1 術後日数(横軸)に**対する**足関節周径(mm)(縦軸)

つまり、再接着術後の浮腫は 1 日目から始まり、10 日目には収束することがわかった。

(2) 色素注入法

色素注入法では術後後 2 日目から下肢全体に

び慢性に色素が広がるのが確認された。すなわちリンパ液のリンパ管外への漏出が観察され始めた。4 日目以降で皮下の毛細リンパ管が描出され始め、同時にび慢性の漏えいは減少していった。切断部を超えて中枢のリンパ管へ流入する様子が観察され始めるは 8 日目



以降であった。

(図 2)

図 2 (右)色素注入所見(8 日目) (左)右図内の拡大
注入した色素が縫合部を超えて上行するのが観察される

(3) FLG-ICG 法

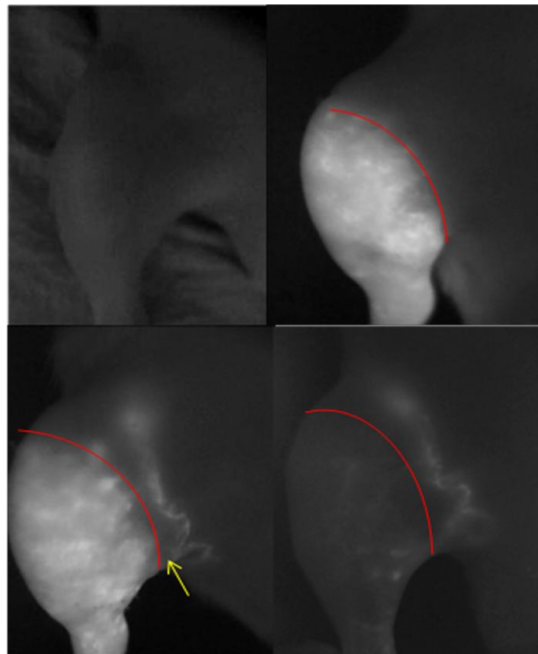


図 3 ICG-FLG 所見 (左上)術前 (右上)術後 3 日：ICG は下肢全体に停滞しており、縫合線より中枢には上がらない。(左下)術後 5 日：縫合線を超えて上行するものが見られる。(右下)術後 14 日：ICG のうっ帯は消失する。

色素注入法とほぼ同様の所見であったが、中枢を超えるのは 5 日目以降にみられた。

FLG- ICG法の方が感度が高いことが分かった。

(図3)

(4)再接着術前、術後の組織学的観察

正常ラット下肢において、リンパ管は環状構造を持つものと線状のものがあることがわかった。(図4)

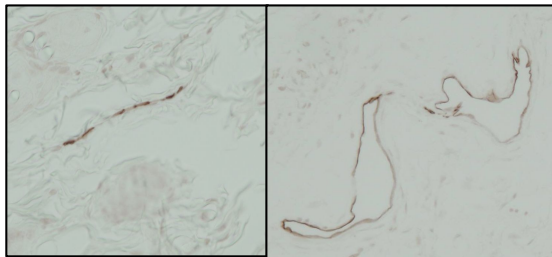


図4 抗 podoplanin 抗体による免疫組織化学染色像
(左)線状のリンパ管 (右)環状リンパ管

環状リンパ管は皮膚では全体に均等に分布しているのではなく、伸側に最も多く、次いで屈側に多く分布していた。深部では筋膜上、骨周囲などの組織間に多く分布していた。筋肉内では筋束間の血管に一致して走行していた。平均環状リンパ管数は皮膚皮下組織までの浅層に70.6、これより深部の深層に190.7であり、正常においては深層の方が約3倍多く存在していることが明らかになった。また、術前、術後7日、14日の環状リンパ管数を比較した。リンパ管数は浅層では術前は70.6に対し術後7日で221.8、術後14日で226.2といずれも有意差を持って増加していた。一方深層においては術前190.7、術後7日で206.2、術後14日で307.3と増加傾向はみられたが、有意差は認められなかった。(図5)

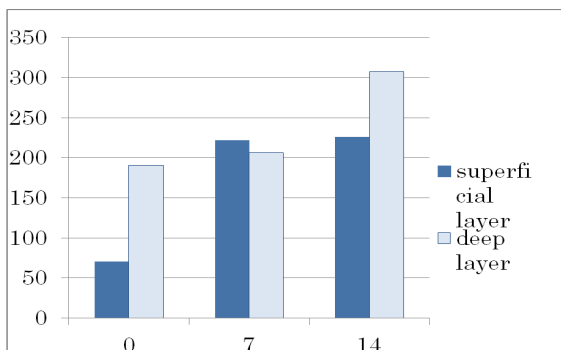


図5 術後日数(横軸)に対するリンパ管数(個)(縦軸)
青：浅層 水色：深層

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)

[学会発表](計 5件)

松本久美子、ラット下肢におけるリンパ管の分布、第38回日本リンパ学会総会、2014年6月20日~2014年6月22日、東京

Shinaoka A, Matsumoto K.ら、Quantitative evaluation of lymphedema、World Society for Reconstructive Microsurgery world congress、2013年7月11日~2013年7月14日、chicago,USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 久美子 (MATSUMOTO KUMIKO)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：20616049

(2)研究協力者

小阪 淳 (KOSAKA JUN)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40243216

木股 敬祐 (KIMATA YOSHIHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50392345

須網 博夫 (SUAMI HIROO)

M.D.Anderson Cancer Center,
Houston, Texas