

平成 29 年 8 月 29 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462797

研究課題名(和文)リンパ管・リンパ節低形成と続発性リンパ浮腫の発症との関連性についての検討

研究課題名(英文)The relationship of hypoplasia of lymphatic system and secondary lymphedema

研究代表者

山本 康 (Yamamoto, Yasushi)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・非常勤診療医

研究者番号：00336554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ節隔清の術前にリンパ浮腫を発症しやすい患者をスクリーニングできれば治療の選択肢が増える。リンパ浮腫を発症しやすい素因としてリンパ管低形成が考えられ、動物や人でリンパ管発達の個体差と、リンパ管発達が悪い方がリンパ浮腫を発症しやすいかどうかについて検証した。

ラットを用いた検証では、リンパ管の走行に個体差を認めたと低形成群を抽出できなかった。人での検証では、ICGのクリアランスに個体差を認めたとリンパ浮腫を発症しやすいかどうかは検証できなかった。単一光子放射断層撮影(SPECT)画像の解析では、リンパ管走行異常がリンパ管低形成やリンパ浮腫発症に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：If we have the screening methods for the predisposition of secondary lymphedema, oncology patients have more choices of the treatment. Our hypothesis is that lymphatic hypoplasia predisposes patients undergoing lymphadenotomy to secondary lymphedema. We examined the relationship of lymphatic hypoplasia and secondary lymphedema.

Individual difference of lymphatic flow pattern was observed in extremities of rats. Individual difference in human study was also detected in clearance test of indocyanine green injected in peripheral lymphatic capillaries. However the clarification of predisposition to lymphedema in delayed clearance group was not challenged in this study. SPECT/CT image analysis suggested that abnormalities of lymphatic flow pattern were closely related to the lymphatic hypoplasia and the onset of secondary lymphedema.

研究分野：リンパ浮腫

キーワード：リンパ浮腫

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍切除に伴うリンパ節隔清により続発性リンパ浮腫を発症する患者がいるが、同じようなリンパ節隔清を施行してもリンパ浮腫を発症しない患者の方が多いと考えられている。進行したリンパ浮腫は著しく生活の質 (GOL: Quality of life) を低下させるが、リンパ節隔清術の術前にリンパ浮腫を発症しやすい患者をスクリーニングできれば予防的リンパ節隔清術を回避するという選択肢が増えると考えられる。また、リンパ浮腫を発症しやすいことがわかっていてリンパ節隔清を施行せざるをえない場合であっても、リンパ節隔清と同時にリンパ管静脈吻合を追加したり、手術直後から理学療法を開始したりするといった対応が可能になると考えられる。

われわれは、このようなリンパ浮腫の発症しやすい原因について、ちょうど輸液に利用される末梢静脈のようにリンパ管・リンパ節の発達にも相当な個人差があり、リンパ節の発達の悪さ、すなわちリンパ管・リンパ節の低形成が続発性リンパ浮腫の発症に関係しているのではないかと、という仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、このようなリンパ管・リンパ節の発達の個体差について、患者および動物実験でその評価法を検証することである。

また、人においてリンパ管・リンパ節の発達の悪い患者をふるいにかける評価法があった場合に、侵襲やコストといった面から実際に臨床で患者の術前スクリーニングに用いることができるかどうかを検証することである。

3. 研究の方法

動物実験：

ラットのリンパ管発達の個体差について ICG (Indocyanine green) 蛍光造影法を用いて検証する。まずは視覚的な手法のみで個体差があるかどうかを観察する。視覚的に個体差を評価できるようであれば、その評価方法の再現性について検証し、リンパ管の発達を視覚的に定量化する手法を確立する。

リンパ管・リンパ節の発達の個体差を視覚的に認識できる個体間については、組織検体でリンパ管の発達に差を認めるかどうかを観察する。つまり、視覚的に個体差があることが認識できる個体間で、視覚的な個体差と組織学的な個体差との間に相関関係があるかどうかを検証する。

最終的には同種同齢のラットを、ICG 蛍光造影法を用いて視覚的にリンパ管の発達の良い群と悪い群にふるい分け、リンパ節隔清やリンパ管切断を行ってリンパ管の発達の悪い群がよりリンパ浮腫を発症しやすいかどうかを検証する。

ヒト：

被験者の四肢末梢に皮内投与された ICG のクリアランスを ICG クリアランスメータで評価する。ICG クリアランスメータは肝機能評価のために ICG クリアランスを評価する際に用いられる市販のものを使用する。このとき、補助的に ICG 蛍光造影法で末梢のリンパの流れを観察し、リンパ流の停滞やリンパ管の走行異常の有無を観察する。これらの手法でリンパ管の低形成が疑われる被験者を抽出できるかどうかを検証する。

リンパ管・リンパ節の低形成をある程度定量的に抽出できることが可能であれば、倫理委員会の承認を得てこの手法をそのままリンパ節隔清術前の患者に適用し、実際にリンパ管の低形成が疑われた患者群がリンパ浮腫を発症したかどうか、追跡調査をする。

また、リンパ流を観察する上で、ICG 蛍光造影法と同程度に有用なのが、リンパシンチグラフィと単一光子放射断層撮影 (Single photon emission computed tomography; SPECT) である。われわれの施設では、乳がんで腋窩リンパ節隔清術後の続発性リンパ浮腫患者に対して SPECT を施行しているが、比較のために必ず健側も撮影している。これらの患者群の健側と健常者群の画像を比較し、患者群でリンパ流の停滞やリンパ管の走行異常といったリンパ管低形成を疑う所見が多いかどうかを検証する。

4. 研究成果

動物実験：

n=10 の 10 週齢ラットで観察を行った。後足末梢皮内に投与した ICG を、ICG 蛍光造影法を用いて追いかけることで、大腿～腹腔内のリンパ管を観察した。リンパ管の走行、リンパ節の位置と個数、リンパ流の停滞などは定性的に大きく個体差を認めた。

このうち、もっともリンパ管の低形成を強く疑う所見はリンパ流の停滞であった。腹腔内の傍大腿動脈周囲リンパ管への ICG の移行が確認されるまでの時間は、約 3 分～13 分と、個体差が顕著であり、遅いものはリンパの流れが悪いとして矛盾はないと判断した。リンパ管の走行異常が多い場合やリンパ節の位置の変位を認める場合に、よりリンパ流が停滞する傾向が見られたと

いうことはなかった。リンパ流の停滞の所見のみで判定し、下腿末梢に投与したICGが腹腔内で総腸骨動脈分岐周囲のリンパ管に末梢と同程度の輝度が確認されるまでの時間をもっとも長いもの(n=3)、短いもの(n=3)を、それぞれリンパ管発達良好群、リンパ管低形成群と仮定し、観察対象とした。

組織学的検討では、大腿遠位の皮膚皮下組織を2か所採取して組織切片を作成した。リンパ管内皮をPodoplaninを用いて染色し、10切片中もっともリンパ管の個数が多い3切片を対象とした。主に皮膚真皮内と真皮直下の領域における同一面積あたりの毛細リンパ管の個数、総内腔面積を調べた。2群間に有意差は認めなかったが、毛細リンパ管の個数はリンパ管発達良好群で多い傾向があった。毛細リンパ管の個数、総内腔面積とも個体差が大きいことが確認された。毛細リンパ管の個数が少ない個体で各リンパ管の内腔面積が大きい傾向は認めなかった。

さらに、2群に対して鼠径リンパ節隔清を施行または、大腿皮膚全周切除を施行して同部位に放射線照射を行うことで続発性リンパ浮腫を誘発し、初回観察と同様に大腿～腹腔内のリンパ管をICG蛍光造影法により観察した。放射線照射後24時間で、全例大腿末梢領域に続発性リンパ浮腫と考えられるICGの停滞を認めたと、総腸骨動脈分岐周囲のリンパ管にICGの移動が確認されるまでの時間に有意差を認めなかった。

これらの結果から、ラット体内のリンパのネットワークに個体差があることが示唆されたが、ラットの四肢末梢に投与するICGのリンパ流動態と組織学的解析によってラットのリンパ管低形成群を抽出するという試みは困難と考えられた。ICG蛍光造影法でリンパ管低形成群とした群の方が、リンパ管発達良好群とした群よりも、組織学的にはリンパ管が少ない傾向があったことから、検体数を増やせば有意差が出る可能性はある。有意差がでるようなら、ラットのリンパ管発達をある程度ICG蛍光造影法で定量評価できる可能性があることに他ならない。しかし、組織学的検討で多くの切片からリンパ管の個数をカウントしてリンパ管の低形成を推測できるとしても、臨床的には実用的ではない。リンパ浮腫になりやすいと考えられる患者、またはすでにリンパ浮腫を発症している患者では、わずかな末梢組織への侵襲だけでリンパ浮腫を発症あるいは増悪させてしまうことが臨床度々観察されるからである。

また、これらの結果からは、そもそもラットにそのようなリンパ管低形成群が存在しない可能性も考えなくてはならない。ラットの末梢では単純なリンパ節隔清や皮膚切除のみでは、肉眼的に判別できるリンパ

浮腫を発症しないことがほとんどである。リンパ節隔清部位や皮膚切除部位に放射線を照射すればリンパ浮腫を発症するが、ヒトのリンパ浮腫の臨床像と比較すれば、それはかなり急性期の一過性の浮腫に近いものであると言わざるをえない。したがって、ラットではリンパ管・リンパ節の発達、ヒトと大きく異なっており、ICG蛍光造影法や組織切片の解析で捉えることが困難な程度の個体差しか存在しない、という可能性が十分にあると考えられた。

また、リンパ流の停滞についてはICGの投与方法や部位、投与部位の深さ、麻酔深度などに大きく左右されてしまう可能性を否定できないと考えられた。

ヒト：

n=5、全例男性の被験者に対して、足背の真皮内に投与したICGを手指に装着するICGクリアランスメータで検知するという手法で、ICGクリアランスを測定した。その結果、信号が検知されるまでの時間が4~10分と個人差を認めた。さらにこの測定と同時にICG蛍光造影法で下腿のリンパの流れを観察した。その結果、下腿末梢でICGの中核側への拡散が速やかな被験者ほど早く信号が検知される傾向を認めた。信号の検知までの時間は投与後約4~10分と短いものの、信号強度がピークに達するまでの時間については全例で投与後30分以上後と長かった。この結果から、足背真皮内に投与したICGのクリアランスに個体差があることが示唆された。指での信号検知までの時間が短い被験者の方が、長い被験者よりもリンパ管の発達が良好であるかどうかは不明である。また、ICGのクリアランスを用いて末梢真皮内に投与したICGのクリアランスを評価しようとした場合、信号強度のピークを迎えるまでの時間が長時間に及ぶため、ICG投与から信号検知までの時間以外の実用性は低いと考えられた。

結果として、ICGクリアランスのみでリンパ管の低形成を有する患者をスクリーニングできるかどうかについては、今回の検証では被験者数が少なく、今後被験者数を増やして検証する必要があると考えられた。ヒトにおいてICGクリアランスメータを用いてリンパの動態を観察するのに使用した印象としては、現状ではこれのみでスクリーニングに用いることは難しいかもしれない。実際に多くのリンパ節隔清術を予定する患者の術前に適応して、術後にリンパ浮腫を発症したかどうかを検証することがもっとも理想的であるが、今回の検証ではそのような介入試験を行うのに十分な確証が得られているとはいえない。

また、今回用いたクリアランスメータは肝機能をみるためのICGテスト用に開発されたものである。リンパ専用改良する

ことで、後述の SPECT と同時に用いたりすれば、リンパ管の低形成を有する患者のスクリーニングの強力な補助的手段になりうる可能性があると考えられた。

一方、乳がん術後の続発性上肢リンパ浮腫患者に対して施行した SPECT 画像(n=30)の解析も行った。患者群の健側と健常者群の画像を比較した結果は、患者群の 27%(8 例)の健側上肢に異常なリンパ管の走行や停滞を認めた。これに対し、コントロールとなる同年代の健常人女性(n=3)では両側上肢に異常を認めなかった。コントロールの SPECT 画像が少ないため、あくまでも印象ではあるが、SPECT 画像におけるリンパ管の走行異常や停滞がリンパ管低形成と関連している可能性は十分にあり得ると考えられた。SPECT によって可視化されるリンパ流は、異常の有無を指摘しやすいことが利点である。

ただし、SPECT 画像に描出されるリンパ管の走行異常やリンパの停滞を定量化するのが煩雑なことや、画像検査そのものに侵襲を伴うことなどを考慮すれば、術前にリンパ管低形成を有する患者のスクリーニングに汎用することは難しいのではないかと考えられる。

以上の動物およびヒトにおける検証では、リンパ管の走行異常やリンパの停滞の個体差は明らかに認め、このような走行異常や停滞こそがリンパ管の低形成やリンパ浮腫発症に関与している可能性があることが示唆された。まずはリンパ管・リンパ節の発達の個体差を捉えるのに鋭敏な検査手法を開発することがもっとも重要である。そのような手法が開発されれば、リンパ管・リンパ節の低形成が疑われる患者に対してリンパ節隔清を施行した場合にリンパ浮腫になりやすいかどうか、という疑問はすぐに解決されるであろう。

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)

Satake T, Yasumura K, Ishikawa T, Maegawa J. Breast reconstruction using free posterior medial thigh perforator flaps: intraoperative anatomical study and clinical results; *Plast Reconstr Surg* (2014.5), 880-91

Satake T, Yasumura K, Ishikawa T, Maegawa J. Unilateral breast reconstruction using bilateral inferior gluteal artery perforator flaps; *Plast Reconstr Surg Glob Open* (2015 Apr)3, e314)

〔学会発表〕(計 1 件)

安村和則, 佐武利彦, 前川二郎: リンパ浮腫患者における真皮内毛細リンパ管の病理組織学的解析, 第 24 回日本形成外科基礎学会, 盛岡, 2015 年 10 月

〔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

山本 康 (YAMAMOTO, Yasushi)
横浜市立大学・附属市民総合医療センター

形成外科・非常勤診療医
研究者番号: 00336554

(2) 研究分担者

佐武 利彦 (SATAKE, Toshihiko)
横浜市立大学・附属市民総合医療センター

形成外科・准教授

研究者番号: 60271318

(3) 研究分担者

安村 和則 (YASUMURA, Kazunori)
横浜市立大学・附属病院形成外科・非常勤

勤

研究員

研究者番号: 40351621

(4) 連携研究者

()

研究者番号：

(5)研究協力者 ()