

主論文

Enhancement of lymphatic vessels in the superficial layer in a rat model of a lymphedematous response

(ラットのリンパ浮腫反応モデルにおいて、浅層のリンパ管は増加する)

【緒言】

リンパ系組織はほとんどすべての臓器と皮膚に存在し、体液の恒常性維持など重要な役割を担っている。一方で、成人のリンパ管新生については、リンパ浮腫、悪性腫瘍の転移や炎症などの病態と関連があることが知られている。

リンパ浮腫に関してはその原因や病理は完全には明らかになっていない。リンパ浮腫に対する新しい治療を試みるにあたり、基礎的な研究成果を積み上げた上で行う必要がある。現在では、リンパ経路の解剖や病的変化を診断する方法として、リンパシンチグラフィやコンピュータ断層撮影法、蛍光リンパ管撮影法が用いられる様になり、より詳細な観察が可能となった。しかし、これらの方法は造影剤を取り込んだ一部のリンパ管と主要なリンパ上行経路のみを描出するものであり、すべてのリンパ管の所在を追跡できるものではない。また、浅層と深層に区別したリンパ管の局所解剖に関してはほとんど情報がなく、特に深層のリンパ管の分布に関してはわれわれが渉猟しえた範囲で報告はない。また、リンパ管の動態についても、皮内や皮下のリンパ管新生に関する形態学的研究は散見されるが、筋肉内や筋肉周囲の深層のリンパ管の反応についてはわかっていない。実験動物を用いたリンパ管の解剖とそれらの動態の解明は、ヒトにおけるリンパ管研究にも新しい視点を提供できると期待されている。

本研究では、まずラット下肢の浅層と深層のリンパ管の分布を明らかにし、続いて急性リンパ浮腫モデルを作成した。その動物モデルのリンパ管分布の変化を浅層と深層に分けて組織学的に観察した。この動物モデルはリンパ浮腫を完全に再現したものではないが、臨床においても重要な手がかりになると考えられる。

【材料と方法】

急性リンパ浮腫モデルの作成

250gから350gのオスWistarラットを使用した(OKU-2014176)。麻酔後に右後脚を鼠経部で切断し、直ちに再接着術を行った。骨接合後、大腿動脈と大腿静脈を吻合し、筋肉と皮膚をそれぞれ縫合した。リンパ管の吻合は行わなかった。

組織採取とリンパ管の免疫組織化学染色

ラットを麻酔下で灌流固定後、切断・縫合ラインよりも5mm中枢側で後脚を切断した。浸漬固定後に脱脂、脱灰処理を行った。下肢丸ごとの組織を水平断面で切離し、パラフィン包埋後、4.5 μ mの薄切切片とした。切片は脱パラフィン、加水、抗原賦活化、ブロッッキング処理の後、一次抗体としてリンパ管内皮細胞マーカーである抗ラット・ポドブラニン・モノクローナル抗体を一晩反応させた。2次抗体として HRP(西洋わさびペルオキシダーゼ)標識抗マウス IgG を用いた。DAB(ジアミノベンチジン)により免疫染色反応を可視化し、脱水後封入した。

正常ラットと術後3, 7, 14日のラットそれぞれ3匹を実験に供した。切片上のすべてのポドブラニン陽性反応を示す環状構造をリンパ管として顕微鏡下に目視で数えた。本研究では、筋膜を含めて、これより浅い層を浅層とし、筋膜よりも深い部位を深層と定義した。

足関節部の周径測定

ラット5匹を用い、術前と術後3, 5, 7, 10, 14日にそれぞれ足関節部の周径測定を行った。

インドシアニン・グリーンを用いた蛍光リンパ管造影

リンパ流の観察には、浜松ホトニクス製・近赤外線蛍光カメラシステム PDE を用いた。5mg/mlの ICG (インドシアニン・グリーン) 溶液 0.02ml をラットの後脚の指に皮下注射した。術前から術後28日まで6匹のラットを用いて観察を行った。

色素直接注入法

リンパ管は色素注入法によっても可視化した。ラット後脚の足背皮下のリンパ管にアクリル絵の具を溶かした生理食塩水を顕微鏡下に徒手注入した。術後 3、7、10、14 日で肉眼解剖学的観察を行い、組織学的観察は術前、術後 3、7 日で行った。

【結果】

ラット下肢の水平断面のリンパ管分布

正常ラットでは、浅層には 70.6 ± 8.4 個、深層には 190 ± 32.5 個のポドプラニン陽性リンパ管が確認された。形状は線状、円形や楕円形その他、それらが潰れた形など様々で、内腔直径も $10 \mu\text{m}$ 以下から $100 \mu\text{m}$ 以上まで多様であった。今回は内腔が確認できるものだけをリンパ管として数え、内腔が不明瞭な線状のポドプラニン陽性構造は結果に計上しなかった。線状の構造は浅層に多く見られたが、深層には見られなかった。

急性リンパ浮腫時のリンパ管の変化

周径測定により、浮腫は術後 3 日に最大となることが判明した。同時期の ICG 蛍光リンパ管造影では、移植片全体がびまん性に造影され、リンパ液の著明な漏洩と貯留が示された。色素注入法により、リンパ集合管から皮下毛細リンパ管への色素の逆流と、リンパ管外への色素の漏出が確認された。リンパ管数は浅層では5倍以上に増加した。一方で、深層では増加傾向はあるものの、対照群との間に有意差は認められなかった。

術後 5 日には、周径測定により有意な差は検出できるものの、浮腫は軽減し始めることが判明した。ICG 蛍光リンパ管造影では、接合線を超えて、鼠径リンパ節へ向かうリンパ管が初めて観察された。浅層のリンパ管数は術後 7 日には術後 3 日に比べると有意に減少していたが、対照群に比べると、有意に増加した状態であった。

周径測定により、術後 10 日に浮腫は消失したことが判明した。この時点で、ICG 蛍光リンパ管造影では、移植片のリンパ液の貯留は完全に消失し、リンパ経路の再疎通が見られた。術後 14 日には、色素注入法で再疎通ルートが明確に確認された。術後 14 日の浅層のリンパ管数は術前に比べて有意に高いままであった。

【考察】

浅層のリンパ管数の増加

今回の研究の結果から、浅層のリンパ管数の増加の原因として次の2つの仮説が考えられた。まず第1は、リンパ管の再形成が術後速やかに促進されたという仮説である。炎症やリンパ液の停滞によりリンパ管新生が促されるという事実は広く知られており、本研究においてもリンパ流の停滞が生じ、これによるリンパ管新生の関与はやはり考慮すべきである。第2は、リンパ管数は、術前術後で大きな変化はなく、術前、すなわち対照群では、細く小さな毛細リンパ管を、本研究で用いた方法ではすべて検出しえなかったという仮説である。術後のリンパ液の停滞により、それら毛細リンパ管腔が拡大することにより、明らかな管腔を持ったポドプラニン陽性のリンパ管として検出できたと考えられる。我々は術前の標本において、ポドプラニン陽性の線状あるいは破片様の構造が浅層に多いことを確認した。しかし、今回、これらをリンパ管数には含めなかった。そのため、見かけ上、術後にリンパ管数の増加が起こっていると推測することができる。

術後 3 日の早期の段階で浅層のリンパ管数が劇的に増加したことは、上記の第 2 の仮説で説明できる。この時期、浮腫と同時にリンパ液の停滞があったことは ICG 蛍光リンパ管造影により確認され、また、色素注入法でも、停滞の結果毛細リンパ管への逆流と間質へのリンパ液の漏洩が見られた。内腔がなく、扁平になっていたリンパ管が拡張され、リンパ管数の増加として見られたと考えることが自然である。

しかしながら、術後 7 日において浮腫は軽減し、ICG 蛍光リンパ管造影でもリンパ液の停滞は消失しているにもかかわらず、浅層のリンパ管数は増加したままであった。これは第 1 の仮説の方が、より簡単に説明できる。つまり、一度拡張したリンパ管はリンパ液の停滞解消により再び扁平に潰れて検出が難しくなり、リンパ管数は術前の対照群の数に近づくはずである。しかし、リンパ管新生によりリンパ管が新たに形成されたと考えると、浮腫が軽減した術後 7 日目であっても、リンパ管数が優位に増加した値を示すことは説明可能である。

深層においてはリンパ管数に有意な変化は見られなかった

今回の研究で解析した急性浮腫モデルにおいて、深部のリンパ管数は有意な増加を示さなかった。また、深層ではどの時点においても扁平な、内腔を持たないポドプラニン陽性の構造を検出することはなかった。リンパ液の停滞に対して、深層に比べて浅層の方が敏感に反応を示すということが判明した。正常時、深層のリンパ管数は浅層のリンパ管数のおよそ 3 倍であった。深層のリンパ流が、浅層のリンパ流に比べて 2 から 3 倍も多いという過去の報告もあり、今回の結果は、正常時にはリンパ流は深層のリンパ管が主となっている可能性を示唆している。

近年臨床において、リンパ浮腫の治療として浅層でリンパ管静脈吻合術やリンパ節移植が行われている。今回の結果では、浅層と深層のリンパ管は異なる性質があるということが判明した。リンパ浮腫に対する形成外科学的な手術戦略として、浅層と深層のリンパ管で、異なったアプローチで治療を行うべきという発想が示された。

【結論】

ラットの一時的な浮腫の経過を組織化学的に観察した。浮腫は術後 3 日にピークとなり 10 日には回復した。この間、浅層のリンパ管数は増加したが、深層のリンパ管数は増加しなかった。リンパ管の浅層と深層で急性浮腫に対する反応が異なることを発見した。このような浅層と深層のリンパ管の解剖と動態の違いを踏まえてリンパ流の回復に関するデータを蓄積することは、将来的にリンパ浮腫の治療戦略の一助となることが大いに期待される。