

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 塩谷 隆太

### 学位論文題名

マウスリンパ節移植モデルにおける浮腫予防効果ならびに  
悪性黒色腫転移制御に関する研究

(Studies for prevention of lymphedematous change and suppression of melanoma metastasis in lymphnode transplantation mouse model)

【背景と目的】 悪性腫瘍の外科的治療の一環として、所属リンパ節の郭清術が施行されているが、その合併症の1つとしてリンパ浮腫が生じる事は知られている。治療法は大きく分けて、マッサージや弾性着衣、弾性包帯による圧迫を行う保存的療法と、外科的療法に分類される。外科的療法はさらに、リンパ管静脈吻合を行う直接的リンパ誘導術と、リンパ節移植や筋弁・大網弁移行などを行う間接的リンパ誘導術に分けられ、近年では間接的リンパ誘導術である「リンパ節移植術」が注目されてきている。しかしリンパ浮腫に対するリンパ節移植術はまだ臨床で標準的な治療とはなっておらず、理由として基礎的研究の不足があると考えられ、適切な動物モデルが確立されていないこともその一因である。そこで我々が世界ではじめて開発・報告したマウス後肢リンパ浮腫モデルを用いて、リンパ節移植術のリンパ浮腫予防/治療効果と機序の解明を試みることを第一章の研究の目的とした。

またリンパ節郭清術は局所免疫の破壊としての側面もある。悪性黒色腫の治療においては、リンパ節郭清を施行した後に原発巣と所属リンパ節との間の領域に皮膚転移が出現するin transit転移 (ITM) をしばしば経験する。この転移様式は悪性黒色腫において比較的特徴的で予後不良の徴候であり、腫瘍の局所制御が不十分な状態でリンパ節郭清を行う事により、鬱滞し皮膚方向へ逆流したリンパ流によってもたらされる状態であることが示唆されている。我々は世界で初めてマウスのITMモデルの開発に成功しており、この研究の中で郭清施行後のマウスモデルにおいてITMが高率に生じる現象が見られ、同モデルで肺転移が増加していることも確認された。臨床においても郭清術を施行した後に局所/遠隔転移が急速に進行する事はしばしば経験され、郭清術による局所・全身免疫の破壊が背景にあるものと推測される。第一章の研究で示したようにリンパ浮腫などの合併症予防目的でのリンパ節移植術は近年行われるようになってきているが、腫瘍治療の観点からの報告はほとんど見られない。そこで我々は腫瘍移植マウスモデルにおいてのリンパ組織再構築術を確立し、その手技による生命予後や局所/遠隔転移への影響を検討し、リンパ組織再構築術が腫瘍治療に与える影響を解明することを第二章の研究の目的とした。

【対象と方法】 第一章の研究では雄の ddY マウス (18~20g) を用いた。リンパ流を遮断したリンパ浮腫モデル (control 群) として、マウスの後肢でリンパ浮腫を作製した。全身麻酔下にマウスの鼠径部に 30Gy 単回の放射線照射を行い、その1週間後に手術を行った。放射線照射は MBR-1520R-3 (Hitachi, Japan) を用いて、 $4.12 \text{ Gy min}^{-1}$  (150 kVp, 20 mA) の線量率で行った。

術前に  $5 \mu\text{L}$  の 2% patent blue dye を足底に注射してリンパ管を染色し、確認を容易にした。鼠径部の皮膚を全周性に切開し、青染したリンパ管を手術用顕微鏡下に同定し、伴走する静脈から剥離した。静脈を損傷しないようにリンパ管を各々3か所ずつ 10-0 ナイロンで結紮した後、膝窩リンパ節と腸骨下リンパ節を連続的に郭清した (深部リンパ流の遮断)。閉創の際には全修正に 2mm の皮膚欠損の状態になるように、皮膚を下床の筋層に 6-0 ナイロンで縫合した (真皮内リンパ管網の遮断)。Control 群で摘出した膝窩リンパ節の部位に、

対側の腋窩リンパ節を遊離体として移植しリンパ節移植モデルとした。各モデルを4匹ずつ作成し、経時的に足の容積を測定、比較検討した。また近赤外線カメラシステム（PDE）とインドシアニングリーン（ICG）を用いたリンパ流のイメージングも行った。

第二章の研究では腫瘍に与える影響を検討するために各群の足底に B16-F10-luc2 を  $4 \times 10^5$  個/0.05ml ハンクス液の細胞懸濁液として、注射して移植した。原発巣のサイズを経時的に観察した。移植後21日目に肺を摘出し、ルシフェラーゼの発光強度を測定することで定量化を行った。

【結果】 第一章では両モデルにおいて、術後早期にはリンパ流のうっ滞（dermal back flow）と後肢の浮腫が見られた。浮腫は経時的に回復を認めたが、リンパ節移植群では腫脹の程度が軽度であり、control 群と比べ足容積が有意に少なかった。リンパ流の側副路が発達している所見も観察された。

第二章の腫瘍細胞を移植した実験ではリンパ節移植群で原発巣のサイズが小さく、肺転移が増加する傾向が見られたが有意差は得られなかった。

【考察】 リンパ節移植群において浮腫が軽度であった要因として1：リンパ管新生因子（VEGF-C 等）の発現によるリンパ管新生、2：移植したリンパ節を介した静脈系との交通路の発達、などが考えられた。PDE で得られた側副路の画像がこれらを示唆するものである。腫瘍移植モデルでリンパ節移植群で原発巣が小さい傾向がみられた要因としては局所免疫の賦活効果が考えられたが、肺転移が増加傾向であったことには側副路の発達が影響しているものと予想された。

【結論】 第一章の研究ではマウス後肢リンパ浮腫モデルにおいて、郭清術施行後にリンパ節を移植することによってリンパ浮腫が予防されることが示唆された。第二章で行った腫瘍移植モデルに与える影響に関しては有意な差は得られておらず今後の研究の継続が望まれる。