HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	大網を用いたマウス外科的リンパ系再構築に関する研究
Author(s)	北條, 正洋
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第17032号
Issue Date	2026-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k17032
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/100085
Type	doctoral thesis
File Information	HOJO_Masahiro.pdf, 全文

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

大網を用いたマウス外科的リンパ系再構築に関する研究

(Studies on lymphatic regeneration in mice by means of omentum)

２０２６年６月

北　海　道　大　学

北　條　正　洋

Masahiro Hojo

学　位　論　文

大網を用いたマウス外科的リンパ系再構築に関する研究

(Studies on lymphatic regeneration in mice by means of omentum)

２０２６年６月

北　海　道　大　学

北　條　正　洋

Masahiro Hojo

目　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　1 頁
要旨　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　2 頁
略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5 頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　6 頁

第一章　大網を用いた外科的リンパ系再構築モデルの検討
緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　8 頁
方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　10 頁
結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　16 頁
考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　21 頁

第二章　活性化大網培養上清のリンパ浮腫に対する効果の検討
緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　23 頁
方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　24 頁
結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　28 頁
考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　34 頁

総括および結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　37 頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　39 頁
利益相反　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　40 頁
引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　41 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Masahiro Hojo, Donkyung Seo, Riri Ito, Takahiro Miura, Kosuke Ishikawa, Emi Funayama, Yuhei Yamamoto, Taku Maeda

   The Omentum as a Lymphoid Tissue: Molecular Characterization and Therapeutic Application Following Activation in a Murine Lymphedema Model.

   Archives of Plastic Surgery. Accepted

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 北條正洋，前田　拓，石川耕資，大澤昌之，舟山恵美，山本有平

   新たなリンパ節移植動物モデルの開発－大網を用いて

   第 30 回日本形成外科学会基礎学術集会，2021 年 10 月 7 日・東京

2. 北條正洋，前田　拓，石川耕資，大澤昌之，舟山恵美，山本有平

   顕微鏡下マウスリンパ節移植モデルの開発　新たな材料を求めて

   第 48 回日本マイクロサージャリー学会，2021 年 12 月 4 日・つくば

3. 北條正洋，前田　拓，石川耕資，大澤昌之，舟山恵美，山本有平

   大網を用いたリンパ系再構築に関する基礎的な検証

   第 103 回北日本形成外科学会北海道地方会，2022 年 2 月 26 日・札幌

4. 北條正洋，前田　拓，石川耕資，大澤昌之，舟山恵美，山本有平

   リンパ節移植術の再疎通率向上を目指してー活性化大網を用いた検証

   第 46 回北大形成外科アカデミー，2023 年 12 月 2 日・札幌

要旨

【背景と目的】

末梢リンパ節は平滑筋や弁の働きによりリンパを循環する機能と，リンパ節などのリンパ組織を有し抗原提示による免疫反応という免疫反応に関する機能があるとされている。悪性腫瘍の治療において，リンパ行性転移の治療および予防として，リンパ節郭清術が行われるが，これにより末梢リンパ節の従来の機能が破綻する。リンパの循環系が破綻するとリンパ浮腫を生じ，慢性化すると重度のリンパ浮腫となり，治療に難渋する。また，免疫系が破綻することで局所の免疫不全を生じて脈管肉腫を生じる(Grobmyer et al. 2000)，In-transit 転移を来たす可能性が指摘されている(Oashi et al. 2013)。

近年，慢性リンパ浮腫に対する治療法として，遊離リンパ組織移植術が注目されている。その中でも十分な組織量を有し，自由度の高い大網は，豊富なリンパ組織を含んでおり，局所のリンパ系再構築により適した組織であると考えられる。しかしながらその効果についての基礎的な検証をした報告はない。

当教室ではこれまでに，マウスの後肢リンパ浮腫モデルを用いてリンパ系再構築に関する様々な研究を行ってきた。マウスを用いてリンパ節切除後の大網移植動物実験モデルを作成し，効果を検証することおよび大網組織そのもののリンパ管新生に及ぼす作用を，また培養上清を用いて，分子生物学的評価について検証することを目的として本研究を立案した。

【材料と方法】

第一章において，8 から 10 週齢雄の C57BL/6N マウスを用いて，膝窩リンパ節切除後に組織移植を行うモデルを作製した。腹部皮下を通し有茎で大網を移植する有茎大網移植群，大網をブロック状に採取して血流を有さない遊離組織として移植とする遊離大網移植群を作製した。比較対照群としてリンパ節摘出群，近傍の後肢皮下脂肪を血流のない遊離組織として移植する遊離脂肪組織移植群を作製し，術後 4 週間時点で赤外観察カメラシステムを用いて後肢リンパ流を観察し，再疎通率を比較した。

第二章において，活性化大網の効果について，培養上清を用いて検証した。Polydextran 粒子を投与し活性化した大網（AO）群，PBS を腹腔内投与し反応した大網（PO）native な大網（NO）をそれぞれ採取し，培養上清を作製した。培養上清に含まれる mRNA を抽出し，含まれるサイトカインを検証した。
また，マウス後肢リンパ浮腫モデルを作製し，作製した後肢リンパ浮腫マウスを，

それぞれの培養上清と条件培地（AO, NO, CM;cultured medium）群に無作為に分け，手術日を含み 2 日ごとに局所皮下注射を 14 日間行った。健側に対する患側後肢の周径比を手術後 35 日まで評価した。また，手術後 6 日目にシリコンスプリントから 6mm 遠位で後肢浮腫部の皮膚，皮下組織を摘出し，Elastica-Masson 染色および Podoplanin, F4/80 に対する免疫組織化学染色で組織学的に評価した。画像閲覧ソフトウェアを用いて Elastica-Masson 染色では表皮ならびに真皮厚を計測，比較した。各群の皮膚の厚さは，表皮から真皮-脂肪接合部まで，無作為に選んだ 5 点で ImageJ ソフトウェアを用いて測定した。F4/80 陽性領域は，ImageJ ソフトウェアを用いて，100 倍の倍率で無作為に選択した視野を中心に定量した。

【結果】

第一章において，リンパ節切除後 4 週間の時点で組織移植を行わない場合，33%が再疎通することが示された。切除後に組織移植を行うと，有茎大網移植群で 83%，遊離大網移植群で 66%と再疎通率が増加した。一方，遊離脂肪組織を移植した場合は再疎通率 0%であり，再疎通が阻害された。

第二章において，活性化大網における mRNA 発現は，注入後 1 日目から 4 日目にかけて指数関数的に増加し，その後減少した。neurophilin-2 (NRP2), angiopoietin-2 (Ang2), and hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1α)は 1 日目に増加し，forkhead Box C2 (Foxc2) や prospero homeobox-1 (Prox1)は 1 週間後に増加した。Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C), Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D), hepatocyte grown factor (HGF)は経過による増量は認めなかった。後肢リンパ浮腫モデルに活性化大網の培養上清を投与すると，後肢の周径比は全群で術後 4 日にピークに達し，術後 35 日までに徐々に正常値に近づいた。計測時において，周径比は AO 群で NO 群および CM 群より有意に低く，浮腫の軽減を示した。周径比の減少は AO 群でより急速かつ顕著であり，他の群よりも浮腫の消失が良好であることが示唆された。また，リンパ管数は AO 群では CM 群より有意に増加した。一方 NO 群は明らかな有意差はみられないものの CM 群より増加する傾向にあった。

【考察】

第一章において，リンパ節切除後のリンパ系再構築において，大網移植術がリンパ管新生に関連する可能性が示唆された。有茎大網移植術として組織弁の血流を保持した状態で移植すると再疎通率は高く，より効果的な再建方法である

可能性が示唆された。しかしながら大網がリンパ管新生にどのような影響を及ぼすかに関する検証が難しく，活性化大網を用いた実験系で検証することとした。

第二章において，大網は VEGF-C や VEGF-D などの血管内皮細胞増殖因子を多く含むが，活性化するとさらに NRP2, Ang2, HIF-1α,Foxc2, Prox1 などのリンパ管新生, 血管新生に関わる因子を多量に放出することがわかった。また，活性化大網の培養上清を採取し後肢リンパ浮腫モデルへ投与すると，AO 群は NO 群 PO 群よりリンパ浮腫を早期に改善し，リンパ管新生を促進する作用を持つことがわかった。

リンパ浮腫に対する外科的治療として，1966 年から大網移植術が行われている。近年ではマイクロサージャリー技術の進歩により, 遊離組織弁として移植術が行われるようになったが, 基礎的な検証は行われていない。動物モデルでは血管が微小なため, 遊離移植の再現は困難であるが, より臨床に近いモデルとして有茎組織弁移植モデルを作製した。有茎組織移植群は遊離組織移植群に比べてよりリンパ管新生を促すことを示し，臨床におけるマイクロサージャリー手術の重要性を裏付けるものであった。さらに大網の持つ組織修復能, 免疫能は異物に対する反応として活性化すると増強することが知られており，活性化大網の培養上清を投与することで分子生物学的反応を検証した。活性化大網は VEGF-C などの種々のサイトカインを通じてリンパ管新生を促進することを示した。この結果は臨床的なモデルとは直接的な関連は乏しいものの，皮弁採取に伴うドナーの損傷を最小限とする再生医療領域への応用を検討しうる結果である。

【結論】

第一章において, マウスの大網移植モデルを作製した。血流を有した組織移植がより効果的である可能性が示唆された。

第二章において, 活性化大網をマウス後肢リンパ浮腫モデルに投与し，リンパ管新生を促し，リンパ浮腫の改善効果を有することを示した。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

Ang2	angiopoietin-2
ANOVA	analysis of variance
CM	cultured medium
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
ELISA	enzyme-linked immunesorbent assay
Foxc2	forkhead Box C2
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HE	hematoxylin and eosin
HEV	high endothelial venule
HGF	hepatocyte growth factor
HIF	hypoxia inducible factor
ICG	indocyanine green
IL	interleukin
LYVE-1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1
LVA	lymphaticovenular anastomosis
NDP	NanoZoomer Digital Pathology
NRP	neurophilin
PCR	polymerase chain reaction
PDE	photo dynamic eye
Prox1	prospero homeobox protein 1
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
SEM	standard error of the mean
SDF-1 α	stromal cell-derived factor-1 α
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLNT	vascularized lymph node transfer

緒言

【リンパ節郭清術の必要性と続発性リンパ浮腫の治療】

末梢リンパ節は平滑筋や弁の働きによりリンパを循環する機能と，リンパ節などのリンパ組織を有し抗原提示による免疫反応という免疫反応に関する機能がある。臨床において，悪性腫瘍の治療では，リンパ行性転移の治療および予防として，リンパ節郭清術が行われるが，末梢リンパ節の従来の機能が破綻することで循環系の破綻としてリンパ浮腫を，免疫系の破綻として易感染性，易転移性をきたしやすくなるとされている。

リンパ浮腫は重症度によって治療方法が異なり，慢性化すると難治化する。初期のリンパ浮腫に対しては理学療法が選択されるが，重症化すると局所の浮腫のみならずリンパ管が器質化し編成するため，リンパ管静脈吻合術（LVA），血管柄付きリンパ節移植術（VLNT）のような外科的治療の検討が必要である。特に VLNT は，ドナー部の局所リンパ構造を破壊するため，治療により得られる利益が損失を上回る必要があり，適応に関しては慎重な判断が必要である。(Schaverien *et al.,* 2019)

【リンパ系再構築の動物モデルでの検証】

ヒトに比べ，マウスの後肢はシンプルなリンパ系統を有しており，膝窩リンパ節を切除すると局所のリンパ系統が破綻し，ヒトでリンパ節郭清術を施行したモデルに近い状態となる。当教室では，局所のリンパ系の破壊と再構築について，マウスモデルを用いて検証してきた。

局所のリンパ系を外科的に破壊し，リンパ浮腫を生じた後肢の悪性黒色腫マウスモデルでは In-transit 転移や遠隔転移が増悪することを示した(Oashi *et al.,* 2013)。また，リンパ節摘出モデルでは他のリンパ節や肺への転移が増悪することを示し(Maeda *et al.,* 2018)，局所のリンパ系が免疫系に関与していることを示してきた。一方で後肢のリンパ流が破綻することでリンパ浮腫を生じる(Shioya *et al.,* 2016)。この再構築モデルとして，リンパ節切除後に切除したリンパ節を再移植することでリンパ流が回復することを示し(Maeda *et al.,* 2018)，その改良として VLNT モデルを検証したところ，リンパ管内皮細静脈（HEV）を多く有し，機能的な再建が可能になることを示してきた(Ishikawa *et al.,* 2019)。

【大網について】

大網は，腹腔内の臓器の一部で，胃の前面から下方，そして小腸にかけて広がる脂肪組織で構成される組織で，豊富な脂肪組織を有し，エネルギーの貯蔵庫として機能する。また血管が豊富に通っており，腹腔内の臓器への血流供給にも関与している。体温の調節や衝撃の吸収にも役立つほか，免疫系にも関与している。胃癌，大腸癌，卵巣癌などの腹腔内臓器の悪性腫瘍ではリンパ行性もしくは腹膜播種により大網へ転移する可能性があるとされている。

2 次リンパ組織として機能し，その中でも milky spot がリンパ節の役割を果たすとされている。感染源に対して，リンパ球やマクロファージが集簇し，活性化することで免疫的な役割を果たす。その性質と豊富な組織量から，形成外科領域では，胸部の重症感染症の組織充填に使用されてきた歴史がある。最近では，原虫に対する免疫反応として，Natural Helper T 細胞が発見されたが(Moro *et al.*, 2010)，まだ未知の領域も多く，さらなる研究が期待されている。

【遊離リンパ組織移植としての大網弁の開発】

前述の通り，大網は遊離リンパ組織移植の材料として，免疫的な観点から優れた組織である可能性が示唆されている。一部海外では，リンパ浮腫に対する治療として，鼠径，腋窩，顎下，鎖骨上部，大網などのリンパ組織を含んだ VLNT がすでに臨床応用されているが，特に大網移植に関する基礎的な検証はほとんど行われていない。

これらの事象について，動物モデルを用いて基礎的に検証することは，リンパ浮腫治療の新たな架け橋となる可能性があり，非常に重要な課題である。

【目的】

1. マウス後肢リンパ切除モデルにおいて大網移植モデルを作製し，外科的リンパ系再構築に最適なモデルを検討する。
2. 大網を活性化し，マウス後肢リンパ浮腫モデルを用いてリンパ浮腫に及ぼす影響を検討する。

第一章

大網を用いた外科的リンパ系再構築モデルの検討

1.1 緒言

1.1.1　背景

マイクロサージャリー技術の進歩により，近年ではリンパ浮腫に対して血管柄付き遊離リンパ組織移植術が施行される様になった。組織の採取部位は単径部，鎖骨上部，腋窩，大網を用いる報告(Nguyen *et al.,* 2017)があるが，その中でも豊富な組織を採取可能な大網に着目した。

単径リンパ節郭清術を行うと，大腿部の皮下組織が不足し，大腿動静脈が露出する。そのため縫工筋の移植を行い，組織を充填するのが一般的である。大網は腹腔内で胃底部から折りたたむ様に腸管に付着し，十分な組織量を有する。心臓血管外科や形成外科の領域では組織量と自由度の高さから，胸骨骨髄炎に対する治療として用いられている。リンパ組織移植と同時に組織充填を賄えるという観点から，血管柄付きリンパ組織移植術の手技として，大網移植術に着目して本研究を立案した。

これまでに，大網を用いたリンパ浮腫の動物モデルはイヌを用いた報告(Goldsmith *et al.,* 1966)がある。イヌの大網を有茎組織弁として挙上し，後肢のリンパ節を含んだ皮下組織を切除した後に組織移植を施行すると，リンパ流が再疎通することを，造影剤を用いて証明した。しかしながらこの動物モデルは費用対効果が低く，手技が複雑で侵襲が大きいというリスクがある。リンパ機能の再構築を研究するための最も費用対効果の高いモデルは，リンパ節やリンパ管へのアクセスの容易さなどから，齧歯類の肢にリンパ浮腫が作製されたものであるいう報告がある(Frueh *et al.,* 2016)。中でもマウスは，試薬や研究ツールが豊富なであり，未知の領域の多い解明リンパ系の研究においては有効であると考えられる。実際に，大網に限らず内臓脂肪に広げると腸管を含めた腸管膜脂肪を組織弁として使用した報告(Kawahira *et al.,* 1999)がある。ラットの腸管膜脂肪を腸管と合わせて組織弁として挙上し，後肢の皮下組織を切除した欠損部へ移植したところ非移植群に比べて早期の後肢周径改善を認め，大網・内臓脂肪が後肢のリンパ流再構築に寄与する可能性が示されている。

当教室ではこれまでに，循環・免疫の観点からマウス後肢に着目したリンパ系再構築の研究を行ってきた。放射線照射による続発性リンパ浮腫マウスモデルを開発しメラノーマを投与することで in-transit 転移を誘発した(Oashi *et al.*, 2013)。また，近年ではマウス後肢リンパ節を切除した後に再移植すると，正常リンパ流が回復し，移植したリンパ節はリンパ管との再疎通する(Maeda *et al.*, 2018)ことを示した。また，血管柄付きリンパ節移植モデルではリンパ高内皮細静脈がより多く発現し(Ishikawa *et al.*, 2019)，このモデルに悪性黒色腫を投与すると樹状細胞が増加し，免疫機能が回復する(Kusajima *et al.*, 2024)ことから，移植リンパ節が免疫と密接に関わることを示した。また，HIF−1α がリンパ浮腫の増悪を予防することを示す(Hoshino *et al.*, 2023)ど，マウスの後肢リンパに関する様々な研究で成果を挙げている。

これまでに大網移植がリンパ節切除後の組織に与える影響を基礎的に検証した報告は少なく，マウスを用いた動物の大網移植モデルの報告はない。最適な移植方法を検証し，新たな動物モデルを開発することを目的として実験を行った。さらに大網組織がリンパ系再構築に及ぼす影響を検討することとした。

1.1.2 目的

マウス後肢リンパ切除モデルにおいて大網移植モデルを作製し，最適な移植方法を検討する。

1.2 方法

1.2.1　動物実験計画

本研究は，動物実験計画「内臓脂肪移植による循環系・免疫系賦活効果についての検証」（承認番号 20-0059）の一研究として行った。「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和 48 年法律第 105 号），「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年文部科学省告示第 71 号），「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成 18 年環境省告示第 88 号），その他関係法令等に基づき，「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」（平成 19 年 4 月 1 日海大達第 61 号）に従って研究を遂行した。

1.2.2　動物実験施設

本研究は，北海道大学大学院医学研究院附属動物実験施設にて行った。マウスの飼育は，3 階小動物飼育実験エリアの小動物飼育室にて 12 時間明暗サイクルの人工蛍光管理，固形飼料および自動給水用ノズルによる標準飲食管理下に行った。動物実験は，3 階解析実験エリアの共同生体試料解析室 2 にて行った。

1.2.3　使用動物・機器・試薬

雄の C57BL/6N マウス（ブリーダー：Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Shizuoka, Japan；販売：Sankyo Labo Service Corporation, Inc., Sapporo, Japan）を 6-9 週齢で購入した。馴化のため入舎後 1 週間の予備飼育期間を設け，7-10 週齢で実験に用いた。

全ての処置・手術は，実験動物麻酔装置（Laboratory Animal Anesthesia System; Shinano Manufacturing Co., Ltd., Tokyo, Japan）を用いて，イソフルラン（Forane® Inhalant Liquid; AbbVie Inc., Tokyo, Japan）2.5-3%吸入による全身麻酔下に行った。手術の前日，サージカルクリッパー（3M Surgical Clipper; 3M Health Care, Borken, Germany）およびチオグリコール酸を含む除毛フォーム（Ask Hair Remove; Manet Co., Tokyo, Japan）を用いて，体毛を除毛した。

手術は，手術用顕微鏡（S100/OPMI® pico; Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen, Germany）を用いて，4 倍もしくは 10 倍の視野にて行った。縫合糸は，5-0 および 6-0 ナイロン糸（Crownjun Nylon Suture, Polyamide Monofilament Non-absorbable; Kono Seisakusho Co., Ltd., Tokyo, Japan）および 10-0 ナイロン糸（Keisei Medical Industrial Co., Ltd., Tokyo, Japan）を用いた。

注射は，27 ゲージの注射針付シリンジ(Myjector, syringe with an injection needle, for insulin; Terumo, Tokyo, Japan)を用いて行った。単径・膝窩リンパ節を可視化するため，2%パテントブルー(Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)溶液を用いた。また，インドシアニングリーン（ICG; Daiichi Sankyo Company Ltd, Tokyo, Japan) 25mg を溶解液 10mL に溶解し，使用した。

写真は，デジタル一眼レフカメラ(EOS Kiss X8; Canon Inc., Tokyo, Japan)にマクロレンズ(EF 50 mm f/2.5 Compact Macro Lens, Canon Inc.)および接写専用ストロボ(Macro Ring Lite MR-14EX, Canon Inc.)を装着して撮影した。

組織スライドは，バーチャルスライドスキャナ(NanoZoomer S210, Hamamatsu Photonics K.K.)を用いてスキャンした。デジタルデータは，パーソナルコンピュータ(MacBook Pro, 13-inch, 2018, version 11.6.4; Apple Inc., Cupertino, CA, USA)を用いて，画像閲覧ソフトウェア NanoZoomer Digital Pathology (NDP).view2 (Hamamatsu Photonics K.K.)上で観察した。

1.2.4　予備実験

1.2.4.1　マウス大網組織の同定と採取方法の確立

マウスの大網は 1 対の動静脈を有する脂肪組織として確認できる（図 1 ）。動物実験手技の安定，モデルの再現性の確認のため，マウスを用いて大網組織の配置，皮膚切開の位置を検討した。マウスを麻酔下に安楽死させて開腹し，大網の同定および腹部から膝窩への移植方法を検討した。また，採取した大網を組織学的に確認するため，4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(Wako Pure Chemical Industries Ltd.)に浸漬して固定した。

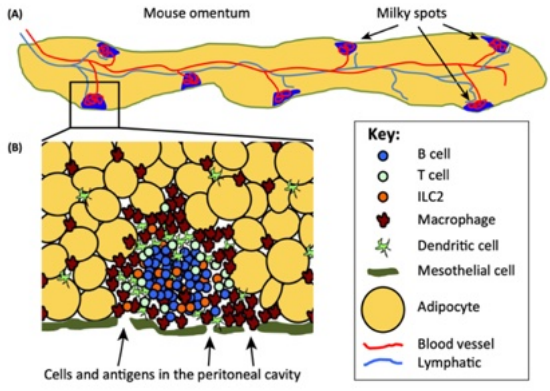


図 1. マウスの大網組織
マウスの大網は 1 対の動静脈を中心とした脂肪組織で形成され，周囲に milky spot を有する。milky spot にはリンパ球やマクロファージが集簇し，リンパ節と類似した機能を有すると考えられているが，詳細は解明されていない。(Meza-Perez S et al. 2017 より引用)

【パラフィン包埋・薄切】

自動包埋装置(Excelsior™ ES, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)を用いて，以下の方法でパラフィン包埋組織標本を作製した。アルコール(80% 30 分，95% 45 分，100% 60 分・60 分・75 分・90 分・120 分)で脱水，キシレン(60 分・90 分・90 分)で透徹，パラフィン(60 分・90 分・90 分)で包埋した。

滑走式ミクロトーム(Retoratome; Yamato Kohki Industrial Co., Ltd., Asaka, Saitama, Japan)を用いて，パラフィン包埋組織標本を切片厚 4 μm に薄切し，以下の手順で Hematoxylin and eosin(HE)染色を行った。

【HE 染色】

キシレン I・II (2 層各 5 分)，エタノール(100%，95%，80%，70%各 3 分)で脱パラフィン後，流水水洗した。ティシュー・テック 2 倍カラッツィヘマトキシリン(Sakura Finetek Co. , Ltd.)に 7 分浸し，流水水洗を 10 分行った。1%塩酸 70%エタノールで分別を 30 秒行い，流水水洗後，1%エオシン Y 液(Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan)に 2 分浸した。1〜2 秒水洗後，エタノール(70% 20 秒)で分別，エタノール(100% 1 分，100% 3 分，100% 3 分)で脱水，キシレン I･II･III (3 層各 5 分)で透徹した。標本用封入剤 NEW M･X(Matsunami Glass Industry, Ltd., Kishiwada, Osaka, Japan)を用いて封入した。

1.2.4.2　有茎大網弁の血流評価

挙上した大網弁の血流が維持できているかの確認のため，ICG を用いて蛍光造影を行い，血流を確認した。左腹部，肋骨の 1cm 尾側に約 1cm 大の皮膚切開をおき，腹壁の血管・リンパ管を損傷しないように腹直筋を切開，開腹した。大網を同定，腹腔外に取り出し，右側を切断した。その後右頚部に 1cm 程度の皮膚切開をおき，頸動脈を視認。ICG を 5 μl 局所注射し，直後に赤外観察カメラシステム(Photodynamic Eye, PDE; Hamamatsu Photonics K.K.)を用いて大網の血流を観察した。

1.2.4.3　遊離リンパ節移植モデルの検討

遊離大網移植のモデルとして，大網の移植方法を比較した。移植床は左膝窩リンパ節摘出部とし，いずれのモデルにおいても麻酔下に背臥位で予め左足蹠にパテントブルーを 5μl 局所注射し，リンパ節の同定・摘出することとした。パテントブルー投与後，腹臥位に体位変換し，後肢皮膚を切開して膝窩リンパ節を同定。摘出した。摘出部に，下記の方法で摘出した大網組織を移植し，10-0 ナイロン糸で固定した。各群 n=7(GroupD は手技獲得のため n=14)とした。

Group A；摘出した大網を 3mm 角に細分化し，そのすべてを組織移植した。

Group B；摘出した大網のうち，中央部から 7mm 大を摘出し，組織移植した。

Group C；可能な範囲で摘出した大網（約 2cm 大）を折りたたんで欠損部へ組織移植した。

Group D；Group A と同様に摘出し，3mm 角に細分化した大網を一塊のみ使用し，組織移植した。

いずれの群も組織移植し，腹直筋は 5-0 ナイロン糸で，腹部皮膚および左後肢皮膚の切開部を 6-0 ナイロン系で縫合した。

1.2.4.4　再疎通率の検討

手術を施行したマウスはいずれも術後 1,2,4 週後に ICG を用いて再疎通率を判定した。以下の方法を用いて判定した。マウスを麻酔下に背臥位とし，ICG を両側足蹠にそれぞれ 5 μl 局所注射した。注射後に一度覚醒し，再度 15〜20 分に麻酔下に背臥位および腹臥位でリンパ流を確認した。リンパ流は暗室下に PDE カメラを用いて観察し，膝窩リンパ節のみを通る群を再疎通群，単径リンパ節など従来と異なるリンパ流を呈する群を非再疎通群と判定し，各群での再疎通率を比較した。

1.2.5　本実験

1.2.5.1　実験計画

予備実験において，大網の移植方法をそれぞれ検証した。結果に基づき，有茎大網移植群，遊離大網移植群，遊離脂肪移植群，また比較対照群としてリンパ節を摘出した群をそれぞれ n=6（計 24 匹）作成した。

1.2.5.2　モデル作製手技

予備実験を参考に，以下の手順で各群を作製した。なお，膝窩リンパ節の摘出は下記の共通手技を施行した。マウスを腹臥位とし，2%濃度のパテントブルー(Wako, Osaka, Japan)をマウスの後肢の左足蹠に皮内注射した。眼科用曲剪刀を用いて左鼠径を切開して，左膝窩リンパ節周囲まで皮下組織を愛護的に剥離し膝窩リンパ節露出した。リンパ節および流入・流出するリンパ管（末梢および中枢それぞれ 3mm 長）を合併切除した。

有茎大網移植群（Pedicled omental flap）；左下腹部の季肋部より 1cm 尾側を皮膚切開し，腹直筋を横切開した。筋体より出血する場合はバイポーラを用いて焼灼止血を行った。肝臓裏面にアプローチし，胃底部と連絡する大網を確認し，脾臓との付着部を愛護的に剥離した。腹腔内の右側を切断し，大網弁を有茎組織弁として挙上した。左後肢の皮膚を 5mm 切開し，腹直筋に鉗子を用いて瘻孔を作成し，大網組織弁を腹壁から皮下へ誘導した。その際，鼠径リンパ節を損傷しないよう，大腿動静脈より尾側に瘻孔を作成することとした。左後肢皮下を経由して皮下に留置し，マウスを背臥位へと体位変換して左後肢のリンパ節摘出部へ誘導，移植して 10-0 ナイロン系で固定した。移植後，腹部および鼠径の皮膚は 5-0，6-0 ナイロン糸を用いて閉創した。

遊離大網移植（Free omental graft）群；予備実験 Group D を遊離大網移植群として作製した。

遊離脂肪移植（Free Fat Graft）群；左膝窩リンパ節摘出後，リンパ節およびリンパ管を含まないように後肢皮下脂肪組織を採取した。採取する組織量は上記遊離大網移植群を同様になるよう，一塊として摘出し，膝窩リンパ節切除部へ移植した。移植組織は 10-0 ナイロン系で固定した。移植後，両側鼠径の皮膚は 5-0，6-0 ナイロン糸を用いて閉創した。

リンパ節摘出（Control）群；左膝窩リンパ節を摘出し，十分な止血を確認してそのまま閉創し，これをリンパ節摘出群とした。

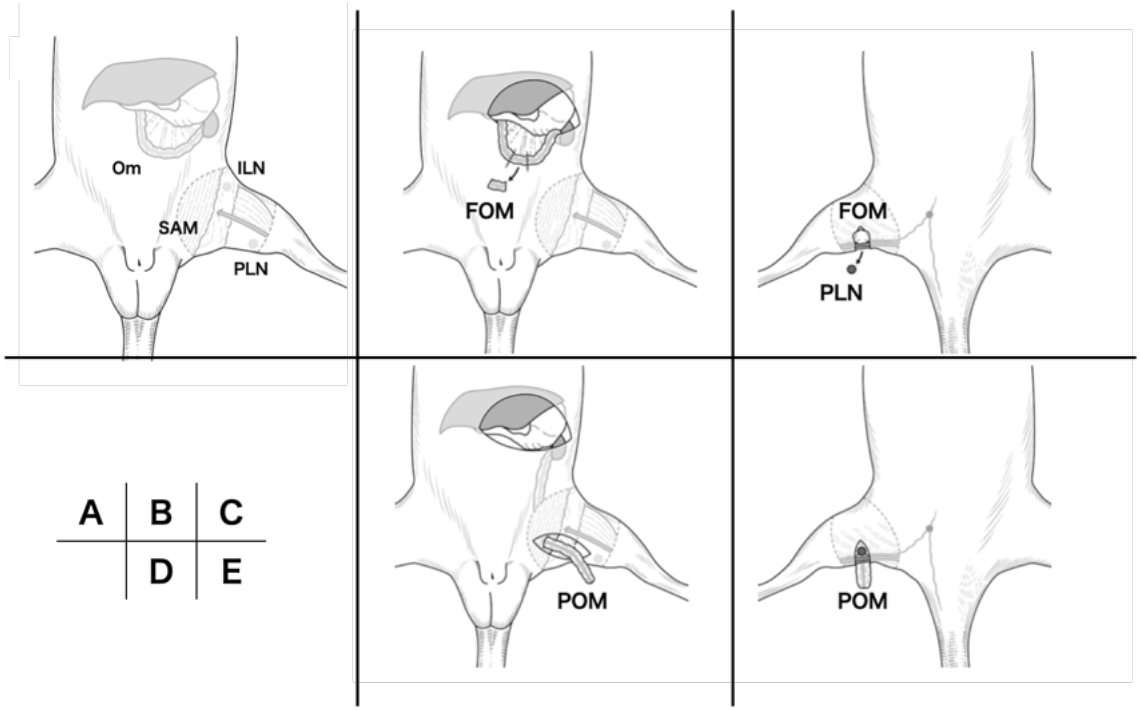


図２．大網移植モデルの作成（有茎，遊離大網移植群）

A; 術前（背臥位）。マウスの大網と後肢リンパ節の位置。

B, C; 遊離大網移植モデル。開腹し，大網を 3mm 大の組織片として採取（B），

腹臥位として左膝窩リンパ節摘出部へ移植した（C）

D, E; 有茎大網移植モデル。開腹し挙上した大網弁は左鼡径で皮下へ誘導し（D），

腹臥位として左膝窩リンパ節摘出部へ移植した（E）

Om; omentum, PLN; popliteal lymph node, ILN; inguinal lymph node, SAM; straight abdominal muscle, FOM; fragmented omental graft, POM; pedicled omental graft.

1.2.5.3　再疎通率の評価

再疎通率は予備実験（1.2.4.4）と同様の手技を用いて ICG，2%パテントブルー溶液を足蹠皮下に局所注射して評価した。評価するタイミングは浮腫が生じる術後２週，および後肢のリンパ流が再構築される術後４週とした。

1.2.5.4　組織学的検討

いずれのモデルも術後 4 週目に，麻酔下に左大腿部のリンパ節移植部を周囲の脂肪組織を，周囲の脂肪組織を含めて摘出し，4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(Wako Pure Chemical Industries Ltd.)に浸漬して固定した。

1.3 結果

1.3.1　予備実験

1.3.1.1.1　除毛の範囲，タイミング

除毛の範囲は，開腹手術および後肢血流の判定のため，季肋部から両側下半身全体に行う方法が有用であった。除毛が不十分な場合には ICG によるリンパ流評価の際に撮影できない状況が生じたため，発毛を認めた場合は適宜除毛を実施することとした。除毛のタイミングは，泡状の除毛剤が液状化した状態で用いた際，除毛翌日に皮膚障害が発生したため，本実験では除毛フォームが液状化していないことを確認し，手術前日に除毛を行い，手術当日に皮膚障害がないことを確認した後に実験を開始することにした。

1.3.1.1.2　マウス大網の採取と組織弁の配置

マウスを麻酔下に安楽死させ，開腹して大網を確認，組織採取した。肝臓胃底部と薄い皮膜で連絡し，脾臓に付着する大網組織を同定した（図３）。大網を右側で切断し，左膝窩リンパ節摘除部まで移植可能であることを確認したのちに，大網組織を採取した。大網は顕微鏡下に視認可能な血管を有する脂肪組織として確認できた。採取可能な大網の長さは約 2cm であった。

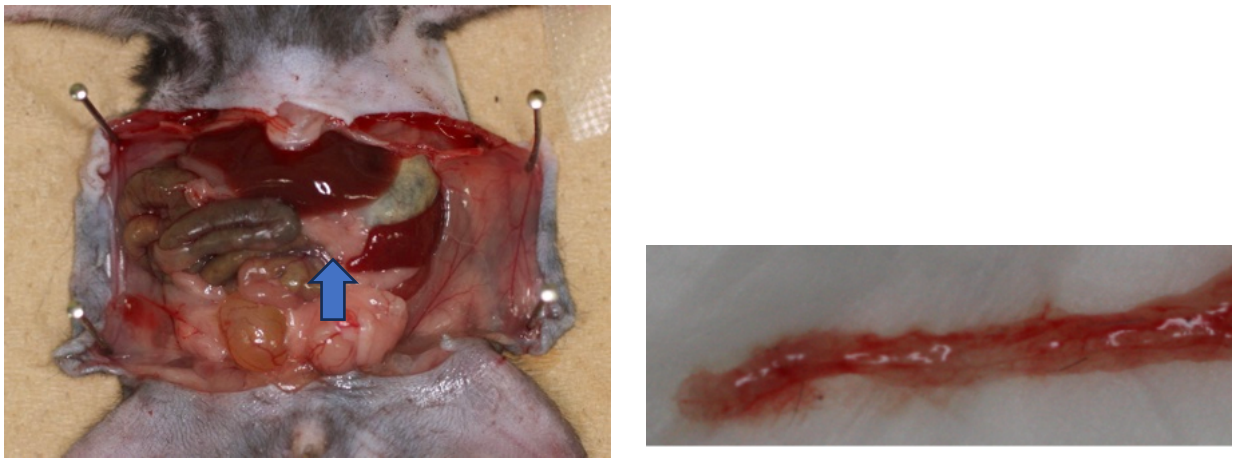


図３．マウスの腹腔内解剖（左）と大網組織（右）

大網（矢印）は開腹後に肝臓の裏面に隠れるように位置している

1.3.1.1.2　マウス大網の組織学的特徴

摘出した大網を組織学的に確認した。既報と同様に，中央に血管を有する脂肪組織として確認できた。概ね脂肪組織で構成されており，周囲にリンパ球の集簇（milky spot）が確認できた（図４）。

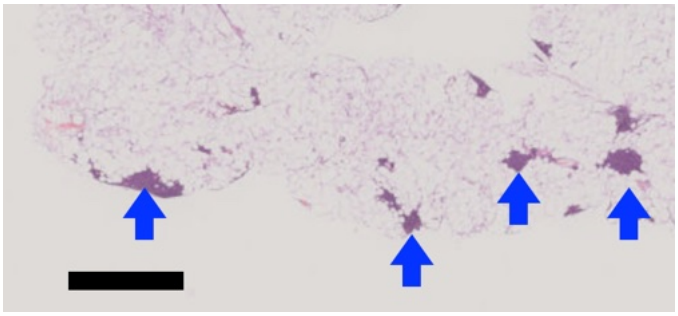


図４．大網組織（HE 染色，x40）

脂肪組織と周囲に milky spot を複数認めた（矢印）。（scale bar=1mm）

1.3.1.2　有茎大網弁の挙上と血流の確認

マウスの大網弁を挙上した状態で，頚部より ICG を動脈注射し，血流を確認した。挙上した組織弁は先端まで血流があることを確認した（図５）。マウスの大網においても両側からの血管により組織への血流が担保されていることを確認し，有茎組織移植弁が挙上可能であることを確認した。



図５．大網弁の挙上（左）と ICG による血流の確認（右）

左に示す通り，右側で切断して大網弁を挙上した（緑矢印は切断部）。ICG で確認すると切断部まで造影効果を認め，組織弁の先端まで血流があることを確認できた。

1.3.1.3 遊離大網移植モデルの検討

Group A のうち 2 体は, 術後腹部からの出血もしくは感染による脱落があり, n=5 で評価した。Group B･C･D は術後合併症なく，術後 4 週で安楽死させるまで生存した。

Group A･B･C はいずれも再疎通率が 20~42%であった。過去の当教室の報告では切除したリンパ節を再移植した場合の再疎通率は 100％(Maeda *et al.,* 2018)，膝窩リンパ節切除後に同側の鼠径リンパ節を有茎で移植した場合の再疎通率は 64%(Ishikawa *et al.,* 2019)であり，リンパ管新生に寄与しない可能性が考えられた。

Group D は比較的良好な再疎通率を呈し，これを遊離大網移植群として本実験に使用することとした。

Group	Lymphatic reconnection rate (%)
Group A (n=5)	20
Group B (n=7)	42
Group C (n=7)	29
Group D (n=14)	64

表 1; 遊離大網移植モデルの再疎通率

GroupD の再疎通率が 64%と最も高かった

1.3.2 本実験

全てのマウスが創離開などの術後合併症なく，術後 4 週で安楽死させるまで生存した。手術操作を加えた範囲に解剖学的変異は認めなかった。

・ICG を用いた再疎通の判定

マウスの足蹠に ICG を皮下注射すると，後肢リンパ流を PDE カメラで観察できる。膝窩リンパ節を摘出すると，通常は膝窩リンパ節領域へのリンパ流が途絶し，鼡径リンパ節領域へ流入する変化が生じる。しかしながら，リンパ流が再疎通すると従来の膝窩リンパ節領域への流入が確認できる。この変化は術後 1〜3 週までに生じるため, 術後 4 週時点でのリンパ流が膝窩リンパ節領域へ流入したものを再疎通例として評価した（図 6 ）。

・色素を用いた再疎通の判定

マウスの足蹠に注入した色素はリンパ管を通り膝窩リンパ節領域に集積した。集積を認めない症例を非再疎通例として判定した（図 7 ）。集積しない症例では移植した大網組織は白色の壊死組織をして確認された。

ICG と色素を用いた竿疎通の有無の結果は概ね一致した。

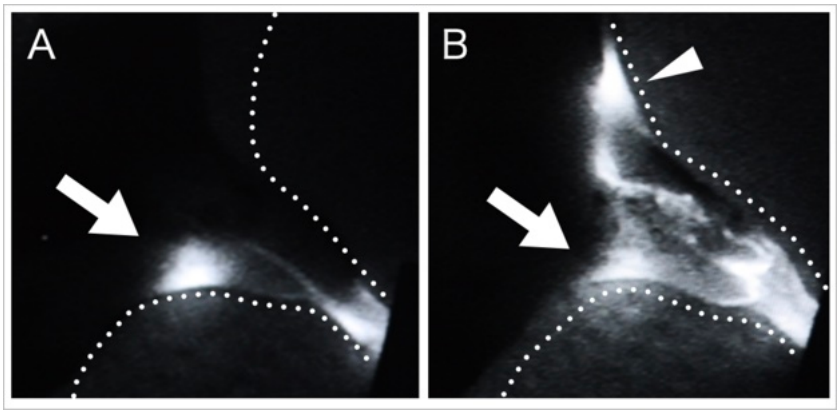


図６．術後４週時点での左後肢リンパ流

A;膝窩領域のリンパ節切除部に軽度の鬱滞を認めるが, 後肢にリンパ浮腫を認めずリンパ流が再疎通した。

B；膝窩領域の鬱滞と㑊径リンパ領域への側副路形成を認め，再疎通が得られなかった。また，後肢全体にリンパ浮腫の所見を認めた。

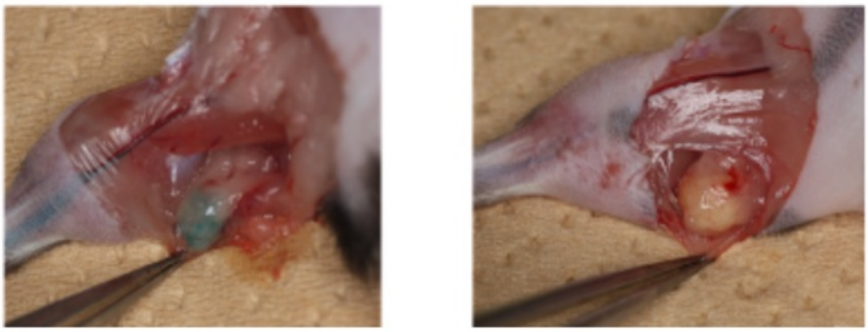


図７．後肢リンパ節移植後の肉眼的所見

マウス右後肢の肉眼所見。再疎通例では膝窩リンパ節領域に移植組織への色素の集積を認めた（左)。非再疎通例では色素の集積はなく，壊死組織を認めた（右)。

Group	Lymphatic reconnection rate
Control	33
Pedicled omental flap	83
Free omental graft	66
Free fat graft	0

表 2；各群のリンパ再疎通率

・各群の再疎通率の比較

各群の再疎通率を表 2 に示す。術後 4 週の時点において，リンパ節を摘出すると 33%であったが，有茎大網移植群では 83%，遊離大網移植群では 66%の再疎通を認めた。一方で脂肪組織を移植すると再疎通せず，血流の有無を問わず大網がリンパ管新生に関与している可能性が考えられた。

・組織学的所見

正常大網は通常の脂肪組織に類似した所見を呈する。今回作成したモデルにおいて，術後 4 週時点で移植組織を採取し，各群を比較検討した。大網移植群において，隔壁を有する脂肪組織の残存を認め，大網の形態を維持したものである可能性があったが milky spot を含めて移植組織が大網として機能している証明までは至らなかった(図 8)。

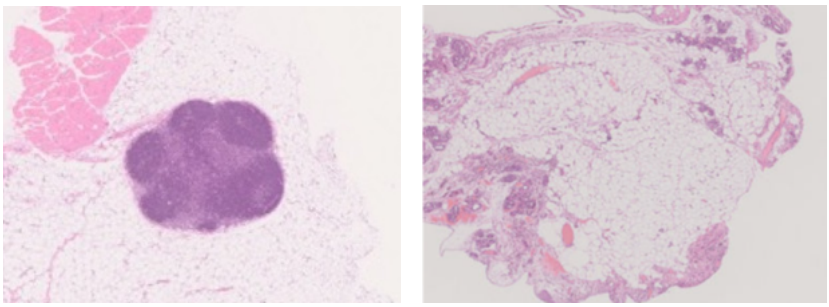


図 8. 膝窩リンパ節（左）と遊離移植大網後の膝窩領域の組織（右）（HE 染色 x40）
HE 染色，弱拡大の所見。移植後の大網組織にリンパ節は認めない。隔壁に覆われた脂肪組織の辺縁にリンパ節の部分的な集簇を複数認めた。

1.4 考察

本研究はマウス後肢リンパ節摘出後に大網を用いて再建した世界で初めての動物モデルである。

大網は豊富な血管性と免疫調節機能により，特に汚染された創傷や感染を伴う慢性創傷に対する治療として選択肢となる。血管新生の促進，炎症の抑制，組織再生の促進を促すことで創傷治癒に寄与し，再建および再生医療における重要な役割を有する(Mazzaferro *et al.,* 2018)。リンパ浮腫の治療においては，リンパ組織だけでなく，リンパ節としての機能を有する組織を有しているため，新たなリンパ系を再構築する組織として期待されて使用されている(Cranshaw *et al.,* 1990, Schurink *et al.,* 2019)。

リンパ浮腫に対する大網組織弁による再建術は，1966 年に初めて報告された。当初は上肢のリンパ浮腫に対して，大網を有茎組織弁として挙上し，皮下へ移植することでリンパ流が回復すると報告された(Goldsmith *et al.,* 1966)。ドナーに多大な侵襲をきたすため主流とはならなかったものの，近年の腹腔鏡手術やマイクロサージャリー技術の発展により，ドナー採取部の侵襲を抑え，かつ顕微鏡下に血管吻合を付加することで遊離組織弁の手術か可能となり，再び注目されることとなった。(Chu *et al.,* 2017)。しかしながら，基礎的な検証はまだ乏しい現状がある。

動物モデルでは，1967 年に Goldsmith らが報告したイヌの大網移植モデル(Goldsmith *et al.,* 1967)がある。イヌの後肢リンパ郭清術施行後に大網を移植し，手術後に造影 Xp を用いてリンパ流を確認するリンパ流が回復した。腹腔内脂肪に着目した研究としてラットの腸管膜移植モデル(Kawahira *et al.,* 1999)の報告がある。腸管膜脂肪を含めた大腸組織弁を後肢に移植するとラットの後肢リンパ浮腫を早期に改善すると報告している。特に Kawahira らは，腹腔内脂肪組織が組織修復に関与し，リンパ管新生が促進されることを報告した画期的なものであるが，顕微鏡下の腸管吻合といった専門的な技術を要し，動物への侵襲も高いものであった。そこで，ラットよりも試薬や研究ツールが豊富なマウスで検討し，より簡便なモデルを作成することで，未解明な部分の多いリンパ浮腫の研究の発展に寄与すると考えてモデルの開発を開始した。

有茎大網移植モデルはこれまでに報告がなく，リンパ流の解剖を理解する必要がある。マウスの後肢リンパ流はヒトに比べて簡潔で，足蹠は膝窩リンパ節を経由して坐骨リンパ節，腹腔内へと流入する。一方，足背および後肢背面のリンパ流は鼠径リンパ節へ流入し，腹部の 2 本のリンパ管を通じて腋窩リンパ節へ流入する(Suami *et al.,* 2011)。今回のモデル作成にあたり，大網組織弁採取時の

腹部切開で鼠径リンパ節より上流のリンパ管を切断すると後肢のリンパ鬱滞が増強した。また，有茎大網組織弁を鼠径部で皮下へ誘導する際，大腿動静脈近傍から誘導すると鼠径リンパ節の損傷を受けるために期待した結果が得られなかった。最終的にこれらのリンパ節・リンパ管を極力温存する形で作製したモデルを本実験で使用した。

また，遊離大網移植に関してもこれまでに報告はない。当教室でこれまでに行なった研究では，リンパ節を移植(Maeda *et al.,* 2018, Ishikawa *et al.,* 2019)する方法である。大網は免疫，循環に関与するリンパ組織であるものの，構造的なリンパ節を有さず，milky spot がその役割を担うと考えられている(Shimotsuma *et al.,* 1992, Litbarg *et al.,* 2007, Pinheiro *et al.,* 2012)。Milky spot は肉眼で確認できないため，遊離大網移植を行う際に移植組織にリンパ組織としての役割があるかを予備実験で検討した。当初は milky spot を多量に含む方が組織修復に寄与し，リンパ管新生が促進されると想定したものの，組織量の多い遊離組織移植は手術後 4 週までに壊死し，リンパ管新生を阻害する結果となった。

これらのモデルを用いて，本実験を行った。結果として，有茎大網移植群で再疎通率が最も高く，リンパ節移植術の動物モデルとして最適である可能性が示唆された。過去に当教室ではリンパ節移植の際に血流を有する組織弁として移植すると，リンパ節内の高内皮細静脈（HEV; high endothelial venule）が保たれると報告した。高内皮細静脈はリンパ流と細静脈のシャントとして機能し，祖血環境下では萎縮するためにリンパ節の機能を維持するためには血流が重要であることを示した。今回のモデルにおいても，大網は HEV を有さないため同様の評価はできないものの組織血流の有無が再疎通率に関連する可能性が考えられた。

一方，本研究の限界として，大きく下記の 2 点が挙げられる。

第一に，組織学的評価が困難である点である。大網はそのほとんどが脂肪組織で構成され，通常の後肢皮下脂肪組織との判別が困難である。また，再疎通後のリンパ管も基本的には 1 本のリンパ管で構成され，組織学的に抽出することが困難であった。第二としては組織解析の妥当性が得られないことである。後肢リンパ節切除後のリンパ管新生・再構築の過程で，術後 2 週間程度は後肢全体に浮腫が生じる。その際に局所でリンパ管新生に関わる因子などが放出されていることが予想されるが，採取時点では再疎通の有無を判断できないため，採取した組織と再疎通率の因果関係を証明する手段とはなり得なかった。

そこで，第二章において移植後に後肢で大網組織としての機能を有するか，および大網組織の持つ創傷治癒因子の解析を行うべく，活性化大網に着目して新たな動物モデルを用いて検証することとした。

第二章

活性化大網培養上清のリンパ浮腫に対する効果の検討

2.1 緒言

2.1.1 背景

第一章において，大網移植モデルを作製し，最適なモデルについて検証した。しかしながら，大網組織の移植後局所における反応を検討したが，明確な結果は得られなかった。そこで，より大網の効果を検証すべく，活性化大網の作用に着目して追加実験を行うこととした。

大網は腹腔内の異物に反応して活性化することが知られている。2009 年，Muro らは腹腔内に寄生虫が感染すると，寄生虫の産生する IL-33 に Natural Helper T 細胞反応して多量の Th2 サイトカインを産生し，これに反応した B 細胞が IgA を産生し，排虫することを報告した。NH 細胞は胸腺欠損マウスでもその存在が確認されており，胸腺外分化する細胞である(Moro *et al.,* 2010)。

Milky spot は他にも異物に対する反応を示し，ポリデキストラン粒子を腹腔内投与すると大網の milky spot 内に取り込まれ，活性化し VEGF や SDF-1α などのサイトカインを多量に放出する。このため，血管新生や創傷治癒に関与している可能性が示唆されている(Meza-Perez *et al.,* 2017)。

このことから，第一章において作製した大網移植モデルに対し，①活性化した大網を移植組織として用いる，②移植した大網を活性化することで局所のリンパ流改善に及ぼす影響を予備実験で検討した。しかし注入したポリデキストラン粒子による炎症が強く作用したため，他のモデルを用いることとした。

当教室ではこれまでに，マウスの後肢リンパ浮腫モデルを作製し，リンパ浮腫に対する効果を検証してきた。特に低酸素活性化因子である HIF-1α 安定化薬を投与すると，後肢の周径，ならびに皮膚圧を抑制し，リンパ浮腫の予防薬として有効である可能性を示した(Hoshino *et al.,* 2023)。

そこで活性化大網の培養上清をマウス後肢に投与することで，活性化大網の持つ分子生物学的効果を検証することを目的に，活性化大網から培養上清を採取し，後肢リンパ浮腫モデルを作製する際に皮下に投与することで，リンパ浮腫を早期に改善するかを検証した。

2.1.2 目的

活性化大網の培養上清リンパ浮腫に及ぼす影響を検証する。

2.2 方法

2.2.1　実験計画

本研究は，動物実験計画「リンパ浮腫治療の次なる一手~活性化大網培養上清を用いたリンパ浮腫の早期改善」(承認番号 23-0133)の一研究として行った。関係法令等に基づき，「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」(平成 19 年 4 月 1 日海大達第 61 号)に従って研究を遂行した。

2.2.2　活性化大網を用いたマウス大網組織移植モデル

120 μM の Polydextran 粒子を含む溶解液(Biogel P-60, 120 μM; Biorad Laboratories, Richmond, CA, USA.を生理食塩水に 1:1 で溶解）し，マウスの腹腔内に投与した(Shah *et al.*, 2012)。大網は投与 7 日後に活性化したことを確認し，第一章と同様の手法で有茎組織弁として使用した。

比較対象として第一章で作成した有茎大網移植モデルでリンパ流が再疎通した個体に対し，後肢皮下にポリデキストラン粒子溶解液を局所注射し，組織を採取した（各群 n=4)。採取した組織は第一章と同様の方法で HE 染色した。

2.2.3　活性化大網培養上清の作成

マウスの腹腔内に 120 μM Polydextran 粒子溶解液(生理食塩水に 1:1 で溶解)を投与し注入後 0，1，4，7，14 日目にそれぞれ 4 匹のマウスを安楽死させ，大網を採取した。

2.2.4 Quantitative polymerase chain reaction；qPCR による活性化大網の評価

2.2.4.1 RNA 抽出

ポリデキストラン粒子注入後 0，1，4，7，14 日目にそれぞれ 4 匹のマウスを安楽死させ，大網を採取した。RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて RNA を抽出し，DS-11 分光光度計(Nano Drop ND-1000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)を用いて定量した。抽出した

2.2.4.2　逆転写反応

1 μg の total RNA から 逆転写反応により cDNA を作成した。逆転写酵素として High Capacity RNA-to-cDNA Kit(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を使用した。サーマルサイクラー(GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems)による逆転写反応条件は 37℃・60 分, 95℃・5 分, 4℃・∞とした。

2.2.4.3 qPCR

StepOnePlus Real-Time PCR System(Applied Biosystems)を用いて，初期熱変性 95℃・10 分，熱変性 95℃・15 秒，アニーリング伸長反応 60℃・1 分×40 サイクルのプロトコールで qPCR を行った。cDNA は 5μl を Power SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)10μl と混合し，20μl のリアクションミックスとして使用した。PCR 増幅産物生成量を測定し，ΔΔCT 法により解析した。内在性コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ；GAPDH を用いた。使用したプライマーを表 3 に示す。

Genes	Direction	Sequence (5'-3')
Ang2	Forward	GACTTCTAAGTGGTGGGCACAG
	Reverse	TGAACATGTAAAGCACCCAAGAG
HGF	Forward	TCCATGTGGGACAAGAATATGGAG
	Reverse	CATCATCAGGATTCCCAGTA
HIF-1α	Forward	TGCGTGCATGTCTAATCTGTTCC
	Reverse	AAGATTCTGACATGCCACATAGCTC
Foxc2	Forward	AACGAGTGOGGATTTGTAACCAG
	Reverse	TTGGCAGTAACAGTTGGGCAAG
Lyve1	Forward	TCATGCACACCTTAGACACTTAGCC
	Reverse	TGCTTGTCAGCATGCTGTCC
NRP1	Forward	AGTCGTTCGAAGGCAACAACA
	Reverse	AGCCCAGTAGCTCCATCCTCA
NRP2	Forward	TGGTGATGACAATGGCTGGAC
	Reverse	GCAATGGCTGTGAGCATGG
Prox1	Forward	AGCCAGTGTTTAATCTTTGCATCC
	Reverse	AACCATTTGCCTGCTCATTCC
VEGF-C	Forward	TGCTGCTGCACATTATAACACAGA
	Reverse	CGGACACACATGGAGGTTTAAAGA
VEGF-D	Forward	GCTGCCTGGAAACAACTGCTTA
	Reverse	CCTGAAGCCCTGCACCAAGTA
GAPDH	Forward	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	Reverse	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

表 3 .使用したプライマー: Ang2, angiopoietin 2; Foxc2, Forkhead Box C2; HGF, hepatocyte growth factor; HIF-1α, hypoxia inducible factor 1 alpha; Lyve1, lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1; NRP1, neuropilin 1; NRP2, neuropilin 2; Prox1, Prospero homeobox 1; VEGF-C, vascular endothelial growth factor C; VEGF-D, vascular endothelial growth factor D; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

2.2.5 培養上清の回収

上清は既報(Li *et al.,* 2023)に準じて，以下の方法で回収した。摘出した大網はリン酸緩衝生理食塩水（PBS; phosphate-buffered saline）で 3 回洗浄した後，12wel plate に入れ，2mL の DMEM /F-12 溶液(Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)に浸し，10%ウシ胎児血清（FBS; fetal bovine serum）と 100 U/mL ペニシリン，100 μg/mL ストレプトマイシン（Wako Pure Chemical Industries）を加えた。各プレートを 37℃，5%CO2 環境下で 48 時間培養した。その後培養上清を回収し 14,800rpm，10 分間，4℃で 2 回遠心し，分解を防ぐため液体窒素で急速凍結し，-80℃で保存した。

2.2.6 Enzyme-linked immunesorbent assay(ELISA)

Polydextran 粒子溶解液を投与する活性化大網（AO; activated omentum）群，非活性化大網（NO; native omentum）群，Polydextran 粒子を含まない PBS 投与（PO; PBS-injected）群に分けて各群とも 6 匹のマウスから採取した大網の培養上清を使用し，上清中に含まれ VEGF-C の濃度を測定した。マウス VEGF-C ELISA キット（Elabscience, Houston, TX, USA）を用い，キットのサンプル濃度から作成したスタンダードカーブを用いて，抽出タンパクの濃度を測定した。

2.2.7.1 マウス後肢リンパ浮腫モデル

当教室が報告したマウス後肢リンパ浮腫モデル(Iwasaki *et al.,* 2017, Hoshino *et al.,* 2023)の作製法に従い，マウス後肢リンパ浮腫モデルの作製を行った。後肢リンパ浮腫のマウスモデルは，左鼡径部を全周性に皮膚切開し，鼡径リンパ節を含む脂肪組織を切除した。膝窩リンパ節周囲はについて脂肪を切除する前に，輸入および輸出リンパ管を結紮した。3mm 幅の長方形型のシリコン製のスプリントを 1mm 厚のシリコンシート(Tigers Polymer, Osaka, Japan)を使用して作製した。作製したシリコンスプリントを左鼡径の皮膚と筋肉に 6-0 ナイロンで縫合固定して後肢リンパ浮腫モデルを作製した。

2.2.7.2 培養上清の投与

上記で作成したマウス後肢リンパ浮腫モデルを無作為に 3 群に分けた：AO 培養上清を 0.1mL 皮下注射する群 (n=6)，NO 培養上清を 0.1mL 皮下注射する群（n=6)，条件培地（CM; cultured medium）を 0.1mL 皮下注射する群（n=6)。リンパ浮腫作製の手術当日から術後 14 日まで隔日で投与した。注射はすべてシリコンスプリントの遠位で行った。

2.2.9 浮腫の評価

後肢のリンパ浮腫の程度は，手術後 0，2，4，6，8，10，12，14，17，21，24，28，35 日目に定量的に評価した(各群 n = 6)。既報(Yoshida *et al.,* 2015, Hoshino *et al.,* 2023)を参考に，踵から 5mm 近位を測定した。生食で濡らした 3-0 絹糸で半結紮した後に結紮部を切り，長さを測定精度 0.05mm のノギス(Shinwa Sokutei,Niigata , Japan)で計測した。各時点で周径を両側で測定し，周径比を以下のように算出した。

周径比＝（浮腫側の後肢周径／健側の後肢周径）×100%

2.2.10 組織学的評価

術後 6 日目にマウスを安楽死させ，皮膚検体を採取した。検体は，創傷治癒による炎症の影響を軽減するため，シリコンスプリントから 6mm 遠位で採取した。皮膚切片を 4%パラホルムアルデヒドで固定してパラフィンに包埋した。

皮膚の厚さは Elastica-Masson 染色を用いて評価した。スライドのデジタル画像をホールスライドスキャナー（NanoZoomer Digital Pathology, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan ） で 取 り 込 み ， NDP.view2 software (Hamamatsu Photonics)上で計測した。各群の皮膚の厚さは，表皮から真皮-脂肪接合部まで，無作為に選んだ 5 点を ImageJ ソフトウェア(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて測定した。

2.2.11 統計分析

2 群間の解析は Student の t 検定で統計解析した。3 群以上に関しては，一元配置分散分析法(one-way ANOVA)で検定した後，多重比較検定(Tukey-Kramer 法)を行った。得られた結果は平均±標準誤差(standard error of the mean; SEM)で表した。$P < 0.05$ を有意差ありとした。

2.3 結果

3.1 結果

3.1.1 活性化大網を用いたマウス後肢移植モデル

マウス後肢リンパ摘出後に大網を移植するモデルを作製した（図 9)。活性化した大網は全体的に肥大化しており，易出血性であった。活性化大網移植群と移植後活性化群を作製し評価したが，止血操作を十分に行っても術後大網からの出血がコントロールできなかった。最終的にリンパ流の評価に至った個体はいずれの群も 2 個体であった。再疎通率は 50%（1/2）であり，第一章で作製したモデルより劣る結果であった。また，HE 染色では活性化大網組織弁を移植したモデルにおいて，移植後も既報(Litbarg *et al.*, 2007)と同様に milky spot 内に粒子を取り込んだ像が確認され，移植後も大網としての組織を保っていることが確認できた（図 10)。また，有茎大網移植後に後肢皮下に Polydextran 粒子を投与する群においても同様に粒子を取り込む像を確認した（図 11)。再疎通が得られなかった群に投与すると粒子は皮下脂肪の全体的にびまん性に分布していた（図 12)。



図 9. 有茎活性化大網移植モデルの作製
Polydextran 粒子を腹腔内投与した大網は活性化し，肥大化する（左)。非活性化大網と同様に組織弁の移植が可能であった（右)。

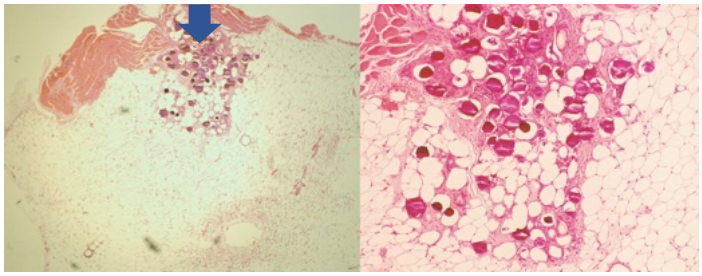


図 10. 有茎活性化大網組織弁モデル術後 4 週の左後肢皮下脂肪（HE 染色，左;x40 右;x100）
大網の構造は判別できないが，粒子を取り込んだ milky spot（矢印）を確認した（左)。

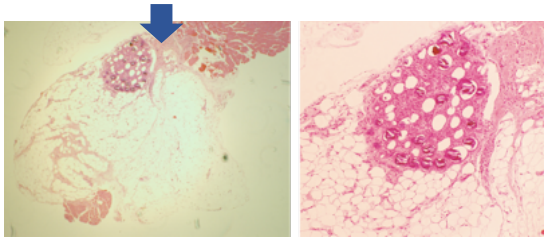


図 11. 有茎大網組織弁モデル polydextran 粒子投与後 1 週の左後肢皮下脂肪（HE 染色，左;x40 右;x100）
粒子を取り込んだ milky spot（矢印）が確認できる。また，移植大網組織の隔壁の一部が肥厚しており，通常の皮下脂肪と異なる所見を呈していた（左）。

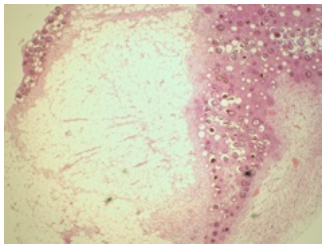


図 12. 有茎大網組織弁モデル polydextran 粒子投与後 1 週の左後肢皮下脂肪（HE 染色　x40）
粒子がびまん性に分布していた。

3.1.2 活性化大網の変化と組織学的所見

大網は活性化すると肉眼的に体積，血管が経時的に増加した（図 13A）。組織学的には脂肪組織の割合が徐々に減少し，細胞成分が増加した（図 13B, C）。

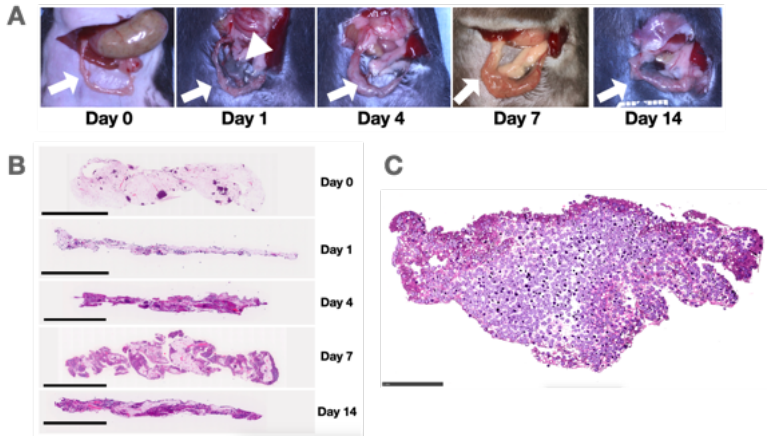


図 13. （A）肉眼的所見から，大網は活性化の過程で体積と血管が著しく拡張することが示唆された。1 日目では粒子の塊は凝縮し，薄い膜に包まれている。（矢印：大網；矢頭：吸収された粒子）。
（B） 逐次的な組織学的変化（HE 染色）
活性化すると脂肪組織の割合が徐々に減少し，細胞成分が増加する。（Scale bar: 5 mm）
（C） マクロファージに囲まれた粒子（HE 染色）
粒子は大網に取り込まれ，凝縮した粒子塊はマクロファージに取り囲まれた。（Scale bar: 1mm）

3.1.3 活性化大網の mRNA 量

薬剤投与後の大網の平均 RNA 発現量は，AO 群（35,486.95±2,714.30ng）で NO 群（3,819.17±322.48ng）および PO 群（3,521.91±325.44ng）に比べてほぼ 10 倍高かった（図 14）。

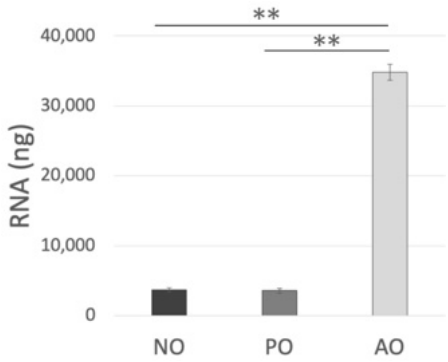


図 14. 7 日目の mRNA 発現量
AO 群の mRNA の発現量は NO 群，PO 群に比べて有意に高かった(*p < 0.05)。error bar＝SEM

3.1.4 qPCR によるリンパ管新生因子の発現の評価

Ploydextran 粒子投与後の大網組織において， mRNA 発現は，投与後 1 日目から 4 日目にかけて指数関数的に増加し，その後減少した（図 15 A）。リンパ管新生に関連する遺伝子発現の進行も評価した。neurophilin-2 (NRP2), angiopoietin-2 (Ang2), and hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α)は 1 日目に増加し，forkhead Box C2 (Foxc2）や prospero homeobox-1 (Prox1)は 1 週間後に増加した。Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C), Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D), hepatocyte grown factor (HGF)は経過による増量は認めなかった。lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (Lyve1)は，大網の活性化過程で減少した(図 15B)。

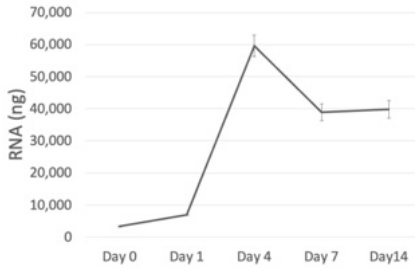


図 15 A. mRNA 発現量の経時的変化
mRNA の発現は，4 日目までは指数関数的な増加を示し，その後徐々に減少し，1 週間後にプラトーとなった。

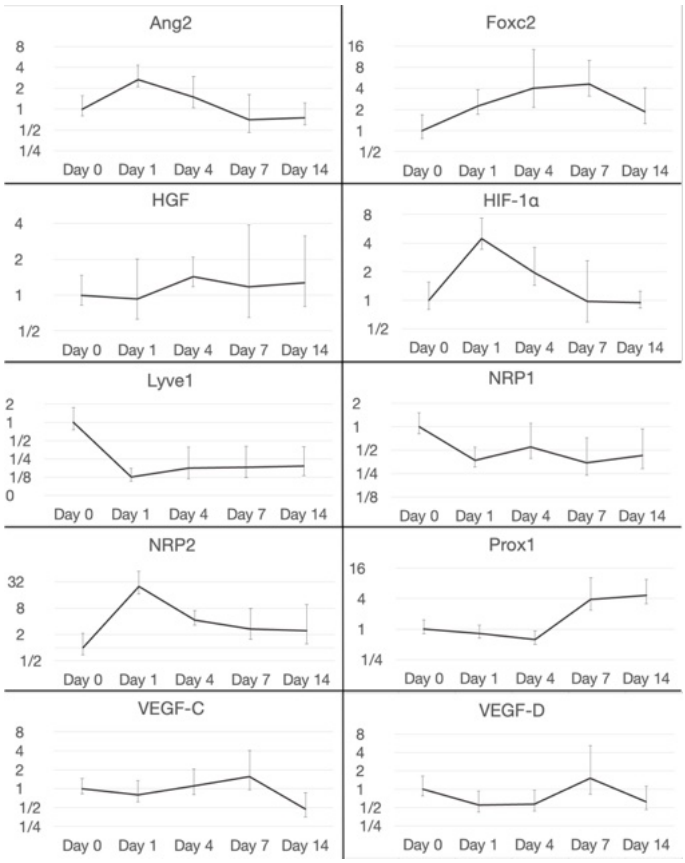


図 15 B.
リンパ管新生に関連する各種マーカーの経時的 mRNA 発現レベル
リンパ管新生と組織再生に関与する様々なマーカーを，0，1，4，7，14 日目に測定した。
全体として，組織刺激や傷害に応答した異なる役割と活性化時期を示唆した。HIF-1α や NRP2 のようなマーカーは低酸素または血管応答を示して早期に上昇する。一方 Prox1 のようなマーカーにおける持続的な増加は，リンパや血管の新生を促すことを示しているものと推察する。
(y axis: fold change)

3.1.5 培養上清に含まれる VEGF-C タンパク量(ELIZA)

平均 VEGF-C レベルは，AO 群（1270.8±136.0 pg/mL）で NO 群（277.5±68.4 pg/mL）および PO 群（388.0±65.8 pg/mL）より有意に高く，AO 群では VEGF-C の分泌が増加していることが示唆された（図 16）。

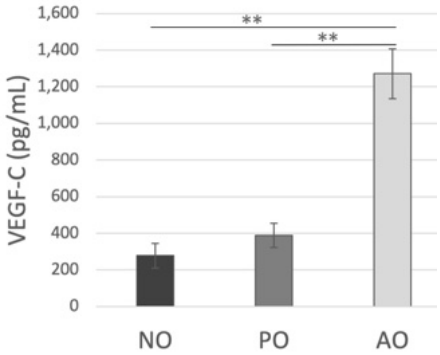


図 16. VEGF-C のタンパク量
VEGF-C のレベルは，NO 群および PO 群と比較して，AO 群で有意に高かった。（**: $p < 0.01$）。error bar ＝SEM

3.1.6 後肢周径比の測定による浮腫の評価

周径比は全群で術後 4 日にピークに達し，術後 35 日までに徐々に正常値に近づいた。術後 2，4，8，10，12，14 および 17 日において，周径比は AO 群で NO 群および CM 群より有意に低く，浮腫の軽減を示した（図 17)。周径比の減少は AO 群でより急速かつ顕著であり，他の群よりも浮腫の改善が良好であることが示唆された。

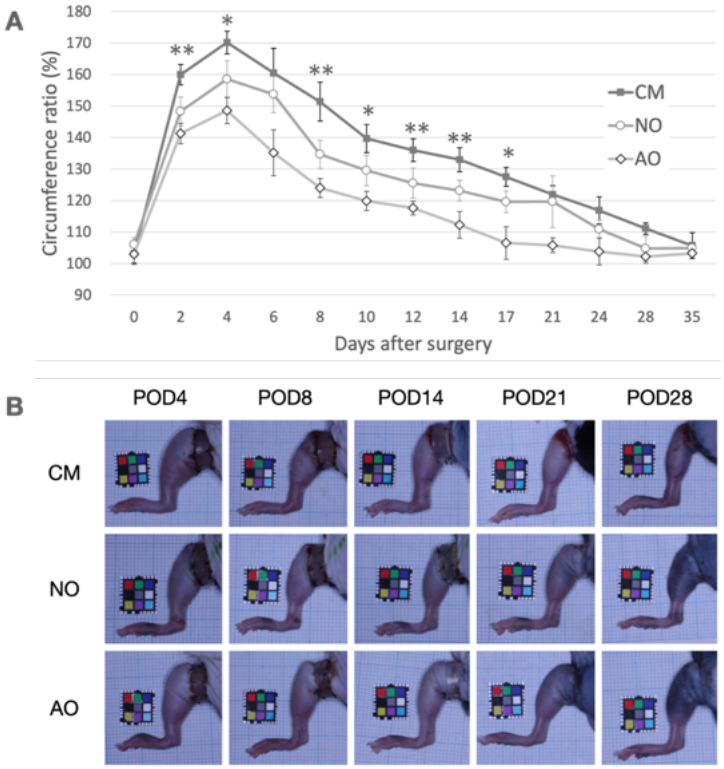


図 17. (A)周径比の経時的評価。AO 群は NO 群および CM 群に比して周径比が減少した。この所見は手術後 2 日目から 17 日目まで統計学的に有意であった(**: $p < 0.01$, *$p < 0.05$)。error bar＝SEM。(B)各群のマウス後肢リンパ浮腫モデル。後肢周径は踵から 5mm 近位で測定した。

3.1.7 組織学的所見

平均真皮厚は，CM 群（221.4±19.97μm）が NO 群（151.03±14.46μm）および AO 群（117.65±7.79μm）よりも厚かった。表皮においても同様の傾向がみられた。表皮の平均厚さは CM 群（54.06±4.85μm）が最も大きく，次いで NO 群（44.94±4.92μm），AO 群（28.37±2.59μm）であった（図 18)。

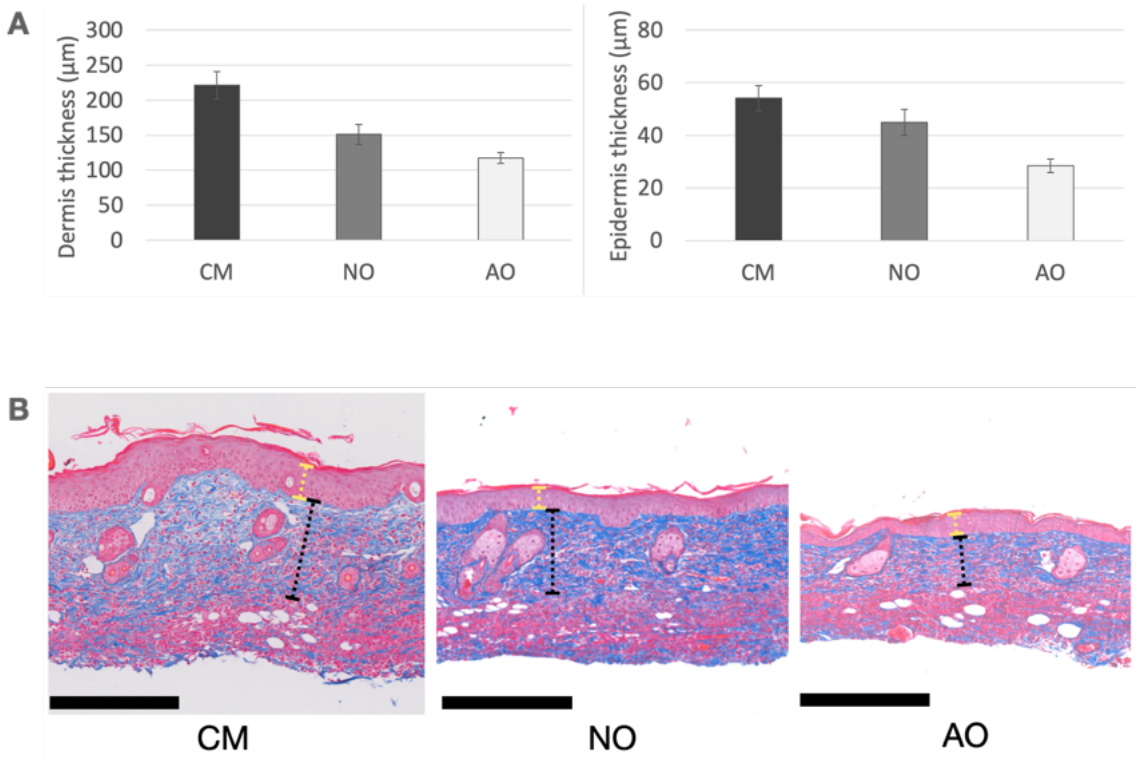


図 18. (A)平均真皮厚（左）と表皮厚（右）

NO 群と AO 群では真皮と表皮の厚さが CM 群に比べて有意に減少した（左）。皮膚の厚さは AO 群で有意に減少した（右）。

（B）組織学的所見（Elastica–Masson 染色, x40）

例に示す通り，各群 5 か所で測定した。

（*Yellow dotted line: epidermis; black dotted line: dermis; scale bar: 250 μm*）

2.4 考察

大網の有する再生能力は表 4 に示す通り様々な検証がなされてきた。これらの研究は，創傷治癒と組織再生の双方に関わる大網の重要な役割を示してきた。近年では，活性化した大網がさまざまな組織修復因子を放出することが知られるようになり，大網そのものとしての組織移植から活性化した大網や培養上清を用いる方向へシフトしつつある。

大網は，異物や原虫など暴露されると活性化することができる。活性化した大網は肉眼的に増大し，しばしば本来の 20 倍にもなると報告されている (Shimotsuma *et al.,* 1992, Litbarg *et al.,* 2007)。活性化した大網を用いた組織移植モデルは，その生理活性が促進されたよりよい材料として期待し，第一章のモデルを模倣して実験を計画した。しかしながら，再疎通率は非活性化大網を用いた移植モデルよりも低かった。これは血管の増生による出血および大網の粒子に対する炎症を惹起し，後肢へ波及したためと考えられ，新たな評価が必要となった。

そこで第二章では，大網組織弁の分子的特徴と機能性を調べると同時に，成長因子と生理活性分子を豊富に含む活性化大網培養上清を使用する代替法で検証することとした。

Li らは，8 週齢のマウスを活性化すると，重量は約 125mg に達すると報告している (Li *et al.,* 2023)。我々の研究では，この報告の 2 倍量の Polydextran 粒子を投与した 8 週齢のマウスの体重増加量は 0.19 - 0.30 g であった。大網が粒子を取り込み，膨張する肉眼的な活性化の過程を観察できた（図 13)。体重増加は既報から想定される増加量を上回っており，粒子の投与量を調整することで活性化の程度を制御できる可能性を示唆している。

一方，これまで活性化による遺伝子発現量を経時的に検討した報告はなかった。AO 群の RNA 発現量は NO 群および PO 群の約 7-8 倍に増加した（図 14)。NO 群と PO 群はいずれもほぼ同程度の遺伝子発現にとどまっており，PBS の注入が RNA 産生に有意な影響を与えなかったことを示唆している。このことから，AO 群の遺伝子発現を経時的に測定した。

AO 群では，1 日目までに HIF-1α，Ang2，および NRP2 の発現が早期に急増した。これは初期の低酸素および炎症反応を示唆しており，特に milky spot の糸球体様血管において，血管透過性および走化性の調節に重要な役割を果たしている可能性がある (Cranshaw *et al.,* 1990, Mucka *et al.,* 2016, Schurink *et al.,* 2019)。この応答により，腹腔内の急性炎症細胞を大網に誘導し，最終的に

異物の接種につながる。この特徴により，大網は急速に拡大し，免疫細胞と修復細胞の大量集積を支える足場を提供することができる。Foxc2 と Prox1 は 4 日目と 7 日目頃に増加し，血管の修復とリンパ管の適応を促進する(Dagenais *et al.,* 2004, Adamczyk *et al.,* 2016)。Lyve-1 は 1 日目からダウンレギュレーションするが，大網がリンパ管構造の維持から，組織の修復と免疫細胞の浸潤を優先するようにシフトしていることを示唆していると推察する(Jackson, 2004, Johnson *et al.,* 2007)。

培養上清の持つリンパ管新生および組織修復に関わる機能の検証のため，マウス後肢リンパ浮腫に応用して検証した。その結果，AO 群はリンパ浮腫の重症度と治癒までに要する期間の両方を軽減できることが示唆され，リンパ浮腫に対する治療効果が期待できることが示された（図 17)。AO 群では，表皮と真皮の両方に対して異なる効果を発揮し，皮膚のこれらの層における再生と修復を独立して促進し，全体的な治療効果に寄与する可能性がある（図 18)。

本研究の限界は，組織移植モデルとリンパ浮腫モデルを別々に評価したことである。臨床の場では，リンパ系の再建は失われた組織再建のための移植術とリンパ管の新生促進が必要であり，これらのモデルを統合的に評価することが不可欠である。もう一つの限界は，本実験が急性期モデルで行われたことであり，長期にわたるリンパ浮腫で観察される慢性的な線維性の変化や免疫の変化を完全には捉えていないことである。

表 4. 動物を用いた大網モデル

Authors	**Year**	**Animal**	**Evaluated organ or tissue**	**Type of induced injury/engraftment**	**Material from activated omentum**	**Induce of activation**	**Application**
Shimada	1995	Cat	Spinal cord	Traumatic	Tissue	No	Mechanical contact
Marques et al.	2002	Rat	Spleen	Traumatic	Tissue	No	Mechanical contact
Lee et al.	2003	Rat	Isolated hepatocyte	Engraftment	Tissue	No	Mechanical contact
Kin et al.	2003	Rat	Syngeneic pancreatic islet	Engraftment	Tissue	No	Mechanical contact
Singh et al.	2007	Rat	Pancreas	Induced diabetes	Tissue	Yes	Mechanical contact
Singh et al.	2008	Rat	Skin Kidney	Traumatic Ischemic	Omentum-derived stromal cells	Yes	Systemic injection
Singh et al.	2009	Rat	Liver	Traumatic	Tissue	Yes	Mechanical contact
Siena et al.	2010	Pig	Myocardium	Ischemic	Omentum-derived stromal cells	No	Local injection
Zhang et al.	2011	Rat	Scaffold for peripheral nerve	Surgical removal	Tissue	No	Mechanical contact
Mohammadi et al.	2011	Rat	Vein graft for peripheral nerve	Surgical removal	Omentum-derived stromal cells	No	Local injection
Shah et al.	2012	Mouse	Lung	Bleomycin	Omentum-derived stromal cells	Yes	Systemic
Bu et al.	2014	Rat	Cornea	Alkaline	Omentum-derived stromal cells	Yes	Local injection
Garcia-Gomez et al.	2014	Rat	Kidney	Surgical induction of chronic kidney disease	Tissue	Yes	Mechanical contact
Buyukdogan et al.	2016	Rabbit	Cartilage	Traumatic	Tissue	No	Mechanical contact
Pinheiro	2019	Mouse	Skeletal muscle (diaphragm)	Genetic	Tissue	No	Mechanical contact
Shadmani et al.	2021	Rat	Cornea	Alkaline	Omentum-derived stromal cells	Yes	Local injection
Li et al.	2023	Mouse	Skin Peripheral nerve Peripheral vessel	Diabetic, surgical	Supernatant of cultured tissue	Yes	Local injection
Our study	2024	Mouse	Skin Soft tissue	Surgical induction of lymphedema	Supernatant of cultured tissue	Yes	Local injection

3 総括および結論

3.1 本研究から得られた新知見

第一章

・マウス後肢リンパ摘出後に大網を移植するモデルを作製した。

・大網を移植するモデルにおいて，遊離脂肪移植モデルに比べて著明な再疎通率の向上を示した。

・有茎大網移植モデルは遊離大網移植モデルに比べて再疎通率は高かった。

第二章

・大網は Polydextran 粒子を投与すると活性化し，肥大および血管の拡張を認めた。特に遺伝子発現は 4 日目に最大となり，7 日以降は維持された。

・活性化大網培養上清の投与により，マウス後肢リンパ浮腫モデルの後肢周径，リンパ流のうっ滞が改善した。

3.2 新知見の意義

第一章において，マウス大網移植モデルを開発した。これまでの報告では，イヌ，ラットを用いた報告であり，試薬の多いマウスを用いたモデルの開発はさらなる解析への足がかりとなることが予想される。今回，有茎組織弁移植モデルが遊離組織弁移植モデルより高い再疎通率を示した。効果的な血流を保持した状態での組織移植がよりリンパ流の再構築に寄与することも示唆する結果である。また，今回の結果では内在的にリンパ節を有さなくとも，リンパ管新生を促す効果があることを示した。

第二章において，活性化大網の有するサイトカインは経時的に変化し，1 日目に HIF-1α，Ang2，および NRP2 が，7 日目には Foxc2 と Prox1 が増加することを発見した。VRGF-C や VEGF-D，HGF は常に一定以上が含まれており，抽出の時期により効果的な培養上清を作製できる可能性が示唆された。またの培養上清投与は，マウス後肢リンパ浮腫モデルにおいて，浮腫の後肢周径の減少，リンパ流のうっ滞の改善効果を発揮することを示した。これらの結果は，活性化大網培養上清がリンパ浮腫に対する治療に有用である可能性を示唆している。

3.3 今後の展開

第一章において，現時点での評価はリンパ流の再疎通率という限定された結果に留まった。マウスのリンパ流を理解し，低侵襲なモデルの開発には至っており，今後は局所および全身の分子生物学的検討を継続しする予定である。また，第二章では活性化大網の培養上清が持つリンパ管・組織修復能が高く，後肢リンパ浮腫を早期に改善することを示したが，その機序についてはさらなる解明が必要である。in vitro においてリンパ管内皮細胞に対する培養上清の影響を検討する必要がある。具体的には，リンパ管内皮細胞を培養し，活性化大網の培養上清を添加して培養し，リンパ管内皮細胞の増殖能，遊走能，管腔形成能などの評価を行い比較することで，より詳細な基礎的データを得ることができると予想される。

3.4 今後の課題

本研究ではすでに臨床で行われているリンパ浮腫に対する遊離大網移植術を基礎的に検証するためにマウスモデルを開発した。実際に大網移植がリンパ流を回復する可能性を示すことはできたが，具体的な機序の解明には至らず，これを解明することが課題である。

また，活性化大網は各種のリンパ管新生因子，組織修復因子を放出する優れた組織であるが，臨床応用に向けては課題が多い。大網の培養上清を用いる場合，ドナーへの侵襲が大きいというリスクがあるが，活性化することで少量の組織から多量のサイトカインを含む培養上清を作製することができる。この優位性が示せれば，新たな再生医療の材料として，画期期な治療法となる可能性も秘めていると考える。

今後の研究では，急性期モデルで行われており，長期にわたるリンパ浮腫で観察される慢性的な線維性の変化や免疫の変化を完全には捉えていない。そのため，より適切な知見として組織移植と慢性リンパ浮腫を組み合わせたモデルに焦点を当て，臨床状態をより反映した検証を行うことが理想である。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 19H03811，22K16994 の助成を受けたものである。

本研究の全般において御指導，御助言をいただいた北海道大学 大学院医学研究院 機能再生医学分野 形成外科学教室・山本有平教授，舟山恵美准教授，前田　拓先生，石川耕資先生，三浦隆洋先生ならびに伊藤梨里客員研究員，同教室員の皆様に心より深謝申し上げます。

また，後肢リンパ浮腫モデルの作製および解析において多大なるご協力をいただいた徐　東經先生に，重ねて深く感謝申し上げます。

動物実験において施設の管理やマウスの飼育を行っていただいた北海道大学大学院医学研究院 附属動物実験施設・土佐紀子先生ならびに技術職員の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に，これまで北海道大学 大学院医学研究院 機能再生医学分野 形成外科学教室において研究に携わってこられた全ての皆様に心より感謝の意を表します。

(順不同)

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Adamczyk LA, Gordon K, Kholova I, Meijer-Jorna LB, Telinius N, et al. Lymph vessels: the forgotten second circulation in health and disease. Virchows Arch. 2016;469(1):3-17.

Bu P, Vin AP, Sethupathi P, Ambrecht LA, Zhai Y, et al. Effects of activated omental cells on rat limbal corneal alkali injury. Exp Eye Res. 2014;121:143-6.

Buyukdogan K, Doral MN, Bilge O, Turhan E, Huri G, et al. Peritoneum and omentum are natural reservoirs for chondrocytes of osteochondral autografts: A comparative animal study. Acta Orthop Traumatol Turc. 2016;50(5):539-43.

Chu YY, Allen RJ, Jr., Wu TJ, Cheng MH. Greater Omental Lymph Node Flap for Upper Limb Lymphedema with Lymph Nodes-depleted Patient. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2017;5(4):e1288.

Cranshaw ML, Leak LV. Milky spots of the omentum: a source of peritoneal cells in the normal and stimulated animal. Arch Histol Cytol. 1990;53 Suppl:165-77.

Dagenais SL, Hartsough RL, Erickson RP, Witte MH, Butler MG, et al. Foxc2 is expressed in developing lymphatic vessels and other tissues associated with lymphedema-distichiasis syndrome. Gene Expr Patterns. 2004;4(6):611-9.

De Siena R, Balducci L, Blasi A, Montanaro MG, Saldarelli M, et al. Omentum-derived stromal cells improve myocardial regeneration in pig post-infarcted heart through a potent paracrine mechanism. Exp Cell Res. 2010;316(11):1804-15.

Frueh FS, Gousopoulos E, Rezaeian F, Menger MD, Lindenblatt N, et al. Animal models in surgical lymphedema research--a systematic review. J Surg Res. 2016;200(1):208-20. Garcia-Gomez I, Pancholi N, Patel J, Gudehithlu KP, Sethupathi P, et al. Activated omentum slows progression of CKD. J Am Soc Nephrol. 2014;25(6):1270-81.

Goldsmith HS, De los Santos R. Omental transposition for the treatment of chronic lymphedema. Rev Surg. 1966;23(4):303-4.

Goldsmith HS, De los Santos R, Beattie EJ, Jr. Relief of chronic lymphedema by omental transposition. Ann Surg. 1967;166(4):573-85.

Hoshino Y, Osawa M, Funayama E, Ishikawa K, Miura T, et al.

Therapeutic Potential of the Prolyl Hydroxylase Inhibitor Roxadustat in a Mouse Hindlimb Lymphedema Model. Lymphat Res Biol. 2023;21(4):372-80.

Ishikawa K, Funayama E, Maeda T, Hayashi T, Murao N, et al. Changes in high endothelial venules in lymph nodes after vascularized and nonvascularized lymph node transfer in a murine autograft model. J Surg Oncol. 2019;119(6):700-7.

Ishikawa K, Maeda T, Funayama E, Hayashi T, Murao N, et al. Feasibility of pedicled vascularized inguinal lymph node transfer in a mouse model: A preliminary study. Microsurgery. 2019;39(3):247-54.

Iwasaki D, Yamamoto Y, Murao N, Oyama A, Funayama E, et al. Establishment of an Acquired Lymphedema Model in the Mouse Hindlimb: Technical Refinement and Molecular Characteristics. Plast Reconstr Surg. 2017;139(1):67e-78e.

Jackson DG. Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. APMIS. 2004;112(7-8):526-38.

Johnson LA, Prevo R, Clasper S, Jackson DG. Inflammation-induced uptake and degradation of the lymphatic endothelial hyaluronan receptor LYVE-1. J Biol Chem. 2007;282(46):33671-80.

Kawahira T, Sugimoto T, Okada M, Maeda S. An experimental study of surgical treatment for lymphedema in rats: A modified Kinmonth procedure and autologous lymph node capsule-venous anastomosis with lymph node transfer. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 1999;5(2):86-93.

Kin T, Korbutt GS, Rajotte RV. Survival and metabolic function of syngeneic rat islet grafts transplanted in the omental pouch. Am J Transplant. 2003;3(3):281-5.

Kusajima EG, Yamamoto Y, Ishikawa K, Miura T, Funayama E, et al. Sentinel node restoration by vascularized lymph node transfer in mice. Microsurgery. 2024;44(1):e30981.

Lee H, Cusick RA, Utsunomiya H, Ma PX, Langer R, et al. Effect of implantation site on hepatocytes heterotopically transplanted on biodegradable polymer scaffolds. Tissue Eng. 2003;9(6):1227-32.

Li Y, Hashikawa K, Ebisawa K, Kambe M, Higuchi S, et al. ＜Editors' Choice＞ Supernatant from activated omentum accelerates wound healing in diabetic mice wound model. Nagoya J Med Sci. 2023;85(3):528-41.

Litbarg NO, Gudehithlu KP, Sethupathi P, Arruda JA, Dunea G, et al.

Activated omentum becomes rich in factors that promote healing and tissue regeneration. Cell Tissue Res. 2007;328(3):487-97.

Maeda T, Hayashi T, Furukawa H, Iwasaki D, Ishikawa K, et al. Immune-mediated antitumor effect of a transplanted lymph node. Int J Cancer. 2018;143(5):1224-35.

Maeda T, Yamamoto Y, Iwasaki D, Hayashi T, Funayama E, et al. Lymphatic Reconnection and Restoration of Lymphatic Flow by Nonvascularized Lymph Node Transplantation: Real-Time Fluorescence Imaging Using Indocyanine Green and Fluorescein Isothiocyanate-Dextran. Lymphat Res Biol. 2018;16(2):165-73.

Marques RG, Petroianu A, Coelho JM, Portela MC. Regeneration of splenic autotransplants. Ann Hematol. 2002;81(11):622-6.

Mazzaferro D, Song P, Massand S, Mirmanesh M, Jaiswal R, et al. The Omental Free Flap-A Review of Usage and Physiology. J Reconstr Microsurg. 2018;34(3):151-69.

Meza-Perez S, Randall TD. Immunological Functions of the Omentum. Trends Immunol. 2017;38(7):526-36.

Mohammadi R, Azizi S, Delirezh N, Hobbenaghi R, Amini K. Comparison of beneficial effects of undifferentiated cultured bone marrow stromal cells and omental adipose-derived nucleated cell fractions on sciatic nerve regeneration. Muscle Nerve. 2011;43(2):157-63.

Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. Nature. 2010;463(7280):540-4.

Mucka P, Levonyak N, Geretti E, Zwaans BMM, Li X, et al. Inflammation and Lymphedema Are Exacerbated and Prolonged by Neuropilin 2 Deficiency. Am J Pathol. 2016;186(11):2803-12.

Nguyen AT, Suami H, Hanasono MM, Womack VA, Wong FC, et al. Long-term outcomes of the minimally invasive free vascularized omental lymphatic flap for the treatment of lymphedema. J Surg Oncol. 2017;115(1):84-9.

Oashi K, Furukawa H, Nishihara H, Ozaki M, Oyama A, et al. Pathophysiological characteristics of melanoma in-transit metastasis in a lymphedema mouse model. J Invest Dermatol. 2013;133(2):537-44.

Pinheiro DF, da Silva RF, Barbosa TM, Gama JFG, Gomes AC, et al. Omentum acts as a regulatory organ controlling skeletal muscle repair of mdx mice diaphragm. Cell Tissue Res. 2019;377(2):269-79.

Pinheiro DF, da Silva RF, Carvalho LP, Paiva-Oliveira EL, Pereira RS, et al. Persistent activation of omentum influences the pattern of muscular lesion in the mdx diaphragm. Cell Tissue Res. 2012;350(1):77-88.

Schaverien MV, Coroneos CJ. Surgical Treatment of Lymphedema. Plast Reconstr Surg. 2019;144(3):738-58.

Schurink B, Cleypool CGJ, Bleys R. A rapid and simple method for visualizing milky spots in large fixed tissue samples of the human greater omentum. Biotech Histochem. 2019;94(6):429-34.

Shah S, Lowery E, Braun RK, Martin A, Huang N, et al. Cellular basis of tissue regeneration by omentum. PLoS One. 2012;7(6):e38368.

Shimotsuma M, Simpson-Morgan MW, Takahashi T, Hagiwara A. Activation of omental milky spots and milky spot macrophages by intraperitoneal administration of a streptococcal preparation, OK-432. Cancer Res. 1992;52(19):5400-2.

Shioya R, Furukawa H, Murao N, Hayashi T, Oyama A, et al. Prevention of Lymphedematous Change in the Mouse Hindlimb by Nonvascularized Lymph Node Transplantation. Ann Plast Surg. 2016;76(4):442-5.

Singh AK, Gudehithlu KP, Litbarg NO, Sethupathi P, Arruda JA, et al. Transplanting fragments of diabetic pancreas into activated omentum gives rise to new insulin producing cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007;355(1):258-62.

Singh AK, Pancholi N, Patel J, Litbarg NO, Gudehithlu KP, et al. Omentum facilitates liver regeneration. World J Gastroenterol. 2009;15(9):1057-64.

Singh AK, Patel J, Litbarg NO, Gudehithlu KP, Sethupathi P, et al. Stromal cells cultured from omentum express pluripotent markers, produce high amounts of VEGF, and engraft to injured sites. Cell Tissue Res. 2008;332(1):81-8.

Suami H, Chang DW, Matsumoto K, Kimata Y. Demonstrating the lymphatic system in rats with microinjection. Anat Rec (Hoboken). 2011;294(9):1566-73.

Yoshida S, Hamuy R, Hamada Y, Yoshimoto H, Hirano A, et al. Adipose-derived stem cell transplantation for therapeutic lymphangiogenesis in a mouse secondary lymphedema model. Regen Med. 2015;10(5):549-62.

Yu Li KH, Katsumi Ebisawa, Miki Kambe, Shinichi Higuchi and Yuzuru Kamei. Supernatent from activated omentum accelerates wound healing in

diabetic mice wound model. Nagoya J Med Sci. 2023;85:14.

Zhang YG, Huang JH, Hu XY, Sheng QS, Zhao W, et al. Omentum-wrapped scaffold with longitudinally oriented micro-channels promotes axonal regeneration and motor functional recovery in rats. PLoS One. 2011;6(12):e29184.

（引用文献数　47）