



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マウス血管柄付きリンパ節移植モデルにおける移植リンパ節の形態および機能に関する研究
Author(s)	石川, 耕資
Description	配架番号 : 2437
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13423号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13423
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74234
Type	doctoral thesis
File Information	Kosuke_Ishikawa.pdf



学 位 論 文

マウス血管柄付きリンパ節移植モデルにおける
移植リンパ節の形態および機能に関する研究

(Studies on morphology and function of transferred lymph
nodes in a mouse model of vascularized lymph node transfer)

2 0 1 9 年 3 月

北 海 道 大 学

石 川 耕 資

Kosuke ISHIKAWA

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	6 頁
緒言	7 頁
第一章 マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの確立	
緒言	9 頁
方法	10 頁
結果	18 頁
考察	33 頁
第二章 リンパ節移植モデルにおける血流の有無による移植リンパ節の組織学的検討	
緒言	35 頁
方法	36 頁
結果	44 頁
考察	59 頁
総括および結論	64 頁
謝辞	66 頁
利益相反	67 頁
引用文献	68 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. Kosuke Ishikawa, Taku Maeda, Emi Funayama, Toshihiko Hayashi, Naoki Murao, Masayuki Osawa, Hiroshi Furukawa, Akihiko Oyama, and Yuhei Yamamoto
Feasibility of pedicled vascularized inguinal lymph node transfer in a mouse model: a preliminary study
Microsurgery, doi: 10.1002/micr.30394, 2018 Dec 3 [Epub ahead of print]
2. Kosuke Ishikawa, Emi Funayama, Taku Maeda, Toshihiko Hayashi, Naoki Murao, Masayuki Osawa, Riri Ito, Hiroshi Furukawa, Akihiko Oyama, and Yuhei Yamamoto
Changes in high endothelial venules in lymph nodes after vascularized and nonvascularized lymph node transfer in a murine autograft model
Journal of Surgical Oncology, doi: 10.1002/jso.25365, 2019 Jan 12 [Epub ahead of print]

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 石川耕資，舟山恵美，林 利彦，村尾尚規，大澤昌之，前田 拓，山本有平
マウス血管柄付きリンパ節移植モデルにおけるリンパ管再疎通および移植リンパ
節の組織学的検討
第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会，2018 年 10 月 19 日・東京
2. 石川耕資，前田 拓，舟山恵美，林 利彦，村尾尚規，大澤昌之，古川洋志，
小山明彦，山本有平
マウスリンパ節移植モデルにおける高内皮細静脈の組織学的検討～移植リンパ節
への血流の有無による比較
第 43 回日本リンパ学会総会，2019 年 3 月 22 日・東京

要旨

【背景と目的】

近年のマイクロサージャリー技術の進歩により、四肢のリンパ浮腫に対する局所の外科的リンパ系再構築法として、血管柄付きリンパ節移植の臨床報告が相次いでいる。移植リンパ節への血流がリンパ節の生着と機能の維持に重要とされるが、移植リンパ節への血流の有無により、その形態・機能を比較した報告は少ない。

移植リンパ節の循環系としての機能は、リンパ管新生とリンパ節内の高内皮細静脈 (high endothelial venule, HEV) を介したリンパ静脈交通によるとされる。また、抗原や抗原提示細胞は末梢組織から輸入リンパ管を通してリンパ節に入るが、ナイーブリンパ球は静脈から HEV の細胞間隙を通してリンパ節に入るため、HEV はリンパ節の免疫系としての機能に重要な管腔構造である。移植リンパ節へのリンパ流がリンパ節における HEV の維持に重要であることは数多く報告されているが、移植リンパ節への血流が HEV にどのように影響するかという報告は渉猟し得た限りなかった。

我々は血管柄のない遊離リンパ節移植を行ったマウスに同種移植可能なメラノーマ細胞を移植したモデルを用いて、移植リンパ節における免疫細胞や HEV を解析することで、移植リンパ節は限られた範囲で免疫能を有する可能性を示した。そのモデルにおいて移植リンパ節の機能は、Sham 手術群の同リンパ節より劣る結果となり、その差は移植リンパ節への血流の差ではないかと考えられた。

そこで、マウスを用いた血管柄付きリンパ節移植モデルを確立し、その血管柄付きリンパ節移植と血流のないリンパ節移植モデルにおいて移植リンパ節を比較することで、血流の有無が移植リンパ節の形態・機能に与える影響を組織学的に検討することを目的とした。

【材料と方法】

第一章において、8 週齢雄の C57BL/6N マウス 25 匹を用いて、左単径リンパ節に流入する浅腹壁動脈を茎とするリンパ節脂肪弁を挙上し、同側の膝窩リンパ節摘出部に移行する血管柄付きリンパ節移植モデルを作製した。術後 3, 4 週目に後肢足蹠にインドシアニンググリーン (ICG) を皮下注射し、後肢のリンパ流を評価した。術後 4 週目に左後肢足蹠に 2% パテントブルー溶液を皮下注射し、移植リンパ節が染色された場合、移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通ありと判定した。移植リンパ節および対側の単径・膝窩リンパ節を摘出し、Hematoxylin and eosin (HE) 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各切片におけるリンパ節の大きさを計測した。

第二章において、上記のマウス 50 匹を用いて、以下の 3 群を作製し、下記の方法で各群を比較した。Group 1 は第一章で作製した有茎血管柄付きリンパ節移植群 ($n=20$)、Group 2 は有茎血管柄結紮リンパ節移植群 ($n=15$)、Group 3 は遊離リンパ節移植群 ($n=15$) とした。術後 4 週目に第一章と同様の方法でパテントブルーによる移植リンパ節の染色の観察後、移植リンパ節および対側の単径リンパ節を摘出し、HE 染色および MECA-79 (HEV)、B220 (B 細胞)、CD3 (T 細胞)、CD11c (樹状細胞) に対する免疫組織化学染色で組織学的に評価した。外周 $100\ \mu\text{m}^2$ 以上の総 HEV、そのうち内腔 $80\ \mu\text{m}^2$ 以上の拡張 HEV を定義し、画像閲覧ソフトウェアを用いて各切片における数をカウントして、総 HEV 数に占める拡張 HEV 数の割合を計算した。画像解析ソフトウェアを用いて B 細胞、T 細胞、樹状細胞のリンパ節に占める面積の割合を計測した。多群間の比較には、Shapiro-Wilk の正規性検定後に Steel-Dwass 検定を用いた。 $P<0.05$ を統計学的有意水準とした。

【結果】

全てのマウスが術後合併症なく、術後 4 週で安楽死させるまで生存した。全例において単径リンパ節は単径脂肪組織内に 1 つ存在し、血管茎は有茎で膝窩へ移植するのに十分であり、HE 染色で移植リンパ節を認めた。

第一章において、ICG 蛍光リンパ管造影で左膝窩に明瞭な点状蛍光像を認めた 16 例では、パテントブルー色素による移植リンパ節の染色を認めた。残りの 9 例ではパテントブルー色素による移植リンパ節の染色を認めなかった。移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通率は 64.0% であり、術後 3 週以降の ICG 蛍光リンパ管造影で再疎通を予測可能であった。輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節は、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節よりも有意に縮小したが、皮質における濾胞構造は明瞭であった。一方、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節は、リンパ節内の細胞密度が高く、濾胞構造は明らかではなかった。

第二章において、移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通率は、Group 1 が 65.0%、Group 2 が 66.7%、Group 3 が 46.7% であった。各群の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と対側の単径リンパ節の間の多群間の比較では、リンパ節における総 HEV 数/ mm^2 および拡張 HEV 数/ mm^2 は、Group 1 が対側の単径リンパ節よりも有意に多く、リンパ節における拡張 HEV 数/総 HEV 数は、Group 1 が Group 2 および Group 3 よりも有意に多かった。リンパ節における B 細胞、T 細胞、樹状細胞の割合は、各群の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と対側の単径リンパ節の間の多群間の比較では、いずれの群間にも有意差はなかった。

【考察】

第一章において、マウス血管柄付きリンパ節移植モデルを作製するための詳細な解剖、その術式について検討した。単径リンパ節が3〜4個あるラットと比べ、マウスの単径リンパ節は1つであり、膝窩リンパ節摘出部に移植すると1:1での単純な比較が可能である。本モデルは、有茎のため血管吻合が不要であり、手技に依存しにくい簡便なモデルである。マウスは抗体等の試薬が充実しているため、移植リンパ節の免疫系としての機能解析に有用なモデルである。移植した単径リンパ節が輸入リンパ管再疎通により、膝窩リンパ節に近い大きさ、リンパ球の構成にリモデリングが起きた可能性が考えられた。皮質における明瞭な濾胞構造は、輸入リンパ管からリンパ節内へ到達した抗原や抗原提示細胞に対するB細胞応答が起きている可能性を示唆する所見と考えられた。マウス血管柄付きリンパ節移植モデルにおける機能的リンパ系再構築には、移植リンパ節がレシピエントのリンパ管と再疎通することも重要な要素であると考えられた。

第二章において、血流のあるリンパ節移植の方が、血流のないリンパ節移植に比べ、より多くの機能的な拡張HEVを保持することを示した。血管柄付きリンパ節移植は、機能的HEVを保持することにより、移植リンパ節の免疫能の観点からも有用である可能性が示唆された。しかし、リンパ節におけるB細胞、T細胞、樹状細胞は、多群間の比較で有意差は認めなかった。移植リンパ節の免疫細胞を評価するためには、抗原の注射や腫瘍細胞の移植などによる免疫感作が必要であると考えられた。

【結論】

第一章において、マウスを用いた血管柄付きリンパ節移植モデルを確立した。

第二章において、血流のあるリンパ節移植の方が、血流のないリンパ節移植に比べ、移植リンパ節内の機能的な拡張HEVの割合が高いことを示した。

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。

ABC	avidin-biotinylated peroxidase complex
ARRIVE	Animals in Research: Reporting <i>In Vivo</i> Experiments
CD	cluster of differentiation
DAB	diaminobenzidine
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FLN	free non-vascularized lymph node
HE	hematoxylin and eosin
HEV	high endothelial venule
HRP	horseradish peroxidase
ICG	indocyanine green
ILN	inguinal lymph node
IQR	interquartile range
JPEG	Joint Photographic Experts Group
LYVE-1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1
NDP	NanoZoomer Digital Pathology
PDE	photo dynamic eye
PECAM-1	platelet/endothelial cell adhesion molecule-1
PLN	popliteal lymph node
PNAd	peripheral node addressin
ROI	region of interest
TBS	Tris-buffered saline
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLN	vascularized lymph node

緒言

【背景】

リンパ系は、間質液を血管系へ戻す一方通行の輸送網である。リンパ管は、末梢組織から可溶性分子や活性化抗原提示細胞をリンパ節などの二次リンパ組織に輸送する働きがある。リンパ節などの二次リンパ組織での免疫応答により、活性化した免疫細胞や産生された液性因子が血管系に戻り機能する (Alitalo, 2011; Willard-Mack, 2006)。

悪性腫瘍の治療として行われるリンパ節郭清は、局所リンパ機能の破綻を招き、循環系としての機能破綻により、リンパ浮腫が生じる (Rockson, 2001)。免疫系としての機能破綻により、蜂窩織炎などの易感染性や腫瘍の易転移性 (Oashi et al., 2013)、さらには脈管肉腫の発生 (Stewart and Treves, 1948) などが惹起される可能性がある。

四肢のリンパ浮腫に対する国際的な標準治療は、複合的理学療法 (Földi, 1994) に代表される保存的治療である (Badger et al., 2000; Lasinski et al., 2012) が、リンパ管静脈吻合などの手術用顕微鏡下手術は、有望な治療法であるとされる (International Society of Lymphology Executive Committee, 2016)。保存的治療に抵抗性のリンパ浮腫に対しては、保存的治療に加えて外科的治療が考慮され、外科的治療は浮腫組織減量術とリンパ誘導術に大別される (Ozturk et al., 2016)。浮腫組織減量術には、浮腫組織切除および分層植皮術 (Charles, 1912) や脂肪吸引術 (O'Brien et al., 1989) などが挙げられる。近年はマイクロサージャリー技術の進歩により、より低侵襲なリンパ管静脈吻合 (O'Brien et al., 1977) やリンパ管静脈移植 (Yamamoto et al., 2003; Yamamoto and Sugihara, 1998)、リンパ節移植に代表されるリンパ誘導術が注目されている (Basta et al., 2014)。

リンパ管静脈吻合は、手術用顕微鏡下に口径 0.5 mm 程度のリンパ管を細静脈に吻合する手技であり、リンパを直接静脈系に還流させることができる。本治療がリンパ浮腫に対して有効であることは多く報告されているが (Chang et al., 2013)、組織の線維化をきたした慢性リンパ浮腫に対しては、その効果は不十分なことがある (Akita et al., 2015)。そこで、局所の外科的リンパ系再構築法としてリンパ節移植が再注目された。

血管柄付きリンパ節移植 (vascularized lymph node transfer) は、1979 年に報告されたラットの単径リンパ節を膝窩リンパ節摘出部に移植するという動物モデル (Shesol et al., 1979) に始まり、1982 年に初めてリンパ浮腫患者への臨床応用の症例報告がなされた (Clodius et al., 1982) が、一般的に広く行われる術式とはならなかった。2006 年、24 例の乳がん術後の上肢リンパ浮腫患者に対し、単径から腋窩への血管柄付きリンパ節移植を行い、長期経過において 92% の症例で浮腫の改善が認められたと報告 (Becker et al., 2006) されて以降、臨床報告が相次いでいる (Cornelissen et al., 2017; Pappalardo et al., 2018; Scaglioni et al., 2018)。進行期のリンパ浮腫には、血管柄付きリンパ節移植の方がリンパ管静脈吻合よりも効果的とされる (Akita et al., 2015; Granzow et al., 2014)。

血管柄付きリンパ節移植の生理的機能は、リンパ管新生とリンパ節内のリンパ静脈交通によるとされる (Miranda Garcés et al., 2016; Miranda Garcés et al., 2017)。リンパ管新生は、既存の毛細リンパ管やリンパ管内皮前駆細胞から新たなリンパ管が形成され、移植リンパ節とレシピエントとのリンパ管再疎通を可能にする。リンパ節内の高内皮細静脈 (high endothelial venule, HEV) を介したリンパ静脈交通は、リンパを静脈系に輸送するポンプとして機能する可能性がある (Cheng et al., 2012; Ito et al., 2016)。

移植リンパ節への血流がリンパ節の生着と機能の維持に重要とされる (Shesol et al., 1979) が、移植リンパ節への血流の有無により、その形態・機能を比較した報告は少ない (Cornelissen et al., 2017; Shesol et al., 1979; Tobbia et al., 2009)。また、移植リンパ節へのリンパ流もリンパ節の微小構造や機能に重要とされる (Mebius et al., 1991a; Randolph et al., 2005; Tammela et al., 2007)。

血管柄付きリンパ節移植の臨床応用に際しては、ドナーは単径 (Becker et al., 2006; Gharb et al., 2011; Lin et al., 2009)、腋窩 (Dayan et al., 2015)、顎下 (Cheng et al., 2012; Patel et al., 2014)、鎖骨上 (Althubaiti et al., 2013; Steinbacher et al., 2017)、外側胸部 (Batista et al., 2017; Becker et al., 2012) などの皮下リンパ節や空腸腸間膜 (Coriddi et al., 2017)、大網 (Agko et al., 2018; Ciudad et al., 2017) などの腹腔内リンパ節が報告されており、いまだ国際的に標準化された術式はないのが現状である。

また、これまでリンパ浮腫の改善という移植リンパ節の循環系としての機能に着目した基礎研究が多く行われてきた (Nguyen et al., 2016; Shioya et al., 2016; Yang et al., 2014) が、移植リンパ節の免疫系としての機能を検討した報告は少ない (Rabson et al., 1982)。リンパ浮腫の患者は患肢の蜂窩織炎を合併することが多く、移植リンパ節の免疫系としての機能も期待される。

我々は同所での血管柄のない遊離リンパ節移植を行った C57BL/6 マウスに同種移植可能な B16F10 メラノーマ細胞を移植したモデルを用いて、移植リンパ節における免疫細胞の分布や機能、二次リンパ組織に特異的な管腔構造である HEV の形態やタンパク量を解析することで、移植リンパ節は限られた範囲で抗腫瘍効果としての免疫能を有する可能性を示した (Maeda et al., 2018a)。そのモデルにおいて移植リンパ節の機能は、Sham 手術群の同リンパ節より劣る結果となり、その差は移植リンパ節への血流の差ではないかと考えられた。

【目的】

1. マウスを用いた血管柄付きリンパ節移植モデルを確立する。
2. 血管柄付きリンパ節移植と血流のないリンパ節移植モデルにおいて移植リンパ節を比較することで、血流の有無が移植リンパ節の形態・機能に与える影響を組織学的に検討する。

第一章

マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの確立

1.1 緒言

1.1.1 背景

リンパ節移植の動物モデルとしてはイヌ (Chen et al., 1990; O'Brien et al., 1990), ブタ (Honkonen et al., 2013; Lähdevuo et al., 2011), ヒツジ (Tobbia et al., 2009) などの大動物から, ラット (Hadamitzky et al., 2009; Schindewolf et al., 2014), マウス (Tervala et al., 2015) などの小動物まで様々な動物が使用されてきたが, 手技の簡便さやドナーの犠牲の少なさから, 血管柄のない遊離リンパ節移植 (Aschen et al., 2014; Schindewolf et al., 2014; Tervala et al., 2015) や分割リンパ節移植 (Blum et al., 2007; Tammela et al., 2007; Tilak and Howard, 1965) の報告が多い (Cornelissen et al., 2017)。

血管柄付きリンパ節移植の小動物モデルとしては, ラットの単径 (Shesol et al., 1979), 頸部 (Uygur et al., 2013), 腋窩 (Kwiecien et al., 2015) をドナーとする報告がある。マウスの単径リンパ節を含んだ有茎皮弁として膝窩リンパ節摘出部に移植する報告はあるが, リンパ浮腫モデルを作製するために術前にX線照射がなされているなど実験系が複雑な上, 移植リンパ節の組織学的評価の詳細は述べられていない (Hayashida et al., 2017)。マウスはラットよりも安価で扱いやすく, 抗体等の試薬も充実しているため, 術後の移植リンパ節の免疫系としての機能を解析しやすいという利点がある。C57BL/6 マウスに同種移植可能な B16F10 メラノーマ細胞株があり, 腫瘍移植モデル (Maeda et al., 2018a; Oashi et al., 2013) も作製可能である。

マウスの単径リンパ節への血管は, 大腿動脈から単径脂肪組織内を上行する浅腹壁動脈と, 腹部皮下を外側へ走行する腸腰動脈がある (Kochi et al., 2013)。マウスのリンパ流には, 腹部・外陰部から単径リンパ節に流入し, 腋窩リンパ節を経由して総頸静脈に至る経路と, 後肢から膝窩リンパ節に流入し, 坐骨リンパ節, 腸骨リンパ節, 腰リンパ節を経由して総頸静脈に至る経路がある (Kawashima et al., 1964)。この異なる2つのリンパ流と血管解剖を利用して, ラットのモデル (Shesol et al., 1979) と同様に, 浅腹壁動脈を茎とする単径リンパ節脂肪弁を挙上し, 膝窩リンパ節摘出部に移植するモデルを作製することが可能と考えられた。

1.1.2 目的

マウスを用いた血管柄付きリンパ節移植モデルを確立する。

1.2 方法

1.2.1 動物実験計画

本研究は、「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、動物実験計画「外科的リンパ系再構築法によるネットワーク回復を循環系・免疫系の観点から検証する」(承認番号 17-0042)の一研究として行った。また、動物を用いた研究の報告のための *Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE)* ガイドライン (Kilkenny et al., 2010) における 20 項目のチェックリストを参考にした。

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 週齢(19-24g) で購入した。馴化のため入舎後 2 週間の予備飼育期間を設け、8 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; code SN-487) を用いて、イソフルラン (Forane[®] Inhalant Liquid; AbbVie Inc., Tokyo, Japan; code B506) 2.5% 吸入による全身麻酔下に行った。手術の 1~2 日前、サージカルクリッパー (3M Surgical Clipper; 3M Health Care, Borken, Germany; code 9667L and 9660) 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、マウス下半身の体毛を除毛した。

手術は、可搬型手術用顕微鏡 (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 ナイロン糸 (Crownjun Nylon Suture, Polyamide Monofilament Non-absorbable; Kono Seisakusho Co., Ltd., Tokyo, Japan; code NA085) および 10-0 ナイロン糸 (Keisei Medical Industrial Co., Ltd., Tokyo, Japan; code 14V33-10N) 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; code SS-10M2713)を用いて行った。鼠径・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。移植リンパ節への色素流入の観察は、手術用顕微鏡に接続したデジタルビデオカメラ(Handycam HDR-CX550V; Sony Co., Tokyo, Japan)を用いて動画および静止画として記録した。

蛍光血管・リンパ管造影のため、本実験では近赤外蛍光物質である indocyanine green (ICG; Diagnogreen® for Injection 25 mg; Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan; 2.5 mg/mL in distilled water) および赤外観察カメラシステム(Photodynamic Eye, PDE; Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Shizuoka, Japan; code C9830)を用いた。PDE は赤外発光ダイオードから発する 760 nm の近赤外光によって、血管・リンパ管内で主にリポタンパクと結合した ICG を励起し、発せられた 820 nm 以上の近赤外蛍光をハンディタイプのカメラユニットにより検出することで、モニタ上で ICG をリアルタイムに可視化する医療用機器である(Ishikawa et al., 2013; Marshall et al., 2010)。PDE はアシストアームシステム(ASSISTO® Holders and Clamp Sockets; GEOMED® Medizin-Technik GmbH & Co., Tuttlingen, Germany; code CI 120-40 and CI 310-50, respectively)によって、マウスの 15~25 cm 上方に固定して用いた。

写真は、デジタル一眼レフカメラ(EOS Kiss X2; 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., code C13239-01)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, Retina, 13-inch, Early 2015, version 10.12.6; Apple Inc., Cupertino, CA, USA)を用いて、ユーティリティアプリケーション(Display Menu, version 2.2.3, Thorsten Karrer)によりディスプレイ解像度を 1280×800 ドットから 2560×1600 ドットの間で調整し、画像閲覧ソフトウェア NanoZoomer Digital Pathology (NDP).view2 (Hamamatsu Photonics K.K., code U12388-01)上で観察した。

1.2.4 パイロット実験

1.2.4.1 モデル作製手技

過去のラットの血管柄付きリンパ節移植モデル(Shesol et al., 1979)を参考に、左単径リンパ節に流入する浅腹壁動脈を茎とするリンパ節脂肪弁を挙上し、同側の膝窩リンパ節摘出部に移行するモデルを作製することとした。

再現性のあるモデル作製のため5匹のマウスを用いて、以下の10項目につき、パイロット実験を行った。①除毛の範囲、タイミング、②体位、③膝窩・単径の皮膚切開の方向・長さ、皮下剥離の範囲、④膝窩・単径リンパ節の同定法、⑤膝窩リンパ節の扱い、⑥単径リンパ節脂肪弁の挙上法、⑦蛍光血管造影による単径リンパ節脂肪弁への血流の確認法、⑧単径リンパ節脂肪弁を膝窩に移行する方法、⑨単径リンパ節脂肪弁を膝窩に移植・固定する方法、⑩閉創の方法、について検討した。

1.2.4.2 蛍光リンパ管造影による後肢リンパ流の検討

過去の報告(Maeda et al., 2018b)に準じて、術後1, 2, 3, 4週目にマウス後肢の両側足蹠にICG (Cardiogreen polymethine dye; Sigma, St. Louis, MO, USA; code I2633; 1.0 mg/mL in distilled water)を5 μ L皮下注射し、マウスの覚醒後ケージ内で20分放置した後、PDEを用いて後肢全体の蛍光画像を取得した。マウスは術後3週目の検査前に前述の方法で再度、下半身の体毛を除毛した。

1.2.4.3 パテントブルーによる移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通の検討

術後4週目にマウス左膝窩を皮膚切開し、リンパ節移植部を露出した後、後肢の左足蹠に2%パテントブルー溶液を5 μ L皮下注射し、手術用顕微鏡を用いて移植リンパ節への色素流入を観察した。

1.2.4.4 蛍光標識デキストランによる移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通の検討

術後4週目のパテントブルー注射後、過去の報告(Maeda et al., 2018b)に準じて、リンパに取り込まれる蛍光標識デキストラン(Dextran, Fluorescein, 2,000,000 MW, Anionic, Lysine Fixable; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA; code D7137; 10 mg/mL in distilled water)を用いて移植リンパ節の蛍光観察を行った。マウス後肢の両側足蹠に蛍光標識デキストランを5 μ L皮下注射し、15分後にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、左膝窩の移植リンパ節および対側膝窩リンパ節を摘出した($n=2$)。

両側膝窩リンパ節を凍結組織切片作製用包埋皿(Tissue-Tek® Cryomold 1; Sakura Finetek Co., Ltd., Tokyo, Japan; code 4565)内で凍結組織切片作製用包埋剤(Tissue-Tek® O.C.T. Compound; Sakura Finetek Co., Ltd.; code 4583)に包埋し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結し、-80°Cの超低温フリーザーに保存した。

凍結切片作成装置 (Microm™ HM550 Cryostat; Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Germany) を用いて、凍結組織標本を切片厚 30 μm に薄切した。

切片を共焦点レーザ走査型顕微鏡 FluoView 1000-D 倒立型顕微鏡 IX81 仕様 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) を用いて蛍光観察し、画像データ閲覧ソフトウェア FV10-ASW (version 03.01.02.02, Olympus Corporation) 上で画像データを取得した。

1.2.4.5 リンパ節の組織学的検討

術後 4 週目のパテントブルー注射後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、移植リンパ節および対側の単径・膝窩リンパ節を摘出し、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (Wako Pure Chemical Industries Ltd., code 163-20145) に浸漬して固定した ($n = 2$)。

1.2.4.5.1 パラフィン包埋・薄切

自動包埋装置 (Excelsior™ ES, Thermo Fisher Scientific) を用いて、以下の方法でパラフィン包埋組織標本作製した ($n = 2$)。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 (Retorator; Yamato Kohki Industrial Co., Ltd., Asaka, Saitama, Japan; code REM-710) 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) 染色および結合組織の特殊染色として Elastica-Masson (EM) 染色を行った。

1.2.4.5.2 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。ティッシュ・テック 2 倍カラッツィヘマトキシリン (Sakura Finetek Co., Ltd.; code 8653) に 7 分浸し、流水水洗 (色だし) 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; code 3200-2) 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; code FX00500) を用いて封入した。

1.2.4.5.3 EM 染色

HE 染色と同様に脱パラフィン後，流水水洗した。1%塩酸 70%エタノールで分別を 30 秒行い，前田変法レゾルシン・フクシン液(Muto Pure Chemicals Co., Ltd.; code 40322) に 90 分浸し，100%エタノールで分別後，水洗した。1%酢酸水で 1～2 秒洗い，0.75% オレンジ G 液(Muto Pure Chemicals Co., Ltd.; code 40232)に 1 分浸した。1%酢酸水で 1～2 秒洗い，マッソン染色液 B (Muto Pure Chemicals Co., Ltd.; code 40252)に 10 分浸した。1%酢酸水で 1～2 秒洗い，2.5%リントングステン酸液(Wako Pure Chemical Industries, code 162-02432)に 20 分浸した。1%酢酸水で 1～2 秒洗い，アニリンブルー液(Wako Pure Chemical Industries, code 015-18045)に 1 分浸した。1%酢酸水で 1～2 秒洗い，HE 染色と同様に脱水・透徹・封入した。

1.2.4.5.4 リンパ節の組織学的検討

組織スライドのデジタルデータを用いて，リンパ節および周囲の結合組織の組織学的観察を行った。

1.2.5 本実験

1.2.5.1 実験計画

パイロット実験において、モデル作製手技にある程度の習熟を要する上、移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通は手技的にコントロール困難であったことから、過去のラットのモデル(Shesol et al., 1979)を参考に、25匹のマウスを用いて血管柄付きリンパ節移植モデルを作製した。

1.2.5.2 モデル作製手技

パイロット実験を参考に、左単径リンパ節に流入する浅腹壁動脈を茎とするリンパ節脂肪弁を挙上し、同側の膝窩リンパ節摘出部に移行するモデルを以下の方法で作製した。マウスを仰臥位とし、2%パテントブルー溶液 5 μ L を後肢の左足蹠および左陰囊脇に皮下注射した。マウスを腹臥位とし、両側後肢を広げた状態で下床にテープ固定した。眼科用直剪刀を用いて左膝窩において透見可能な坐骨静脈上で後肢の短軸方向に 5 mm 長の皮膚切開を加えた。眼科用曲剪刀を用いて坐骨静脈下を剥離し、大腿二頭筋と内側ハムストリングスの間に染色された膝窩リンパ節を同定した。

マウスを仰臥位とし、両側後肢を広げた状態で床にテープ固定した。眼科用直剪刀を用いて左単径において大腿動脈上で長軸方向に 10 mm 長の皮膚切開を加えた。眼科用曲剪刀を用いて同切開から上外側に皮下直下で剥離し、単径脂肪組織内に染色された単径リンパ節を同定した。マイクロ剪刀を用いて単径リンパ節の頭側縁で腸腰動脈を含めて単径脂肪組織を切断し、大腿動脈から単径脂肪組織内を上行する浅腹壁動脈を茎とする単径リンパ節脂肪弁を茎部に 5 mm 幅の脂肪組織を含めて挙上した(図 1A)。

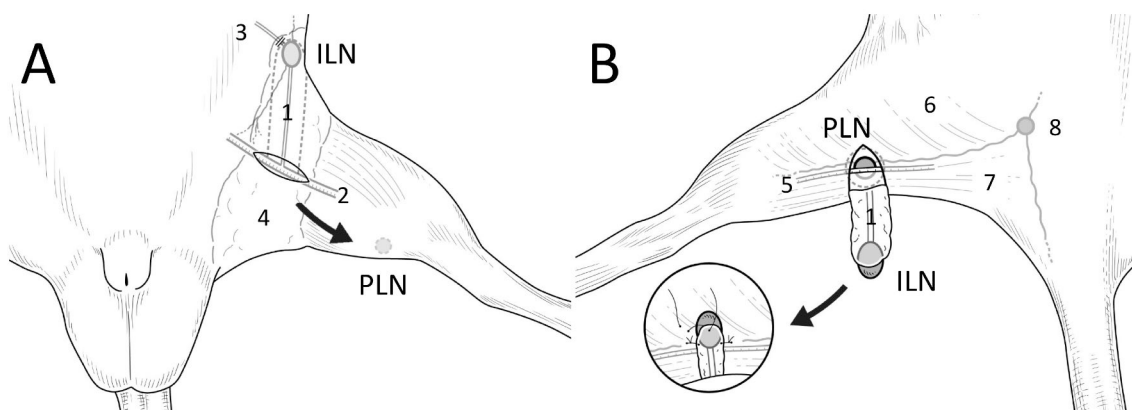


図 1. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルのシェーマ

A. 仰臥位, B. 腹臥位, PLN. popliteal lymph node, ILN. inguinal lymph node,

1. 浅腹壁動脈, 2. 大腿動脈, 3. 腸腰動脈, 4. 単径脂肪組織, 5. 坐骨静脈,
6. 大腿二頭筋, 7. 内側ハムストリングス, 8. 坐骨リンパ節

左頸部に 5 mm 長の皮膚切開を加え、大胸筋下の左上大静脈を同定した。ICG (2.5 mg/mL) を 5 μ L 静脈内注射し、PDE を用いて単径リンパ節脂肪弁の血流を確認した。左頸部皮膚切開を 5-0 ナイロン糸 2 針で単純結紮縫合した。

左単径および左膝窩皮膚切開間の大腿内側を皮下剥離した。同皮下トンネルを通して、モスキート鉗子を用いて単径リンパ節脂肪弁を膝窩から引きずりこむよう移行した(図 1B)。左単径皮膚切開を 5-0 ナイロン糸 3 針で単純結紮縫合した。

マウスを腹臥位とし、両側後肢を広げた状態で床にテープ固定した。マイクロ鑷子を用いて膝窩リンパ節を摘出し、坐骨静脈を損傷しないよう膝窩を剥離した。移行してあった単径リンパ節脂肪弁を把持し、先端の単径リンパ節を膝窩に嵌め込み、単径リンパ節周囲の脂肪弁を 10-0 ナイロン糸 3 針で大腿二頭筋に縫合した(図 1B, circle)。左膝窩皮膚切開を 5-0 ナイロン糸 2 針で単純結紮縫合し、終了した。

1.2.5.3 蛍光リンパ管造影による後肢リンパ流の検討

パイロット実験を参考に、術後 3, 4 週目にマウス後肢の両側足蹠に ICG (2.5 mg/mL) を 5 μ L 皮下注射し、マウスの覚醒後ケージ内で 20 分放置した後、PDE を用いて後肢のリンパ流を評価した。対側と比較して左膝窩の明瞭な点状蛍光像の有無を検討した。

1.2.5.4 移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通の検討

パイロット実験を参考に、術後 4 週目にマウス左膝窩を皮膚切開し、リンパ節移植部を露出した後、後肢の左足蹠に 2%パテントブルー溶液を 5 μ L 皮下注射し、移植リンパ節への色素流入を手術用顕微鏡に接続したデジタルビデオカメラを用いて観察した。移植リンパ節が染色された場合、移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通ありと判定した。移植リンパ節が染色されなかった場合、移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通なしと判定した。これらの結果を前述の蛍光リンパ管造影による後肢リンパ流の検討と比較した。

なお、蛍光標識デキストランを用いたリンパ節の蛍光観察は、HE 染色での組織学的検討ができなくなるため、前述の色素流入の観察で代用することとし、本実験では行わなかった。

1.2.5.5 移植リンパ節の組織学的検討

術後 4 週目のパテントブルーによる染色の観察後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、移植リンパ節($n=25$)および対側の単径・膝窩リンパ節(各 $n=8$)を摘出し、パイロット実験と同様の方法により、パラフィン包埋組織標本作製した。最大切片での HE 染色のみを行い、組織スライドのデジタルデータを用いて、移植リンパ節および対側の単径・膝窩リンパ節の面積を計測した。

1.2.5.6 統計学的検討

統計解析には、統計ソフトウェア JMP (version 14.1.0; SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いた。リンパ節の大きさは、平均±標準偏差で表した。多群間の比較には、Shapiro-Wilk の正規性検定後に Steel-Dwass 検定を用いた。両側 $P < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

1.3 結果

1.3.1 パイロット実験

1.3.1.1 モデル作製手技

1.3.1.1.1 除毛の範囲, タイミング

除毛の範囲は、両側下半身全体に完全に行うことが、その後の蛍光リンパ管造影の際に体毛により蛍光強度が低下せず有用であった。また、単径リンパ節の位置する下腹部まで除毛した方が、左単径皮膚切開から上外側に皮下直下で剥離する際に有用であった。

除毛のタイミングは、缶内残量の少なくなった除毛フォームがわずかでも液状化した状態で用いた際、除毛翌日に後肢および背部に皮膚障害が発生した(図2)。本実験では、除毛フォームの性状を確認した後、手術直前ではなく手術1~2日前に除毛を行い、皮膚障害がないことを確認してから実験に用いることとした。

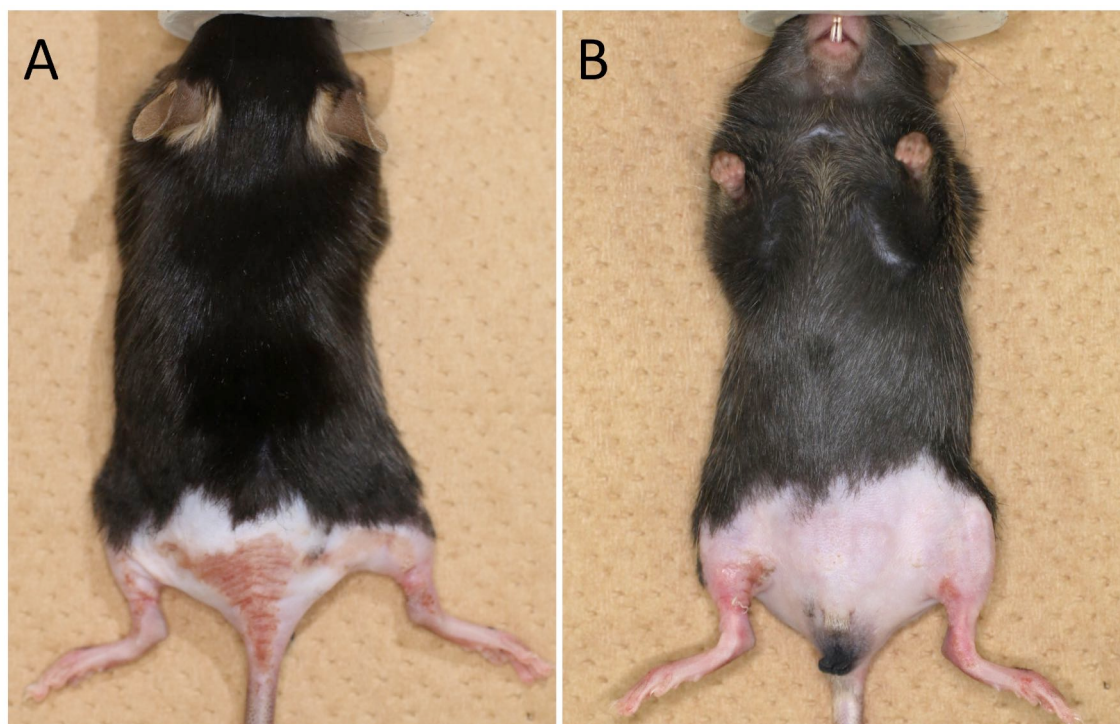


図2. 除毛フォームによるマウス後肢および背部の皮膚障害

A. 腹臥位, B. 仰臥位

1.3.1.1.2 体位

体位は、仰臥位(2%パテントブルー溶液注射)・腹臥位(左膝窩リンパ節の同定)・仰臥位(単径リンパ節脂肪弁の挙上・膝窩への移行, 単径閉創)・腹臥位(単径リンパ節脂

肪弁の固定、膝窩閉創)の順に体位変換することが最も効率的であった。2%パテントブルー溶液注射後の体位をとる際は、両側後肢を広げるようにテープで下床に固定することにより、手術操作が容易になった。

1.3.1.1.3 膝窩・単径の皮膚切開の方向・長さ、皮下剥離の範囲

膝窩の皮膚切開は、腹臥位で両側後肢を広げた状態で、後肢の輪郭が最陥凹する変曲点において、透見可能な坐骨静脈上で後肢の短軸方向に 5 mm 長皮膚切開することで(図 3A), 直下の坐骨静脈下に染色された膝窩リンパ節を容易に同定することが可能であった。

単径の皮膚切開は、仰臥位で両側後肢を広げた状態で、単径部中央の大腿動脈上で後肢の長軸方向に 10 mm 長皮膚切開することで(図 3B), 同切開から上外側に皮下直下で剥離し、単径脂肪組織内に染色された単径リンパ節を容易に同定することが可能であった。単径の皮膚切開から上外側に皮下直下で剥離しないと、単径リンパ節が皮膚側に残り、単径リンパ節脂肪弁と挙上できなかった($n=1$)。単径に 20 mm 長の皮膚切開を加えた際、手術翌日に創離開した($n=1$)。

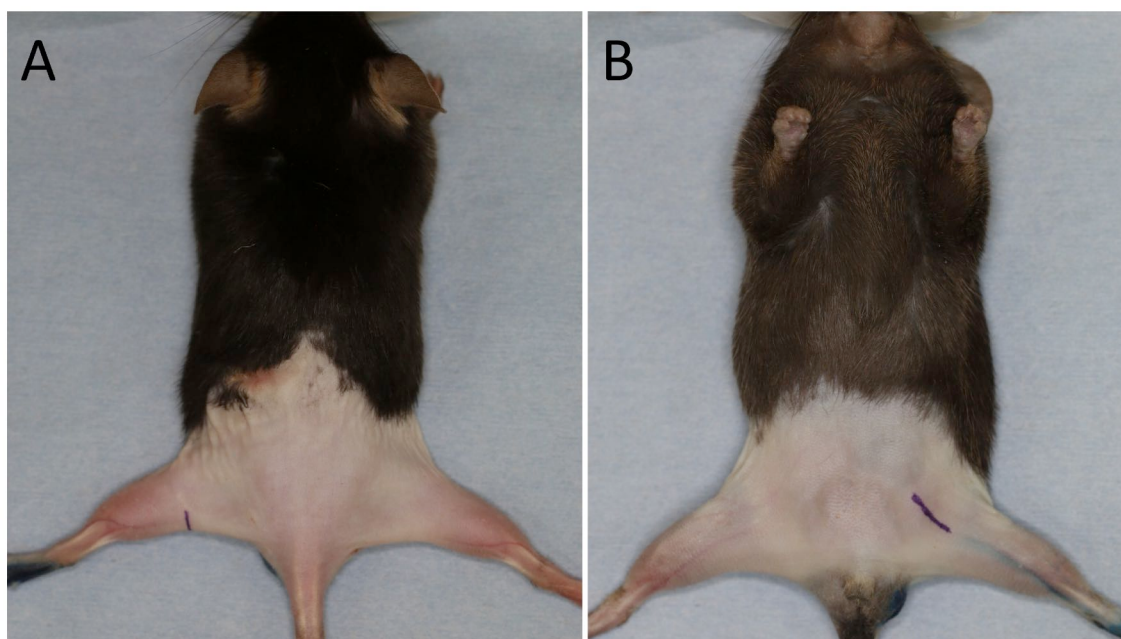


図 3. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの膝窩・単径の皮膚切開線デザイン
A. 腹臥位, B. 仰臥位

1.3.1.1.4 膝窩・単径リンパ節の同定法

マウスのリンパ流として、腹部・外陰部から単径リンパ節に流入する経路と、後肢から膝窩リンパ節に流入する経路(Kawashima et al., 1964)を参考に、2%パテントブル

一溶液 5 μ L を後肢の左足蹠および左陰囊脇に皮下注射することにより、染色された膝窩・単径リンパ節を容易に同定することが可能であった(図 4)。なお、2%パテントブルー溶液を皮下注射しなくても、手術用顕微鏡の 10 倍視野においては、膝窩・単径リンパ節は薄い灰白色に同定可能であったが、同定に時間を要し、特に単径リンパ節は誤認することがあった。

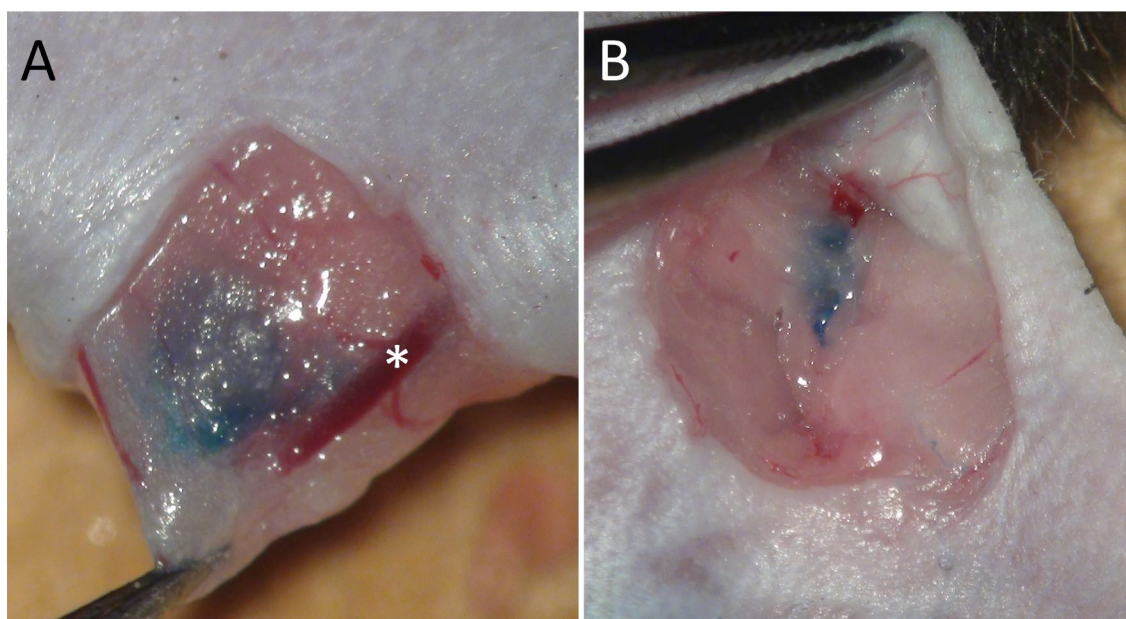


図 4. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルのパテントブルーによるリンパ節の染色
A. 膝窩リンパ節, B. 単径リンパ節, *. 坐骨静脈

1.3.1.1.5 膝窩リンパ節の扱い

過去のラットのモデル(Rabson et al., 1982)では、膝窩リンパ節のみ摘出するよりも膝窩リンパ節と周囲の脂肪組織を含めて切除(膝窩リンパ節郭清)した方が、単径リンパ節脂肪弁を膝窩に移植した際に移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通率が有意に高かったとされる。しかし、マウスにおいては、膝窩リンパ節周囲の脂肪組織は少なく、膝窩リンパ節周囲の脂肪組織を切除すると、大腿二頭筋と内側ハムストリングスの間が奥側の皮下に貫通することがあったため、膝窩リンパ節のみ単純摘出することとした(図 5)。

また、膝窩リンパ節摘出の際に出血し、単径リンパ節を移植するまでの間に膝窩に血腫を形成することがあったため、膝窩リンパ節摘出のタイミングは、単径リンパ節脂肪弁を膝窩に移行した後、膝窩に固定する直前とした。

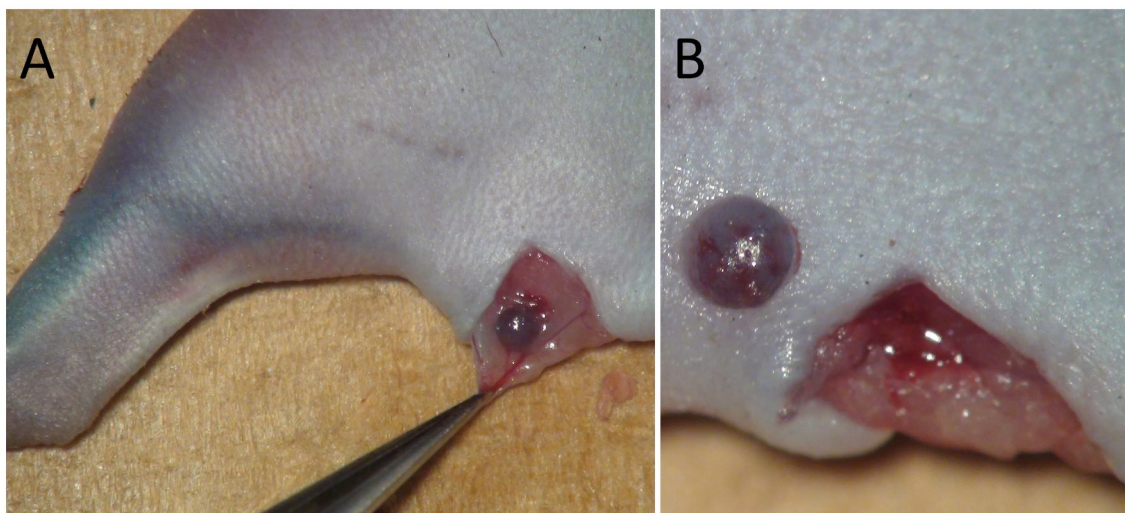


図 5. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの左膝窩リンパ節
A. 膝窩リンパ節周囲の剥離後摘出前, B. 膝窩リンパ節摘出後

1.3.1.1.6 単径リンパ節脂肪弁の挙上法

単径リンパ節の頭側縁で腸腰動脈を含めて単径脂肪組織を切断した(図 6A)。腸腰動脈は自然に止血され、凝固や結紮の必要はなかった。単径リンパ節の頭側縁周囲の脂肪組織を把持し、単径脂肪組織に確認できる浅腹壁動脈を切断しないよう 5 mm 幅で脂肪組織を含めて、単径リンパ節脂肪弁を挙上した(図 6B)。

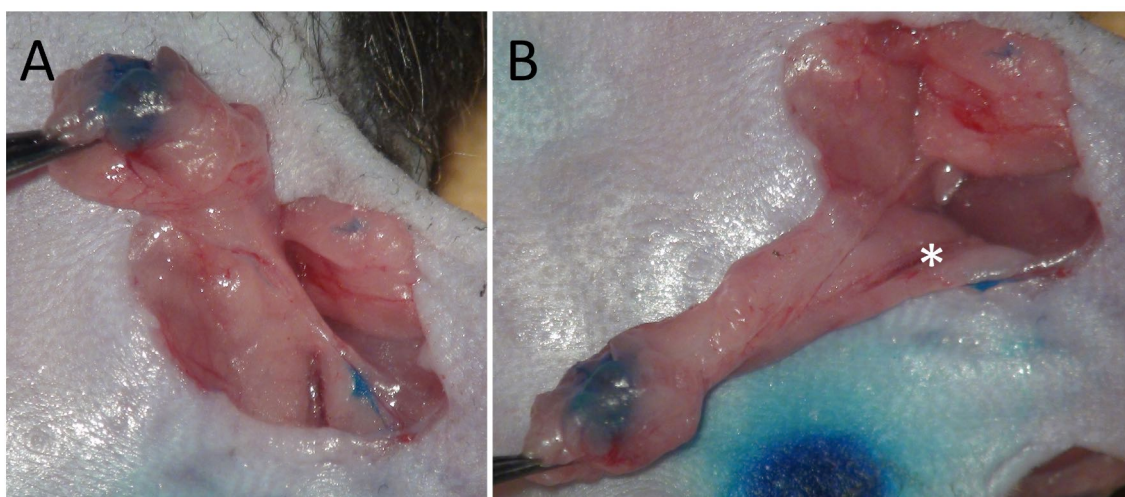


図 6. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの単径リンパ節脂肪弁の挙上
A. 単径リンパ節脂肪弁挙上中, B. 単径リンパ節脂肪弁挙上後, *. 浅腹壁動脈

1.3.1.1.7 蛍光血管造影による単径リンパ節脂肪弁への血流の確認法

当初、侵襲の少ない尾静脈内注射を試みたが、成功率が低く、失敗し尾部への皮下注射となった際、その後の蛍光リンパ管造影にも影響を及ぼした。そのため、左頸部の皮膚切開から大胸筋下の左上大静脈に ICG を静脈内注射することとした。その直後に PDE を用いて単径リンパ節脂肪弁の血流を確認した。

1.3.1.1.8 単径リンパ節脂肪弁を膝窩に移行する方法

最短の移行距離となるよう、左単径および左膝窩皮膚切開間の大腿内側を皮下剥離した皮下トンネルを通して、単径リンパ節脂肪弁を膝窩に移行することとした。移行は、仰臥位でモスキート鉗子を用いて単径リンパ節脂肪弁を膝窩から引きずりこむように行った。単径リンパ節脂肪弁を移行後、単径の皮膚切開を閉創し、腹臥位に体位変換する間に、単径リンパ節脂肪弁が乾燥しないよう、先端の単径リンパ節がわずかに膝窩の皮膚切開から見える程度の移行に留めることとした。

1.3.1.1.9 単径リンパ節脂肪弁を膝窩に移植・固定する方法

膝窩リンパ節に比べ、単径リンパ節は大きいため、単径リンパ節を膝窩に嵌め込んだ際、強固に固定する必要があった。単径リンパ節周囲の脂肪弁を 10-0 ナイロン糸 1 針で大腿二頭筋に縫合したところ、術後に単径リンパ節が膝窩から逸脱した ($n=1$) ため、10-0 ナイロン糸 3 針で末梢側・中枢側・頭側の 3 点で大腿二頭筋に縫合 (図 7) することとした。単径リンパ節脂肪弁を 3 点で大腿二頭筋に縫合した例 ($n=3$) では、術後に単径リンパ節が膝窩から逸脱することはなかった。

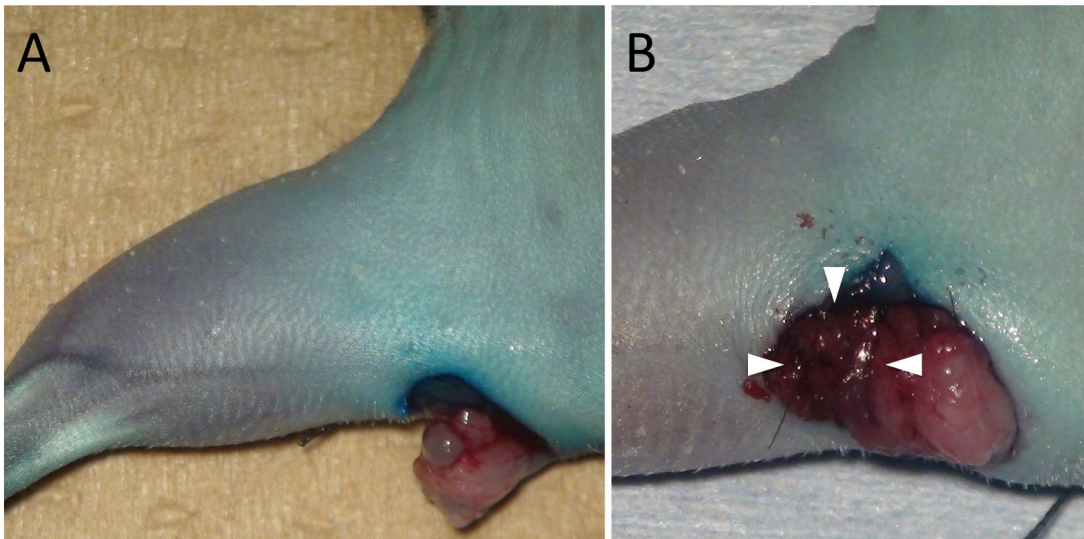


図 7. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの膝窩に移行した単径リンパ節脂肪弁
A. 単径リンパ節脂肪弁固定前, B. 単径リンパ節脂肪弁固定後,
矢頭. 10-0 ナイロン糸 3 針での単径リンパ節脂肪弁の大腿二頭筋への縫合点

1.3.1.1.10 閉創の方法

10 mm 長の左単径皮膚切開は 5-0 ナイロン糸 3 針, 5 mm 長の左膝窩皮膚切開は 5-0 ナイロン糸 2 針による単純結紮縫合で閉創した例で, 術後の創離開はなかった ($n=4$)。20 mm 長の左単径皮膚切開を加え, 5-0 ナイロン糸 6 針による単純結紮縫合で閉創した例では, 手術翌日に創離開した ($n=1$)。

1.3.1.2 蛍光リンパ管造影による後肢リンパ流の検討

術後 1, 2 週目には, 単径リンパ節脂肪弁を移植した左膝窩に強い蛍光像を認めたマウス ($n=3$, 図 8A, B) と, 認めなかったマウス ($n=1$, 図 8E, F) があつた。術後 3, 4 週目には, 単径リンパ節脂肪弁を移植した左膝窩に蛍光像を認めたマウス ($n=2$, 図 8C, D) と, 認めなかったマウス ($n=2$, 図 8G, H) があつた。

Postoperative

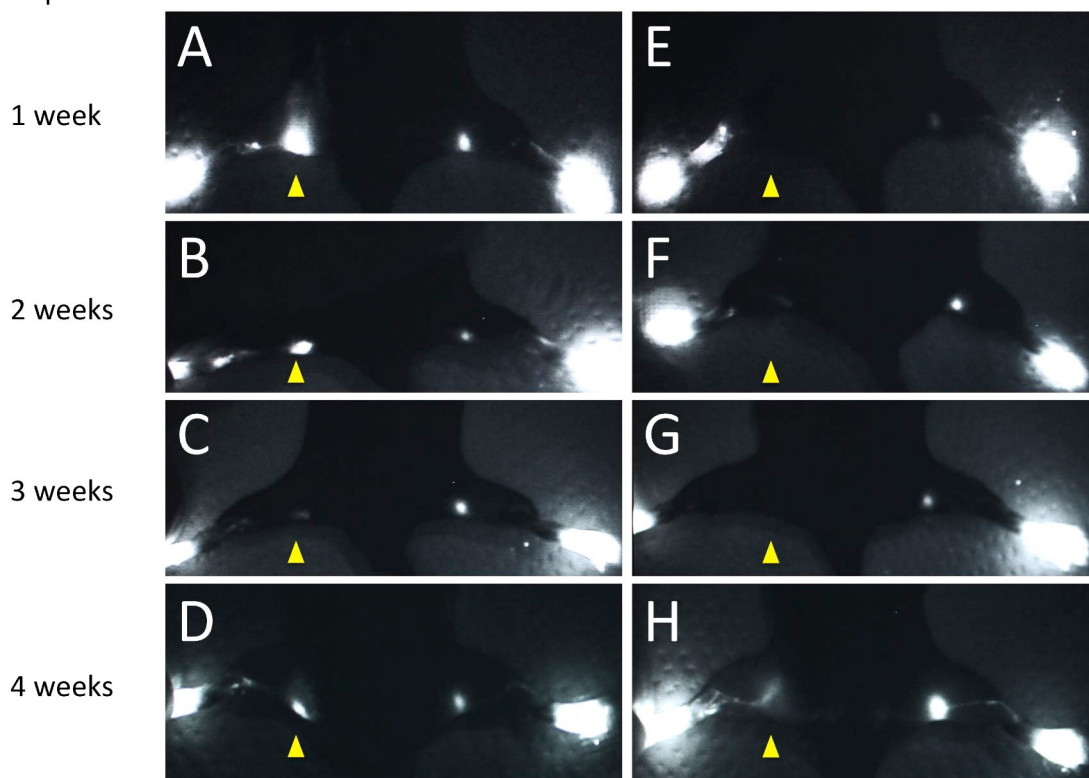


図 8. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの術後蛍光リンパ管造影(腹臥位)
A-D. 同一マウスの経時的変化。移植リンパ節が組織学的に確認された例
E-H. 同一マウスの経時的変化。移植リンパ節が組織学的に確認されなかった例
矢頭. 単径リンパ節脂肪弁を移植した左膝窩

膝窩リンパ節を摘出し、同膝窩に血管柄のない遊離リンパ節移植として膝窩リンパ節を戻したマウスモデルにおいて、術後3週で移植リンパ節へのリンパ流が回復したという報告(Maeda et al., 2018b)からも、術後1, 2週目に左膝窩に認めた強い蛍光像は、膝窩の間質へのリンパのプーリングを可視化した可能性が考えられた。本実験では、術後3, 4週目に蛍光リンパ管造影を行うこととした。

また、ICG (Cardiogreen polymethine dye, Sigma, 1.0 mg/mL)は、マウスの体表にわずかに付着しただけで、PDE上の点状蛍光像として観察されたため、本実験ではICG (Diagnogreen® for Injection 25 mg; Daiichi Sankyo Co., Ltd.; 2.5 mg/mL)を用いることとした。

1.3.1.3 移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通の検討

単径リンパ節脂肪弁を移植した左膝窩にパテントブルーによる移植リンパ節の染色を認めたマウス($n=2$, 図9A, B)と、認めなかったマウス($n=2$, 図9C, D)があった。パテントブルーによる移植リンパ節の染色を認めなかった2例のうち1例は、膝窩から移植リンパ節が大腿皮下に逸脱していた。

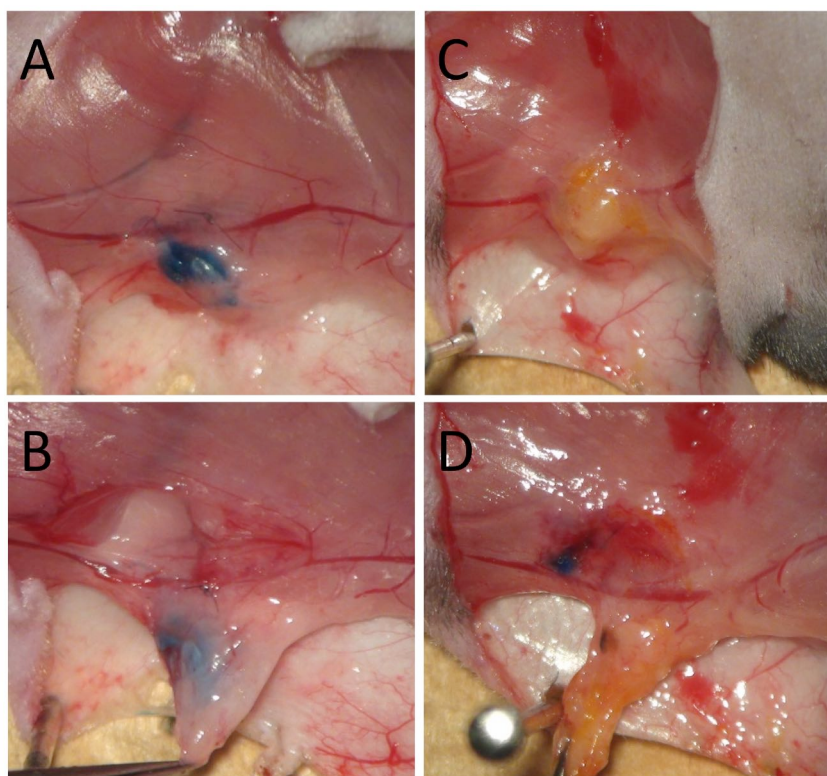


図9. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの移植リンパ節
A, B. パテントブルーによる移植リンパ節の染色を認めた例
C, D. パテントブルーによる移植リンパ節の染色を認めなかった例

蛍光標識デキストランを用いた移植リンパ節の蛍光観察を行った1例(パテントブルーによる移植リンパ節の染色を認めなかった例)では, 対側の正常膝窩リンパ節と比べ(図 10A, B), フルオレセインの蛍光像を認めなかった(図 10C, D)。パテントブルーによる移植リンパ節の染色を認めた1例は, 凍結切片作成装置を用いて凍結組織標本を薄切する際に組織を破損したため, 蛍光観察を行えなかった。

本結果を踏まえ, また HE 染色での組織学的検討ができなくなるため, 蛍光標識デキストランを用いたリンパ節の蛍光観察は, 本実験ではパテントブルーによる染色で代用することとした。

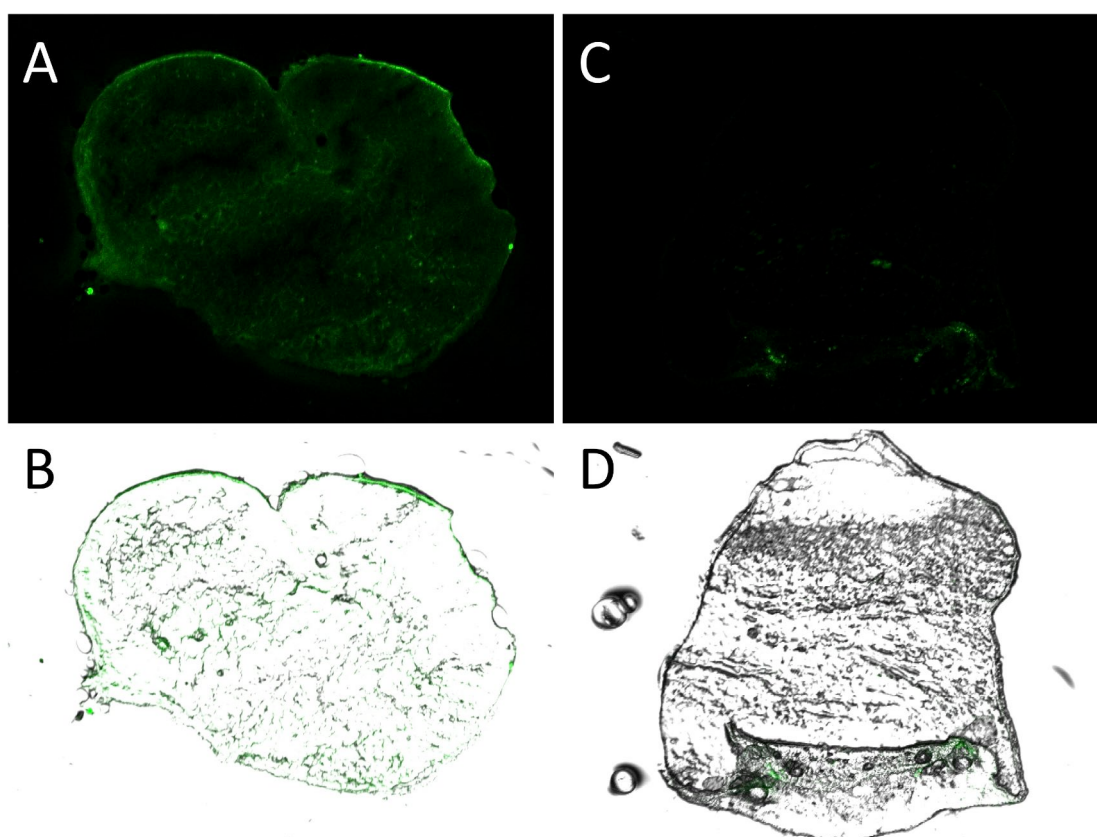


図 10. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルのリンパ節

A, C. 蛍光画像, B, D. 蛍光画像と微分干渉画像の重ね合わせ画像

A, B. 対側正常膝窩リンパ節

C, D. フルオレセインの蛍光像を認めなかった移植リンパ節

1.3.1.4 移植リンパ節の組織学的検討

対側の正常単径リンパ節(図 11A, B)は、切片上、長径 2 mm、短径 1 mm 程度のそら豆形であった。皮質領域に濃く染色される明瞭な濾胞構造を認めた。単径リンパ節は、球体ではなく、三次元的なそら豆形であるため、中心の髄洞部分が切片上で欠けて現れないことがあった。

対側の正常膝窩リンパ節(図 11C, D)は、1 mm 程度の楕円形～円形であった。皮質領域に濃く染色される明瞭な濾胞構造を密に認めた。膝窩リンパ節は、球体に近い形であるため、中心の髄洞部分が切片上で欠けることはなかった。

いずれのリンパ節も周囲の脂肪組織をつけずに核出してしまうと、周囲の結合組織の評価ができないことが判明し、本実験では周囲の脂肪組織を含めて摘出することとした。

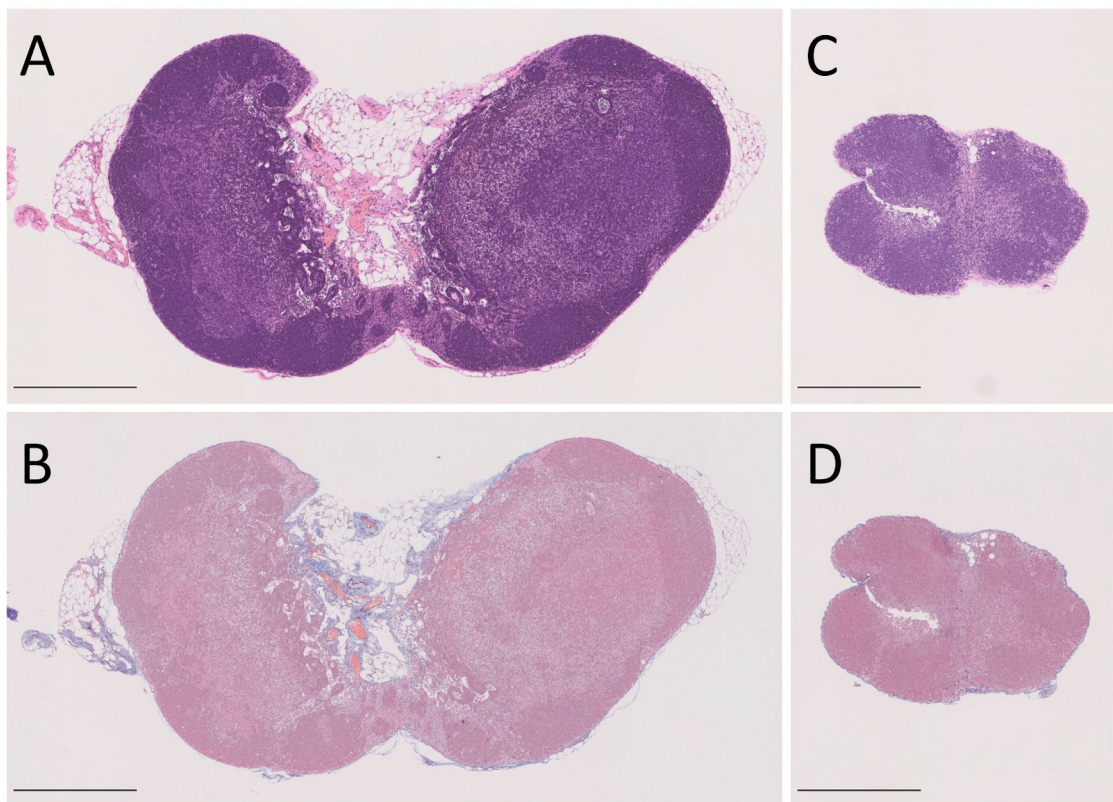


図 11. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの対側正常単径・膝窩リンパ節

A, C. HE 染色, B, D. EM 染色, Bars. 500 μ m

A, B. 対側正常単径リンパ節, C, D. 対側正常膝窩リンパ節

パテントブルーによる染色を認めた移植リンパ節(図 12)は, 切片上, 長径 0.75 mm, 短径 0.5 mm 程度の楕円形であった。皮質領域に濃く染色される明瞭な濾胞構造を認めた。移植リンパ節周囲には, HE 染色でピンク色, EM 染色で青色に染色される膠原線維による線維化を認めた。

一方, パテントブルーによる染色を認めなかった移植リンパ節は, リンパ節内の細胞密度が高いため明らかな濾胞構造は認めなかった

本結果から, 移植リンパ節周囲の線維化の評価は, HE 染色で十分評価できると判断し, 本実験では EM 染色を行わず, HE 染色によりリンパ節の構造を組織学的に確認することとした。

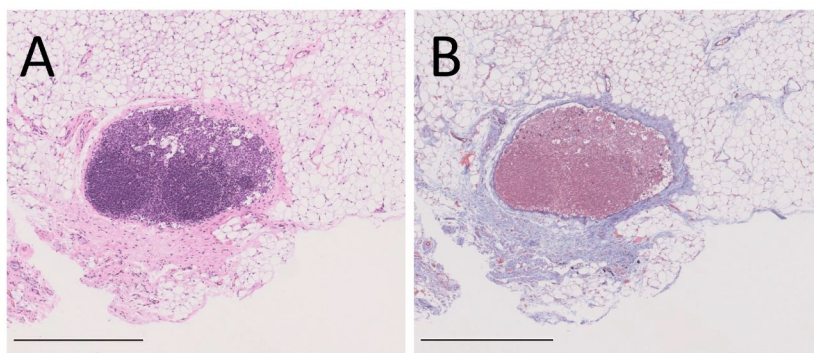


図 12. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの移植リンパ節
A. HE 染色, B. EM 染色, Bars. 500 μ m

1.3.2 本実験

1.3.2.1 モデル作製手技

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。本モデル作製の手術時間は、一人で行って約30分を要した。

手術操作を加えた範囲に解剖学的変異は認めなかった。全例において左単径リンパ節は左単径脂肪組織内に1つ存在し、浅腹壁動脈の血管茎は1.5~2.0 cmの長さがあり、有茎で膝窩へ移行するのに十分であった(図13A)。ICG 蛍光血管造影により、単径リンパ節脂肪弁への血流を確認した(図13B)。

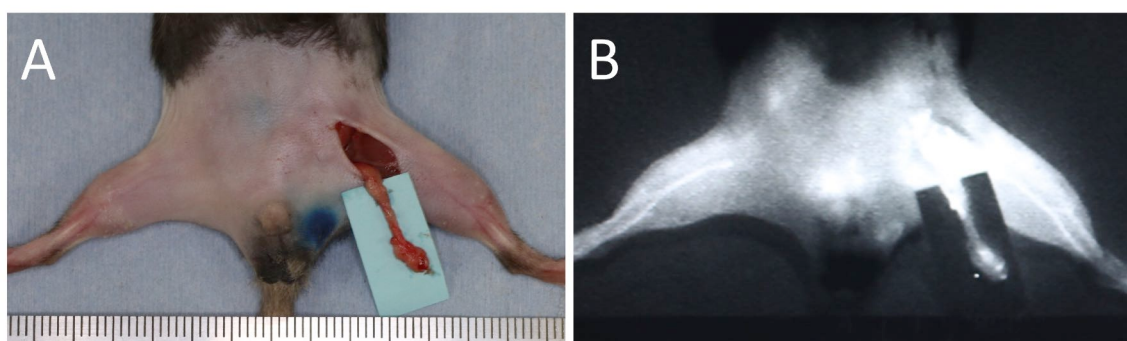


図13. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの単径リンパ節脂肪弁挙上時

A. 挙上された単径リンパ節脂肪弁

B. 蛍光血管造影により蛍光像が確認された単径リンパ節脂肪弁

1.3.2.2 蛍光リンパ管造影による後肢リンパ流の検討

ICG 蛍光リンパ管造影では、全例において手術操作を加えた対側の右膝窩に明瞭な点状蛍光像を認めた。術後 3, 4 週目では、25 例中 16 例(64.0%)に手術操作を加えた左膝窩に明瞭な点状蛍光像を認めた(図 14A, B)。

残りの 9 例(36.0%)では、左膝窩に明瞭な点状蛍光像を認めず、後肢から腓脛にかけてリンパ管の側副路や皮膚へのリンパ逆流鬱滞所見である *dermal backflow* (Furukawa et al., 2011; Suami et al., 2007; Yamamoto et al., 2011a; Yamamoto et al., 2011b; Yamamoto et al., 2011c) と考えられる蛍光像を認めた(図 14C, D)。

Postoperative

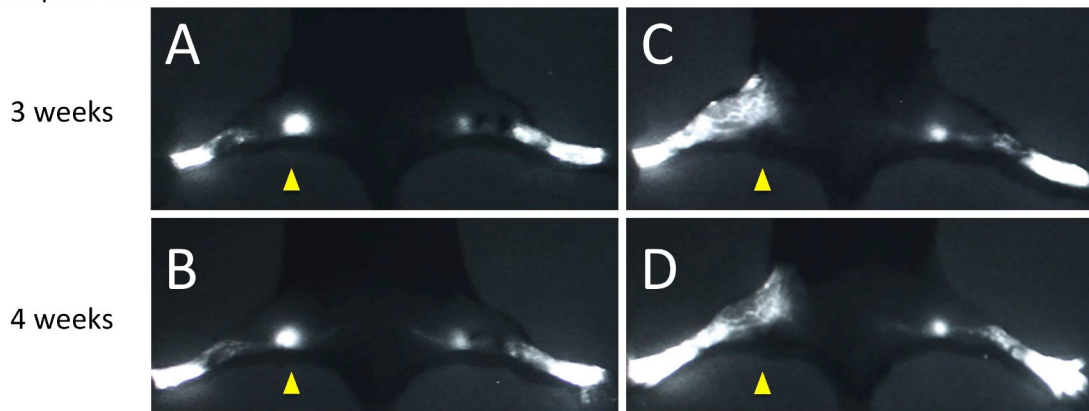


図 14. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの術後蛍光リンパ管造影(腹臥位)
A, B. 同一マウスの経時的変化。移植リンパ節の蛍光像が確認された例
C, D. 同一マウスの経時的変化。移植リンパ節の蛍光像が確認されなかった例
矢頭. 腓脛リンパ節脂肪弁を移植した左膝窩

1.3.2.3 移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通の検討

術後4週目のパテントブルー色素による移植リンパ節の染色は、ICG 蛍光リンパ管造影で左膝窩に明瞭な点状蛍光像を認めた16例に認め(図15A, B), 移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通ありと判定した。

残りの9例ではパテントブルー色素による移植リンパ節の染色を認めず(図15C), 移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通なしと判定した。

ICG 蛍光リンパ管造影による左膝窩の明瞭な点状蛍光像の有無は、パテントブルー色素による移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通の判定と一致した。

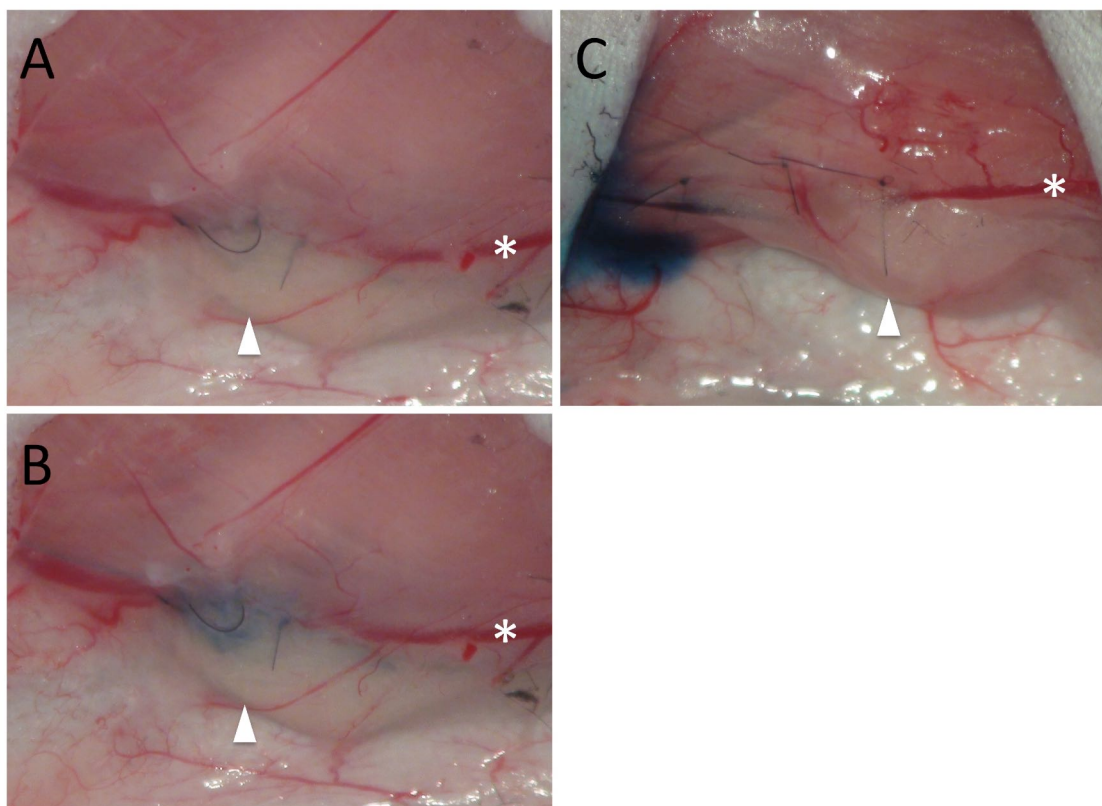


図15. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの移植リンパ節

A, B. パテントブルーによる移植リンパ節の染色を認めた例。BはAの15秒後

C. パテントブルーによる移植リンパ節の染色を認めなかった例

矢頭. 単径リンパ節脂肪弁を移植した左膝窩, *. 坐骨静脈

1.3.2.4 リンパ節の組織学的検討

全例において、HE 染色で移植リンパ節を認め、虚血や壊死を示唆する所見を認めなかった。移植リンパ節の周囲には、線維結合組織を認めた(図 16A, C)。移植リンパ節の大きさは、輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節(図 16A)は $0.37 \pm 0.24 \text{ mm}^2$ であり、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節(図 16C)は $1.31 \pm 1.17 \text{ mm}^2$ であった。対側の正常単径リンパ節(図 16D)は、 $2.93 \pm 0.82 \text{ mm}^2$ であり、対側の正常膝窩リンパ節(図 16B)は $0.64 \pm 0.27 \text{ mm}^2$ であった(図 17)。

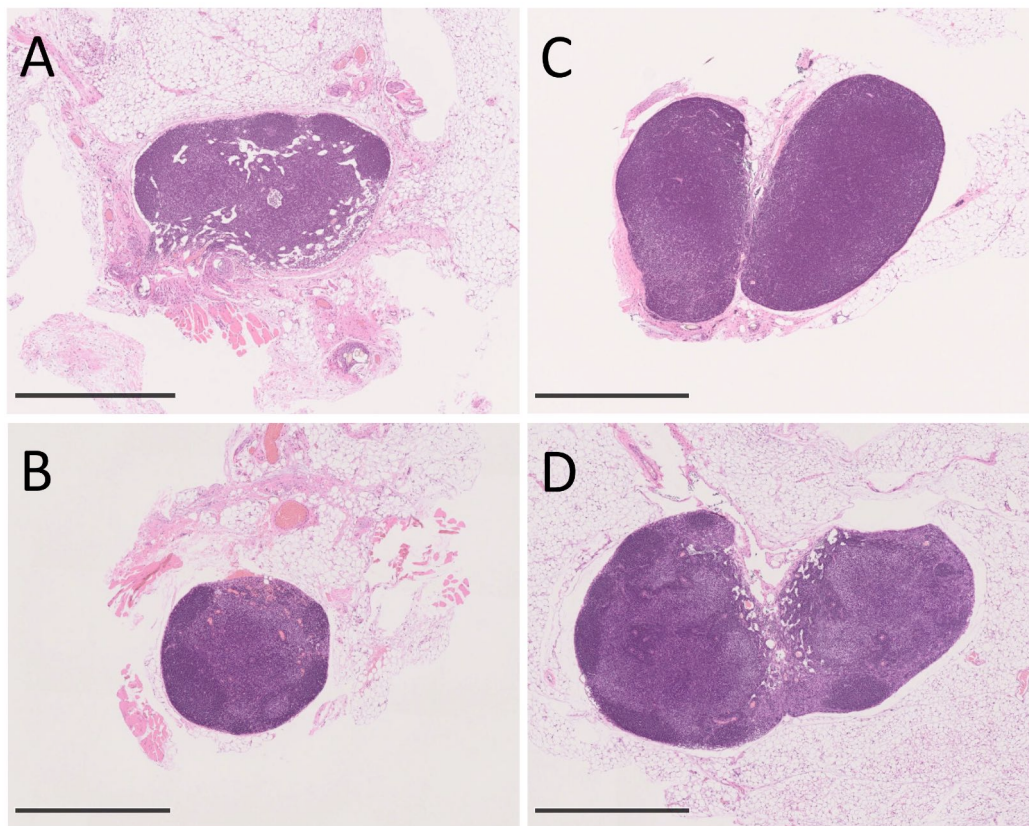


図 16. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルのリンパ節

HE 染色, Bars. 1mm

- A. 輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節
- B. 対側正常膝窩リンパ節
- C. 輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節
- D. 対側正常単径リンパ節

輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節は、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節 ($P=0.03$) および対側の正常単径リンパ節 ($P<0.001$) よりも有意に小さかったが、対側の正常膝窩リンパ節の大きさとは有意差なく (図 17)、対側の正常膝窩リンパ節と同様に皮質における明瞭な濾胞構造を認めた (図 16A, B)。

一方、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節は、対側の正常単径リンパ節 ($P=0.04$) よりも有意に小さく (図 17)、リンパ節内の細胞密度が高いため明らかな濾胞構造は認めなかった (図 16C, D)。

また、対側の正常膝窩リンパ節は、対側の正常単径リンパ節よりも有意に小さかった ($P=0.005$)。

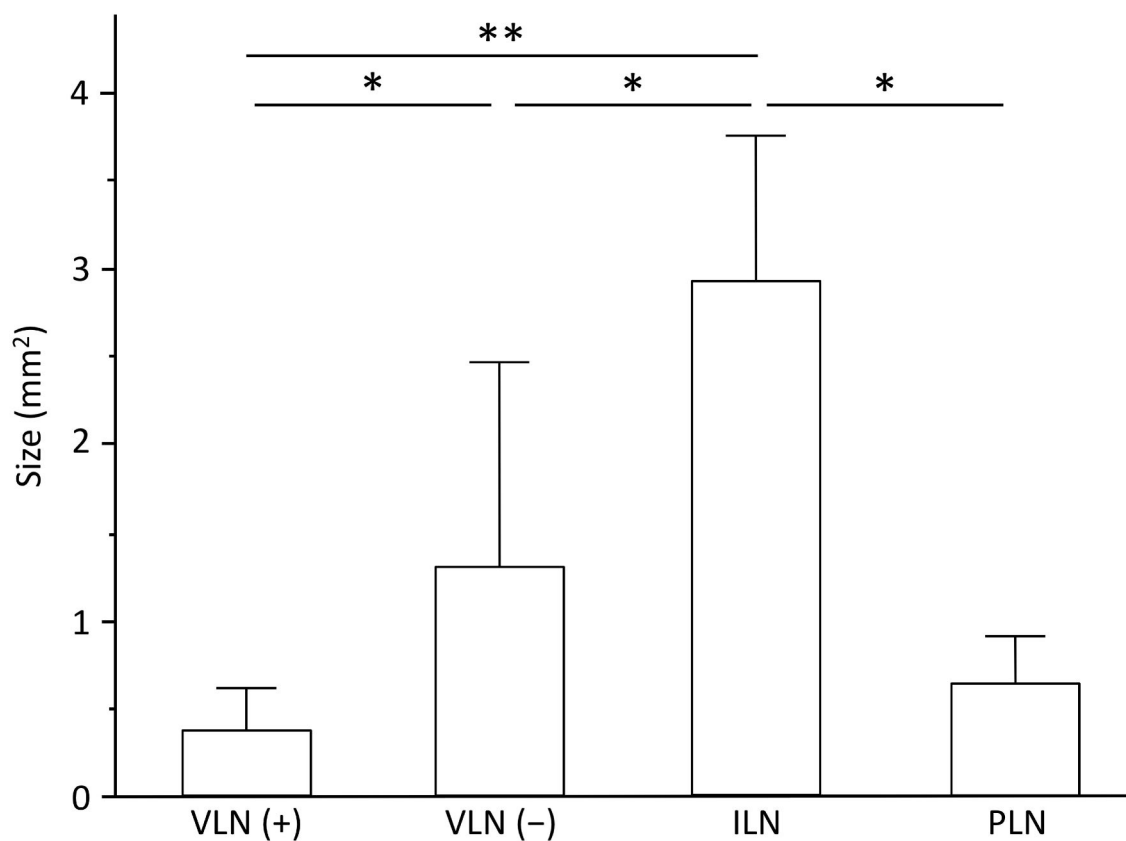


図 17. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルにおけるリンパ節の大きさ

VLN (+). 輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節

VLN (-). 輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節

ILN. 対側正常単径リンパ節

PLN. 対側正常膝窩リンパ節

*. $P<0.05$, **. $P<0.001$ (Steel-Dwass 検定)

1.4 考察

1.4.1 マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの作製

本研究は、マウス血管柄付きリンパ節移植モデルを作製するための詳細な解剖、その術式についての初めての報告である。単径リンパ節が1~4個あるラット (Francois et al., 2006; Tilney, 1971; Uygur et al., 2013) と比べ、マウスの単径リンパ節は1つであり、膝窩リンパ節摘出部に移植すると1:1での単純な比較が可能である。本モデルは、有茎の単径リンパ節脂肪弁を用いるため移植に際しての血管吻合が不要であり、手技に依存しにくい簡便なモデルである。

1.4.2 マウス血管柄付きリンパ節移植モデルにおける輸入リンパ管再疎通

本モデルの術後4週における輸入リンパ管再疎通率は64.0%であった。有茎単径リンパ節脂肪弁を膝窩に移植するラットモデルの術後5週における輸入リンパ管再疎通率は、膝窩リンパ節のみ摘出した場合は単径リンパ節の処理方法に関わらず29~37%であり、膝窩リンパ節郭清を行い、単径リンパ節脂肪弁の先端にある単径リンパ節を露出させた場合は57%と有意に高かったとされる (Rabson et al., 1982)。膝窩リンパ節を摘出し、同膝窩に血管柄のない遊離リンパ節移植として、摘出した膝窩リンパ節を同所に移植したマウスモデルにおいて、術後4週における輸入リンパ管再疎通率は100%であったとされる (Maeda et al., 2018b)。本モデルは、有茎であるため血管の流入する門部側は、リンパ節が脂肪組織に覆われており、全周性にリンパ節を露出可能な血管柄のない遊離リンパ節移植に比べ、リンパ管の再疎通が起こりやすい表面積が減少している状態と考えられる。

一方、蛍光タンパクを発現させたレポーターマウスのリンパ節を腋窩リンパ節郭清後のヌードマウスの腋窩に分割リンパ節移植したモデルにおいて、術後2ヵ月時の蛍光標識デキストランを用いたリンパ節の蛍光観察による輸入リンパ管再疎通率は22%であったとされるが、アデノウイルスベクターによる Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C の遺伝子導入により82%に改善したとされる (Tammela et al., 2007)。移植リンパ節のリンパ管再疎通は、“Spontaneous lymphatic reconnection”と形容される (Aschen et al., 2014) ように確率的に低く、リンパ管再疎通率を高める方法として、有茎単径リンパ節脂肪弁を同単径に移植するブタモデルにおいて VEGF-C (Honkonen et al., 2013; Lahtenvuo et al., 2011) や VEGF-D (Lahtenvuo et al., 2011) のアデノウイルスベクターによる遺伝子導入などが報告されている。

また、本モデルにおける術後3週以降のICG 蛍光リンパ管造影による左膝窩の明瞭な点状蛍光像の有無は、術後4週のパテントブルー色素による移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通の判定と一致した。輸入リンパ管再疎通の時期としては、術後3週で

移植リンパ節へのリンパ流が回復したという報告(Maeda et al., 2018b)と同様の結果であった。術後3週のICG 蛍光リンパ管造影で非侵襲的に輸入リンパ管再疎通を予測可能であり、以降の時期に同種移植可能なB16F10メラノーマ細胞株を用いた腫瘍移植モデル(Maeda et al., 2018a; Oashi et al., 2013)も作製可能であり、今後の研究の発展性がある。

1.4.3 マウス血管柄付きリンパ節移植モデルにおけるリンパ節の組織学的検討

移植リンパ節への血流は、特にリンパ節脂肪弁として一塊に挙上した際、その生着に重要とされる(Tourani et al., 2016)。また、移植リンパ節へのリンパ流は、リンパ節における免疫細胞の恒常性維持機能に重要とされる(Randolph et al., 2005)。

本モデルでは、移植リンパ節を輸入リンパ管との再疎通の有無で比較することができた。輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節は、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節よりも有意に縮小したが、皮質における明瞭な濾胞構造を認めた。この結果は、輸入リンパ管再疎通により、移植した単径リンパ節においてレシピエントの膝窩リンパ節に近い大きさ、リンパ球の構成にリモデリングが起きた可能性が考えられた。皮質における明瞭な濾胞構造については、輸入リンパ管からリンパ節内へ到達した抗原や抗原提示細胞に対するB細胞応答が起きている可能性を示唆する所見と考えられた。一方、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節は、リンパ節内の細胞密度が高いため明らかな濾胞構造は認めなかった。マウス血管柄付きリンパ節移植モデルにおける機能的リンパ系再構築には、移植リンパ節がレシピエントのリンパ管と再疎通することも重要な要素であると考えられた。

1.4.4 限界

本モデルには次に述べる限界がある。第一に、モデル移植リンパ節への血流評価は、リンパ節脂肪弁挙上時の肉眼的血管連続性の確認とICG 血管造影である。ICG 血管造影が一度しか行えないため、膝窩に移行した後の移植リンパ節への血流は評価できなかった。リンパ節脂肪弁挙上時にICG 血管造影を行わなければ、リンパ節を膝窩に移行直後にはICG 血管造影が可能だが、その後リンパ節周囲の縫合固定、閉創による圧迫があるため、手術終了時に移植リンパ節への血流を評価することはできなかった。

第二に、移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通は、ICG 蛍光リンパ管造影およびパテントブルー色素により確認できたが、移植リンパ節からの輸出リンパ管再疎通は、リンパ節周囲の側副路との区別が困難であり、評価することはできなかった。

第三に、リンパ節の大きさは、最大切片での二次元的な面積を計測した。しかし、1～2 mm 大の球体ではないリンパ節をパラフィン包埋組織標本から常に同じ面で薄切することは困難であった。

第二章

リンパ節移植モデルにおける血流の有無による移植リンパ節の組織学的検討

2.1 緒言

2.1.1 背景

血管柄付きリンパ節移植の生理的機能は、“Regenerative mechanisms”と呼ばれる移植リンパ節や周囲の脂肪組織から放出されるサイトカインおよび成長因子により促されるリンパ管新生の結果としてのリンパ管再疎通と，“Pump mechanism”と呼ばれるリンパ節内の HEV におけるリンパ静脈交通の 2 つによりもたらされるとされる (Miranda Garcés et al., 2016; Miranda Garcés et al., 2017)。

ナイーブリンパ球は、抗原を探してリンパ節などの二次リンパ組織を血管系を介して循環する、リンパ球再循環と呼ばれる特異的な回遊現象を示す。抗原となる可溶性分子や樹状細胞などの抗原提示細胞は末梢組織から輸入リンパ管を通してリンパ節に入るが、ナイーブリンパ球は血管系から HEV の細胞間隙を通してリンパ節に入り、輸出リンパ管を通してリンパ節から出ていく (von Andrian and Mempel, 2003)。したがって、HEV は末梢組織での病原体に対する免疫応答を誘導するために重要な構造である (Kasprzak et al., 2013)。HEV はリンパ節やパイエル板などの脾臓を除く二次リンパ組織に特異的な脈管構造であり、背の高い立方体様の内皮細胞が特徴である (Kasprzak et al., 2013)。HEV はその内皮細胞の管腔側に、リンパ球細胞表面分子である L-セレクチンに相補的な接着分子群である peripheral node addressin (PNAd) を発現しており、リンパ球がローリング、接着して内皮細胞間をリンパ節内へと血管外遊走すること (リンパ球ホーミング) を可能にしている (Girard et al., 2012; Rosen, 2004)。

移植リンパ節へのリンパ流がリンパ節における HEV の恒常的な特性の維持に重要であることは数多く報告されているが (Drayson and Ford, 1984; Hendriks et al., 1987; Hendriks et al., 1980; Mebius et al., 1991a), 移植リンパ節への血流が HEV にどのように影響するかという報告は渉猟し得た限りなかった。

2.1.2 目的

第一章で確立した血管柄付きリンパ節移植モデルと血流のないリンパ節移植モデルにおいて移植リンパ節を比較することで、血流の有無が移植リンパ節の形態・機能に与える影響を組織学的に検討する。

2.2 方法

2.2.1 動物実験計画

過去のラットのモデル(Shesol et al., 1979)を参考に, 50 匹のマウスを用いて, 以下の3群を作製し, 下記の方法で各群を比較した。

Group 1 は有茎血管柄付きリンパ節移植群($n=20$), Group 2 は有茎血管柄結紮リンパ節移植群($n=15$), Group 3 は遊離リンパ節移植群($n=15$)とした。Group 2 と Group 3 が血流のないリンパ節移植モデルである。

2.2.2 モデル作製手技

Group 1 は第一章と同様に左単径リンパ節に流入する浅腹壁動脈を茎とするリンパ節脂肪弁を挙上し, 同側の膝窩リンパ節摘出部に移行した群である(図 18A)。第一章において, 肉眼的に単径リンパ節脂肪弁への浅腹壁動脈を損傷しなければ, ICG 蛍光血管造影により移植リンパ節への血流が確認できたため, 本実験では術中の ICG 蛍光血管造影は行わなかった。

Group 2 は脂肪弁の影響を検討するために, Group 1 と同様に左単径リンパ節脂肪弁を挙上した後に, 浅腹壁動脈を根部において 10-0 ナイロン糸 1 針で結紮した後, 同側の膝窩リンパ節摘出部に移植した群である(図 18B)。

Group 3 は左単径リンパ節を摘出し, 同側の膝窩リンパ節摘出部に移植した群である(図 18C)。単径リンパ節を膝窩に嵌め込み, 膝窩を閉鎖するよう 10-0 ナイロン糸 1 針で大腿二頭筋と脂肪組織を縫合した。

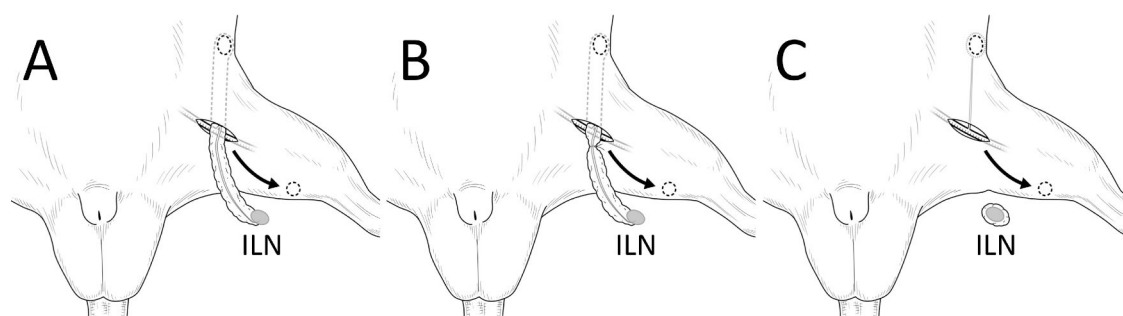


図 18. マウスリンパ節移植モデル群のシェーマ

A. Group 1 有茎血管柄付きリンパ節移植群, vascularized lymph node (VLN)

B. Group 2 有茎血管柄結紮リンパ節移植群, non-vascularized lymph node (non-VLN)

C. Group 3 遊離リンパ節移植群, free non-vascularized lymph node (FLN)

ILN. inguinal lymph node

2.2.3 移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通の検討

第一章と同様に術後 4 週目にマウス左膝窩を皮膚切開し、リンパ節移植部を露出した後、後肢の左足蹠に 2%パテントブルー溶液を 5 μ L 皮下注射し、移植リンパ節への色素流入を手術用顕微鏡に接続したデジタルビデオカメラを用いて観察した。移植リンパ節が染色された場合、移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通ありと判定した。移植リンパ節が染色されなかった場合、移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通なしと判定した。

Group 1 において輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節は VLN (+)、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節は VLN (-) と表記した。Group 2 において輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節は non-VLN (+)、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節は non-VLN (-) と表記した。Group 3 において輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節は FLN (+)、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節は FLN (-) と表記した。

2.2.4 リンパ節の組織学的検討

術後 4 週目のパテントブルーによる移植リンパ節の染色の観察後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、移植リンパ節 ($n = 50$) および対側の単径リンパ節 ($n = 10$) を摘出し、第一章と同様に、パラフィン包埋組織標本を作製し、HE 染色を行った。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、以下の方法で免疫組織化学染色を行った。なお、一次抗体、希釈が必要な二次抗体、抗原賦活化液には、希釈液 (Dako REAL™ Antibody Diluent; Dako, Glostrup, Denmark; code S2002) を用いて、その希釈率を (dilution 抗体 1 : 希釈液) として表記した。

2.2.4.1 免疫組織化学染色の抗体条件検討および抗原特異性の検討 (PNAd)

マウスの対側の正常単径リンパ節を用いて、HEV に対する PNAd の免疫組織化学染色につき、過去の報告 (Mokhtar et al., 2014) を参考に、抗体条件検討を行い、確立している内皮細胞に対する platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)/cluster of differentiation (CD) 31、リンパ管内皮細胞に対する lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) の免疫組織化学染色と比較し、PNAd の免疫組織化学染色の HEV に対する抗原特異性を検討した。

以下の pH6 クエン酸は抗原賦活化液 pH6 クエン酸緩衝液 (Dako REAL™ Target Retrieval Solution, Dako, code S2031, dilution 1:10) を用い、pH9 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) は抗原賦活化液 pH9 (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan; code 415211,

dilution 1:10) を用い、プロテイナーゼ K はタンパク分解酵素プロテイナーゼ K 溶液 (Proteinase K, Dako, code S3004) を用いたことを示す。

PNAd に対する一次抗体は rat monoclonal PNAd antibody (clone MECA-79; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA; code sc-19602, dilution 1:50) を用い、その negative control は rat IgM isotype control (Thermo Fisher Scientific, code 02-9888) を用いたことを示す。

Avidin-biotinylated peroxidase complex (ABC) 法は、二次抗体 biotinylated rabbit anti-rat IgG secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; code BA-4000, dilution 1:200) と検出試薬 VECTASTAIN® Elite® ABC Kit (Vector Laboratories, code PK-6100) を用いたことを示す。

ポリマー法は、二次抗体 goat anti-rat secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Histofine® Simple Stain™ MAX PO (Rat), Nichirei Biosciences Inc., code 414311F) を用いたことを示す。

PNAd の免疫組織化学染色につき、以下の 10 条件で抗体条件検討を行った (表 1)。

表 1. PNAd に対する免疫組織化学染色の抗体条件検討

条件	抗原賦活化	一次抗体	希釈率	温度・時間	検出系
1.	pH6 クエン酸	PNAd	1:100	常温 60 分	ABC 法
2.	pH9 EDTA	PNAd	1:100	常温 60 分	ABC 法
3.	無処理	PNAd	1:100	常温 60 分	ABC 法
4.	プロテイナーゼ K	PNAd	1:100	常温 60 分	ABC 法
5.	pH9 EDTA	Negative control	1:100	常温 60 分	ABC 法
6.	pH9 EDTA	PNAd	1:100	常温 60 分	ポリマー法
7.	pH9 EDTA	PNAd	1:50	常温 60 分	ポリマー法
8.	pH9 EDTA	Negative control	1:50	常温 60 分	ポリマー法
9.	pH9 EDTA	PNAd	1:50	4℃一晩	ポリマー法
10.	pH9 EDTA	Negative control	1:50	4℃一晩	ポリマー法

2.2.4.2 リンパ節の免疫組織化学染色 (PNAd)

抗原賦活化液 pH9 (Nichirei Biosciences Inc., code 415211, dilution 1:10) を用いて 95℃ 温浴処理を 20 分行った。常温で 20 分自然冷却後に水洗し、0.3%過酸化水素水に 10 分浸した。トリス塩酸緩衝液 (Tris-buffered saline, TBS) で 2 回洗浄後、一次抗体 rat monoclonal PNAd antibody (clone MECA-79; Santa Cruz Biotechnology Inc., code sc-19602, dilution 1:50) に 4℃で一晩浸した。TBS で 2 回洗浄後、二次抗体 goat anti-rat secondary

antibody conjugated with HRP (Histofine[®] Simple Stain[™] MAX PO (Rat), Nichirei Biosciences Inc., code 414311F) に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後, diaminobenzidine (DAB) 基質キット (Histofine SAB-PO (M) Kit, Nichirei Biosciences Inc., code 425011) に浸して常温で 5 分発色した。TBS で 2 回洗浄後, ティッシュ・テック 2 倍カラッツツイヘマトキシリン (Sakura Finetek Co., Ltd., code 8653) に 1.5 分浸し, 流水水洗(色だし)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, 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.; code FX00500) を用いて封入した。

2.2.4.3 リンパ節の免疫組織化学染色(B220)

抗原賦活化液 pH6 クエン酸緩衝液 (Dako REAL[™] Target Retrieval Solution, Dako, code S2031, dilution 1:10) を用いて 95℃温浴処理を 20 分行った。常温で 20 分自然冷却後に水洗し, 0.3%過酸化水素水に 10 分浸した。TBS で 2 回洗浄後, 一次抗体 purified rat monoclonal CD45R/B220 antibody (clone RA3-6B2; Abgent, San Diego, CA, USA; code WTA1265, dilution 1:3000) に常温で 60 分浸した。TBS で 2 回洗浄後, 二次抗体 biotinylated rabbit anti-rat IgG secondary antibody (Vector Laboratories, code BA-4000, dilution 1:200) に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後, 検出試薬 VECTASTAIN[®] Elite[®] ABC Kit (Vector Laboratories, code PK-6100) に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後, DAB 基質キット (Histofine SAB-PO (M) Kit, Nichirei Biosciences Inc., code 425011) に浸して常温で 5 分発色した。TBS で 2 回洗浄後, ティッシュ・テック 2 倍カラッツツイヘマトキシリン (Sakura Finetek Co., Ltd., code 8653) に 1.5 分浸し, 流水水洗(色だし)を 10 分行った。PNAd に対する免疫組織化学染色と同様に分別・脱水・透徹・封入した。

2.2.4.4 リンパ節の免疫組織化学染色(CD3)

抗原賦活化液 pH9 (Nichirei Biosciences Inc., code 415211, dilution 1:10) を用いて 95℃温浴処理を 20 分行った。常温で 20 分自然冷却後に水洗し, 0.3%過酸化水素水に 10 分浸した。TBS で 2 回洗浄後, 一次抗体 rabbit monoclonal CD3 gamma antibody (clone EPR4517; GeneTex, Irvine, CA; code GTX62682, dilution 1:1500) に常温で 60 分浸した。TBS で 2 回洗浄後, 二次抗体 goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with HRP (Histofine[®] Simple Stain[™] Mouse MAX PO (R), Nichirei Biosciences Inc., code 414341F) に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後, DAB 基質キット (Histofine SAB-PO (M) Kit, Nichirei Biosciences Inc., code 425011) に浸して常温で 5 分発色した。TBS で 2 回洗浄後, ティッシュ・テック 2 倍カラッツツイヘマトキシリン (Sakura Finetek Co., Ltd., code

8653)に 1.5 分浸し、流水水洗(色だし)を 10 分行った。PNAd に対する免疫組織化学染色と同様に分別・脱水・透徹・封入した。

2.2.4.5 リンパ節の免疫組織化学染色(CD11c)

タンパク分解酵素プロテイナーゼ K 溶液(Proteinase K, Dako, code S3004)に常温で 5 分浸した。水洗し、0.3%過酸化水素水に 10 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、一次抗体 hamster monoclonal CD11c antibody (clone N418, GeneTex, code GTX74940, dilution 1:300)に 4℃で一晩浸した。TBS で 2 回洗浄後、二次抗体 biotinylated goat anti-hamster IgG secondary antibody (Vector Laboratories, code BA-9100, dilution 1:200)に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、検出試薬 VECTASTAIN® *Elite*® ABC Kit (Vector Laboratories, code PK-6100)に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、チラミドシグナル増幅キット TSA® Plus Biotin Kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA; code NEL749A001)に常温で 5 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、再度検出試薬 VECTASTAIN® *Elite*® ABC Kit (Vector Laboratories, code PK-6100)に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、DAB 基質キット (Histofine SAB-PO (M) Kit, Nichirei Biosciences Inc., code 425011)に浸して常温で 5 分発色した。TBS で 2 回洗浄後、ティッシュ・テック 2 倍カラッツツイヘマトキシリン (Sakura Finetek Co., Ltd., code 8653)に 1.5 分浸し、流水水洗(色だし)を 10 分行った。PNAd に対する免疫組織化学染色と同様に分別・脱水・透徹・封入した。

2.2.4.6 リンパ節の免疫組織化学染色(PECAM-1/CD31)

抗原賦活化液 pH9 (Nichirei Biosciences Inc., code 415211, dilution 1:10)を用いて 95℃ 温浴処理を 20 分行った。常温で 20 分自然冷却後に水洗し、0.3%過酸化水素水に 10 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、一次抗体 purified rabbit anti-mouse polyclonal PECAM-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., code sc-1506-R, dilution 1:600)に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、二次抗体 goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with HRP (Histofine® Simple Stain™ Mouse MAX PO (R), Nichirei Biosciences Inc., code 414341F) に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、DAB 基質キット (Histofine SAB-PO (M) Kit, Nichirei Biosciences Inc., code 425011)に浸して常温で 5 分発色した。TBS で 2 回洗浄後、ティッシュ・テック 2 倍カラッツツイヘマトキシリン (Sakura Finetek Co., Ltd., code 8653)に 1.5 分浸し、流水水洗(色だし)を 10 分行った。PNAd に対する免疫組織化学染色と同様に分別・脱水・透徹・封入した。

2.2.4.7 リンパ節の免疫組織化学染色(LYVE-1)

抗原賦活化液 pH9 (Nichirei Biosciences Inc., code 415211, dilution 1:10)を用いて 95℃ 温浴処理を 20 分行った。常温で 20 分自然冷却後に水洗し、0.3%過酸化水素水に 10

分浸した。TBS で 2 回洗浄後、一次抗体 purified rabbit anti-mouse polyclonal LYVE-1 antibody (AngioBio, Del Mar, CA, USA; code 11-034, dilution 1:100) に常温で 60 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、二次抗体 goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with HRP (Histofine® Simple Stain™ Mouse MAX PO (R), Nichirei Biosciences Inc., code 414341F) に常温で 30 分浸した。TBS で 2 回洗浄後、DAB 基質キット (Histofine SAB-PO (M) Kit, Nichirei Biosciences Inc., code 425011) に浸して常温で 5 分発色した。TBS で 2 回洗浄後、ティッシュ・テック 2 倍カラッツツィヘマトキシリン (Sakura Finetek Co., Ltd., code 8653) に 1.5 分浸し、流水水洗(色だし)を 10 分行った。PNAd に対する免疫組織化学染色と同様に分別・脱水・透徹・封入した。

2.2.5 リンパ節の組織学的解析

組織スライドのデジタルデータを用いて、HE 染色の最大切片での移植リンパ節および対側の単径リンパ節の面積を計測した。

2.2.5.1 リンパ節における HEV の定量化

PNAd に対する免疫組織化学染色のデジタルデータを画像閲覧ソフトウェア (NDP.view2, Hamamatsu Photonics K.K.) 上で観察し、DAB で茶色に染色された外周 100 μm^2 以上の管腔構造をマーキングすることで、その切片における総 HEV 数をカウントした(図 19)。過去のマウスモデルの報告 (Qian et al., 2006) に準じて、そのうち内腔 80 μm^2 以上の管腔構造を機能的な拡張 HEV と定義し、その切片における拡張 HEV 数をカウントした。また、過去の報告 (Lee et al., 2012) に準じて、各切片における総 HEV 数に占める拡張 HEV 数の割合を計算した。

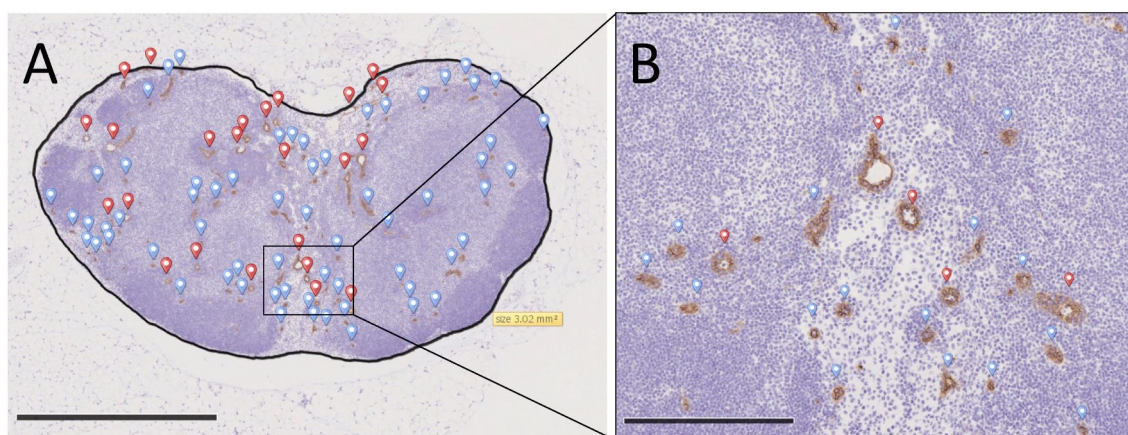


図 19. マウス正常単径リンパ節の PNAd に対する免疫組織化学染色

A. 弱拡大, Bar. 1 mm, B. 強拡大, Bar. 250 μm
赤マーカー. 拡張 HEV, 青マーカー. 非拡張 HEV

2.2.5.2 リンパ節における免疫細胞の定量化

B220 (B 細胞), CD3 (T 細胞), CD11c (樹状細胞) に対する免疫組織化学染色のデジタルデータを画像閲覧ソフトウェア (NDP.view2, Hamamatsu Photonics K.K.) 上で観察し, リンパ節全体が画角に収まる 50 倍拡大で Joint Photographic Experts Group (JPEG) 画像として出力した (図 20A)。過去の報告 (Joseph et al., 2014) を参考に, DAB で茶色染色された B 細胞, T 細胞, 樹状細胞のリンパ節に占める面積の割合を画像解析ソフトウェア ImageJ (version 1.52; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて以下の方法で計測した。

JPEG 画像でリンパ節の外周を“Freehand selections”で囲み, “Region of interest (ROI) Manager”に登録した。“Split Channels”コマンドにより, 赤, 緑, 青の独立した画像に分割した。このうち最もコントラストのよい青画像 (図 20B) を用いて, “Threshold”コマンドにより, B220, CD3 は最小値 0, 最大値 140, CD11c は最小値 0, 最大値 130 の閾値設定で色を二値化した (図 20C)。ROI における“Analyze Particles”コマンドにより, Size 4-Infinity, Circularity 0.00-1.00 の設定で, %Area を計測した。

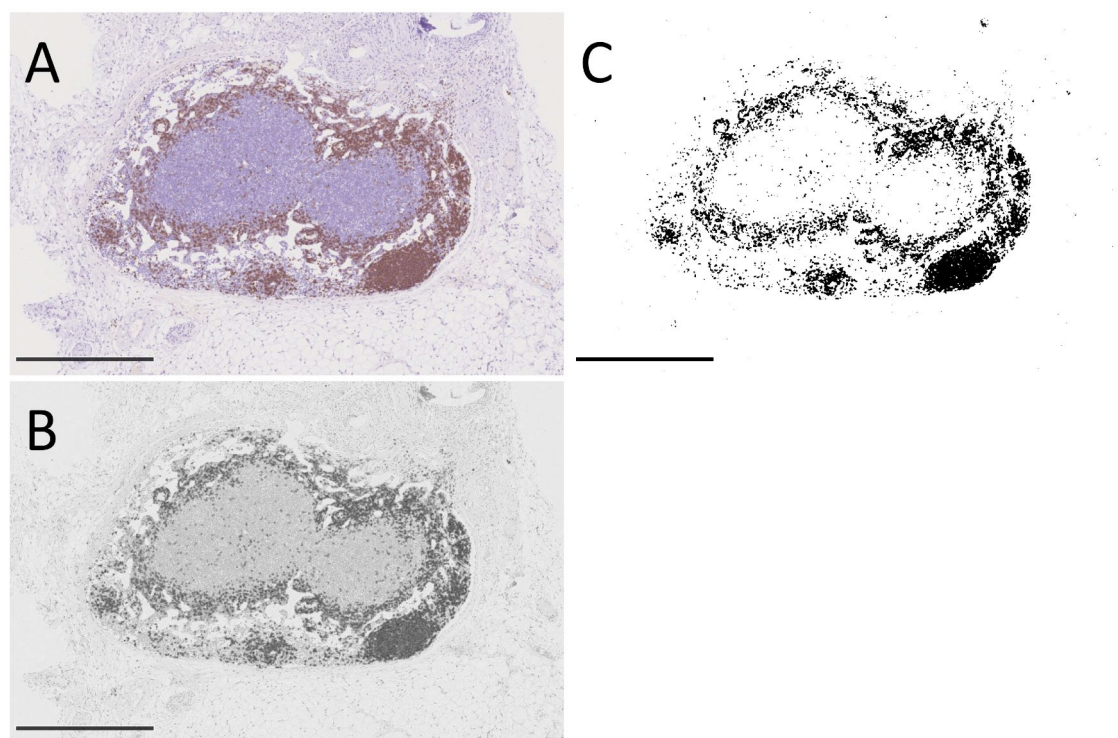


図 20. マウス血管柄付きリンパ節移植モデルの移植リンパ節

A. B220 に対する免疫組織化学染色

B. ImageJ を用いてチャンネル分割後の青画像

C. ImageJ を用いて閾値設定(最小値 0, 最大値 140) で二値化した画像

Bars. 500 μ m

2.2.6 統計学的検討

統計解析には、統計ソフトウェア JMP (version 14.1.0, SAS Institute Inc.) を用いた。結果の数値は、中央値(四分位範囲 interquartile range, IQR) で表した。各群における輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節の2群間の比較には、Shapiro-Wilk の正規性検定後に、Wilcoxon 順位和検定を用いた。

各群の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と対側の単径リンパ節の間の多群間の比較には、Shapiro-Wilk の正規性検定後に Steel-Dwass 検定を用いた。両側 $P < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

箱ひげ図は、箱が第一四分位数($Q_{1/4}$)から第三四分位数($Q_{3/4}$)までの IQR を表し、箱の中の水平線が中央値を表した。閉区間 $[Q_{1/4} - 1.5 \text{ IQR}, Q_{3/4} + 1.5 \text{ IQR}]$ の外にある数値は外れ値として個別に黒丸で表し、外れ値を除いた数値の最大値・最小値をそれぞれ箱の両側に出たひげの端として表した。

2.3 結果

2.3.1 モデル作製手技

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。本モデル作製の手術時間は、一人で行って Group 1 で約 25 分, Group 2 で約 30 分, Group 3 で約 15 分を要した。

2.3.2 移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通の検討

術後4週目のパテントブルー色素による移植リンパ節の染色は, Group 1 の 13/20 例 (65.0%), Group 2 の 11/15 例 (66.7%), Group 3 の 7/15 例 (46.7%) で認め, それぞれ移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通ありと判定した。

2.3.3 免疫組織化学染色の抗体条件検討および抗原特異性の検討(PNAd)

条件9の染色性が最も優れていたため, 条件9で本染色を行った。条件9での HEV に対する PNAd の免疫組織化学染色を, 内皮細胞に対する PECAM-1/CD31 の免疫組織化学染色, リンパ管内皮細胞に対する LYVE-1 の免疫組織化学染色と比較した(図 21)。

PNAd の免疫組織化学染色で傍皮質領域に茶色に染色された管腔構造(図 21B)は, 内皮細胞に対する PECAM-1/CD31 の免疫組織化学染色で染色された管腔構造(図 21C)に含まれたが, リンパ管内皮細胞に対する LYVE-1 の免疫組織化学染色では染色されなかった(図 21D)。

内皮細胞に対する PECAM-1/CD31 の免疫組織化学染色で脂肪組織中に染色された管腔構造(図 21C)は, PNAd および LYVE-1 の免疫組織化学染色では染色されなかった(図 21B, D)。

この結果から, HEV ではない毛細血管は, PNAd の免疫組織化学染色では染色されない, つまり PNAd の免疫組織化学染色の HEV に対する抗原特異性が確認された。

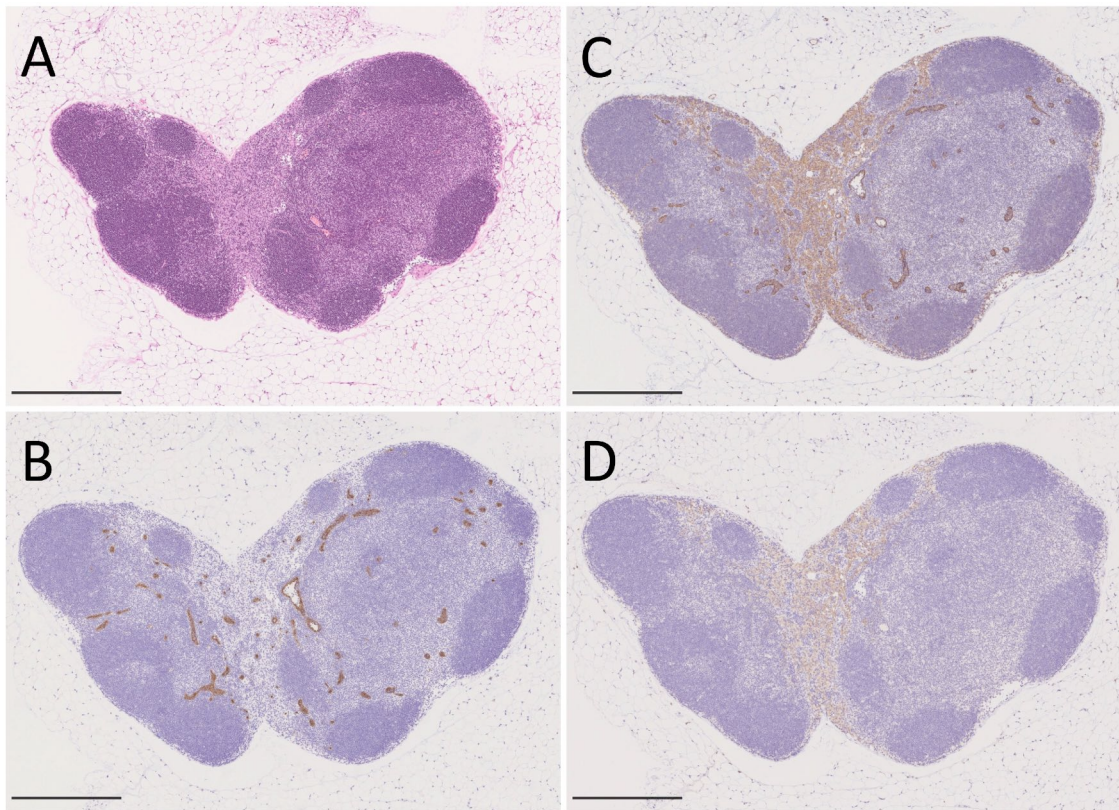


図 21. マウス正常単径リンパ節

A. HE 染色

B. PNA に対する免疫組織化学染色

C. PECAM-1/CD31 に対する免疫組織化学染色

D. LYVE-1 に対する免疫組織化学染色

Bars. 500 μ m

なお、血管やリンパ管はリンパ節内の髄質に偏在しているが、球体ではないリンパ節をパラフィン包埋組織標本から図 21 のように同じ面で薄切することは困難であったため、内皮細胞に対する PECAM-1/CD31 およびリンパ管内皮細胞に対する LYVE-1 の免疫組織化学染色の定量化は行わなかった。

2.3.4 リンパ節の組織学的検討

全例において、HE 染色で移植リンパ節を認め、虚血や壊死を示唆する所見を認めなかった。マウスリンパ節移植モデルにおけるリンパ節の大きさ(図 22)は、対側の単径リンパ節は 2.76 (2.15 - 3.88) mm^2 であった。

Group 1 は VLN (+) が 0.33 (0.21 - 0.46) mm^2 に対して、VLN (-) が 0.75 (0.34 - 2.13) mm^2 であった ($P=0.048$)。

Group 2 は non-VLN (+) が 0.23 (0.21 - 0.45) mm^2 に対して、non-VLN (-) が 0.46 (0.11 - 0.93) mm^2 であった ($P=0.84$)。

Group 3 は FLN (+) が 0.50 (0.21 - 0.93) mm^2 に対して、FLN (-) が 0.30 (0.25 - 0.47) mm^2 であった ($P=0.52$)。

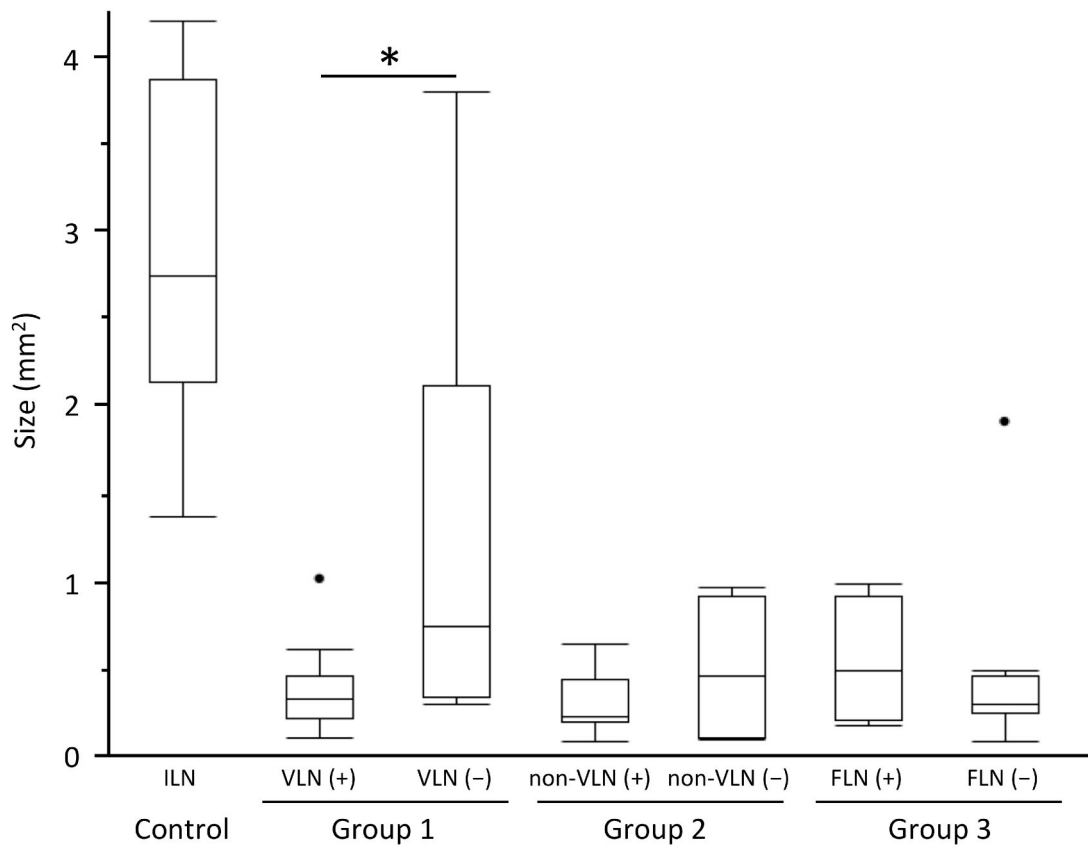


図 22. マウスリンパ節移植モデルにおけるリンパ節の大きさ

FLN. free non-vascularized lymph node, ILN. inguinal lymph node, VLN. vascularized lymph node, (+) . with afferent lymphatic reconnection, (-) . without afferent lymphatic reconnection,

*. $P < 0.05$ (Group 内の Wilcoxon 順位和検定)

2.3.4.1 リンパ節における HEV の組織学的検討

Group 1 の有茎血管柄付きリンパ節移植群では、輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節 VLN (+)において、背の高い内皮細胞が特徴である HEV の内腔が拡張した所見が観察された(図 23A, B)。

一方、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節 VLN (-)においては、PNA_d に対する免疫組織化学染色の染色性が落ち、HEV の内腔が狭小化した所見が観察された(図 23C, D)。

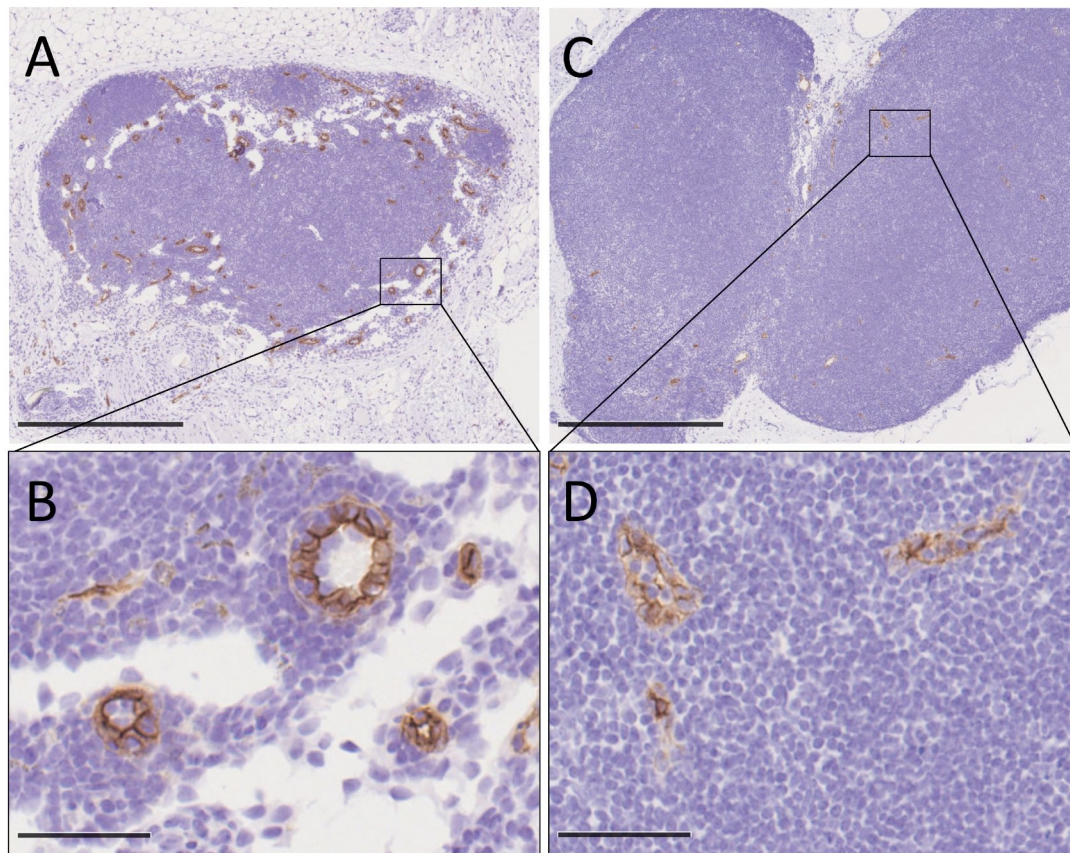


図 23. Group 1 の移植リンパ節の PNA_d に対する免疫組織化学染色

A, B. 輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節, VLN (+)

C, D. 輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節, VLN (-)

A, C. Bars. 500 μ m, B, D. Bars. 50 μ m

Group 2 の有茎血管柄結紮リンパ節移植群では、輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節 non-VLN (+) において、HEV の内腔が狭小化した所見が観察された (図 24A, B)。

一方、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節 non-VLN (-) においては、PNAd に対する免疫組織化学染色の染色性が落ち、HEV の内腔が狭小化した所見が観察された (図 24C, D)。

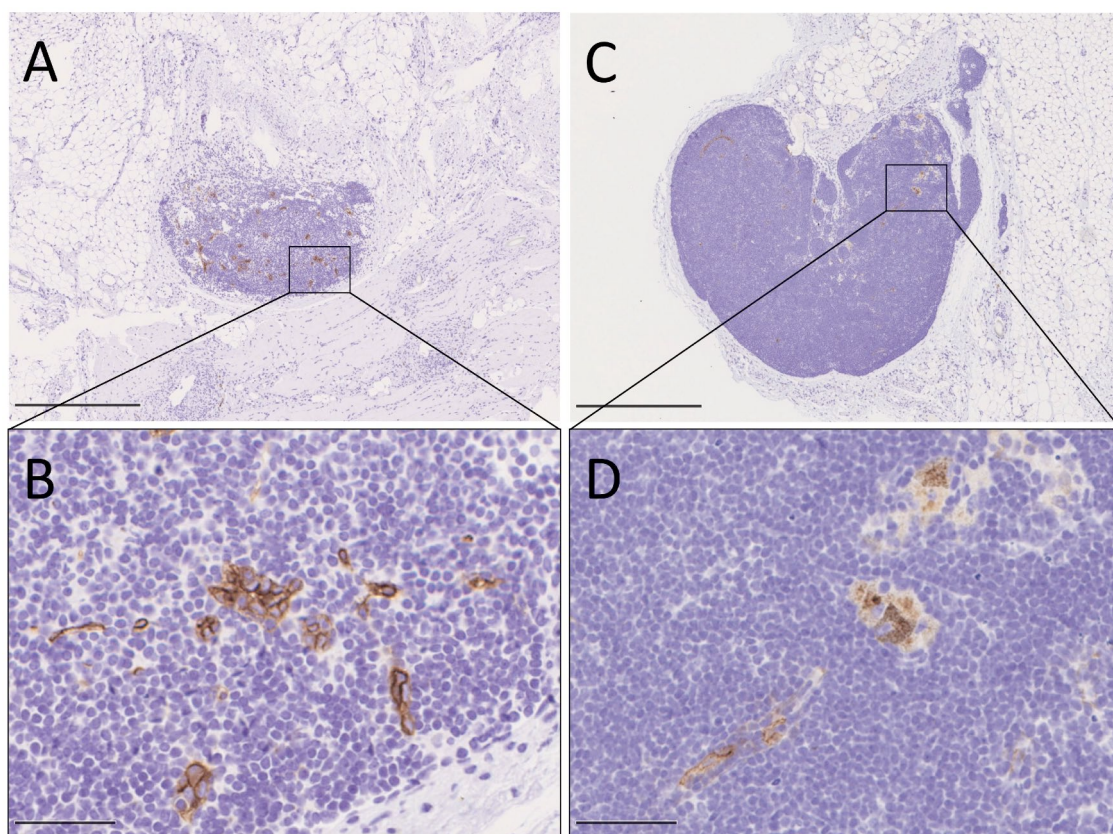


図 24. Group 2 の移植リンパ節の PNAd に対する免疫組織化学染色

A, B. 輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節, non-VLN (+)

C, D. 輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節, non-VLN (-)

A, C. Bars. 500 μm, B, D. Bars. 50 μm

Group 3 の遊離リンパ節移植群では, 輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節 FLN (+) において, HEV の内腔が狭小化した所見が観察された (図 25A, B)。

一方, 輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節 FLN (-) においては, PNAd に対する免疫組織化学染色の染色性が落ち, HEV の内腔が狭小化した所見が観察された (図 25C, D)。

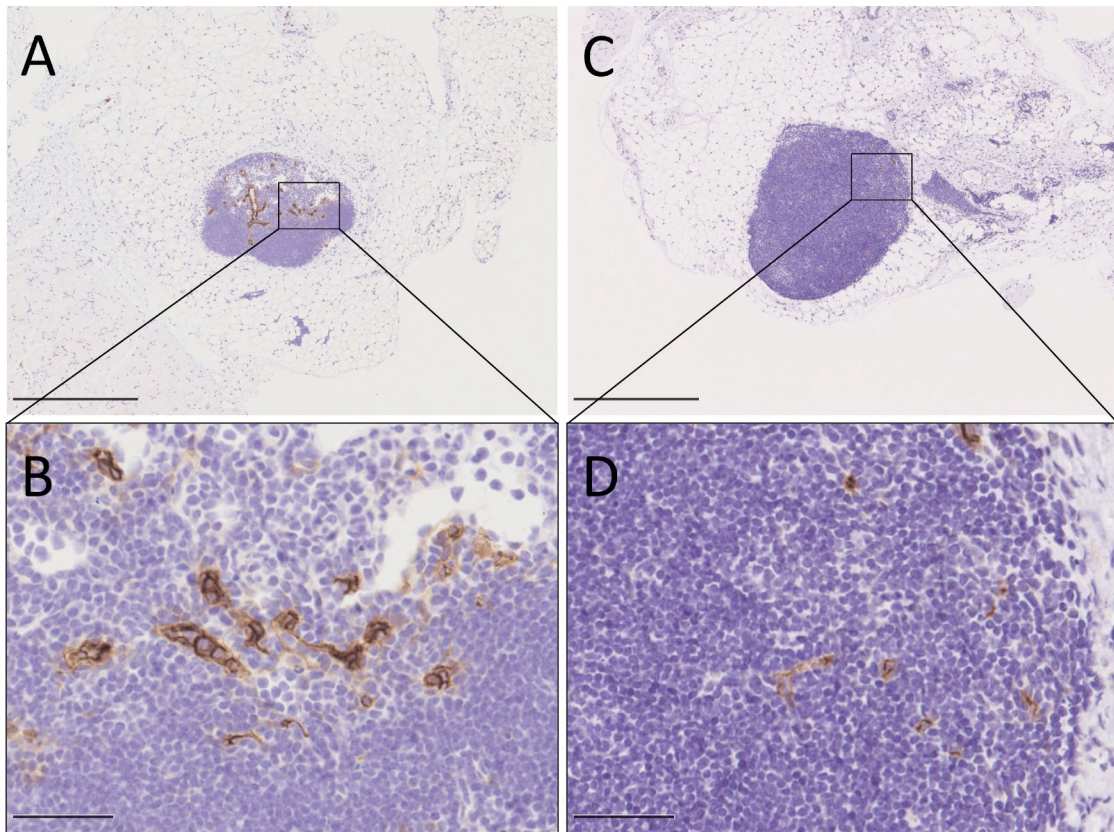


図 25. Group 3 の移植リンパ節の PNAd に対する免疫組織化学染色

A, B. 輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節, FLN (+)

C, D. 輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節, FLN (-)

A, C. Bars. 500 μm, B, D. Bars. 50 μm

2.3.4.2 リンパ節における HEV 数の検討

マウスリンパ節移植モデルのリンパ節における総 HEV 数/mm²(図 26)は、対側の単径リンパ節は 22.9 (21.3-27.6)であった。

Group 1 は VLN (+) が 50.9 (36.9-61.0)に対して、VLN (-) が 14.6 (5.8-24.4)であった ($P=0.002$)。

Group 2 は non-VLN (+) が 54.3 (18.1-78.6)に対して、non-VLN (-) が 29.8 (4.5-63.4)であった ($P=0.21$)。

Group 3 は FLN (+) が 49.7 (20.1-53.9)に対して、FLN (-) が 12.3 (7.3-15.9)であった ($P=0.009$)。

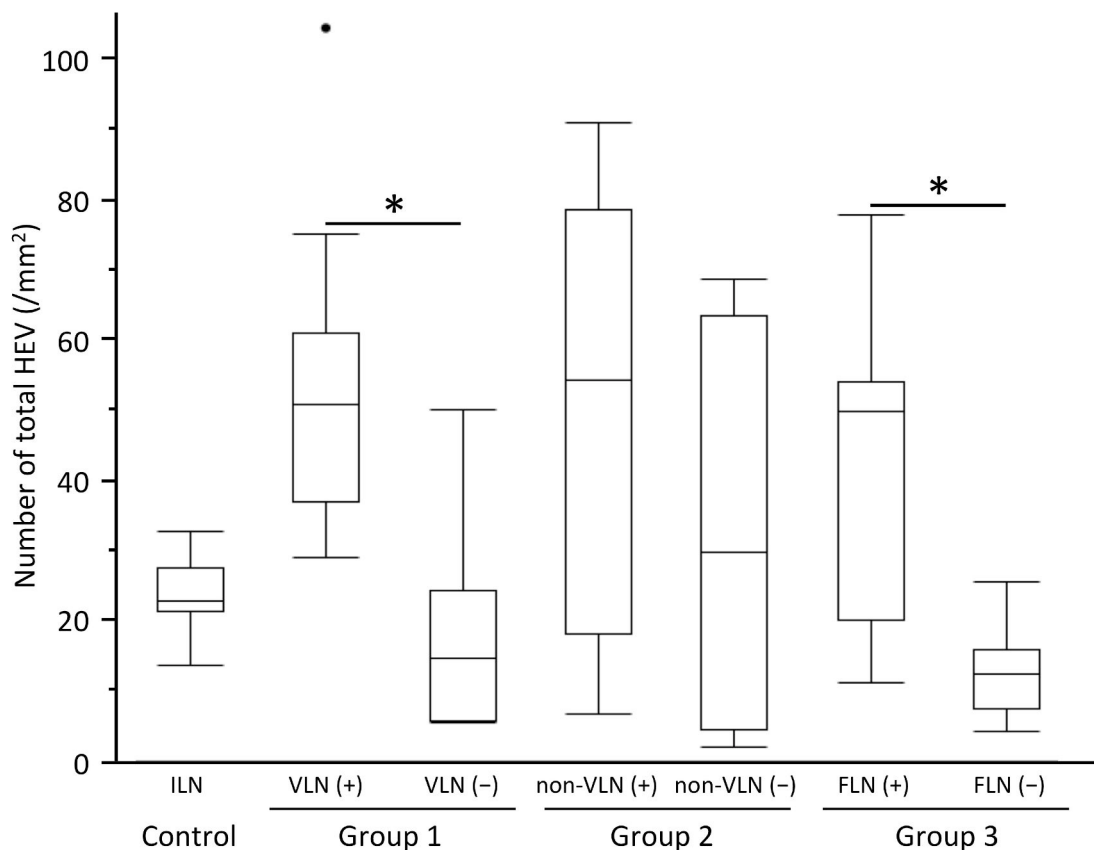


図 26. マウスリンパ節移植モデルのリンパ節における総 HEV 数/mm²

FLN. free non-vascularized lymph node, ILN. inguinal lymph node, VLN. vascularized lymph node, (+) . with afferent lymphatic reconnection, (-) . without afferent lymphatic reconnection, *. $P < 0.05$ (Group 内の Wilcoxon 順位和検定)

各群の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と対側の単径リンパ節の間の多群間の比較では、リンパ節における総 HEV 数/mm²は、Group 1 の VLN (+) が、対側の単径リンパ節よりも有意に多かった ($P < 0.001$)。

マウスリンパ節移植モデルのリンパ節における拡張 HEV 数/mm²(図 27)は、対側の単径リンパ節は 4.7 (3.4-7.3)であった。

Group 1 は VLN (+)が 16.5 (9.7-22.9)に対して、VLN (-)が 2.4 (0-2.8)であった($P < 0.001$)。

Group 2 は non-VLN (+)が 2.5 (0-14.6)に対して、non-VLN (-)が 4.1 (0.3-9.1)であった($P = 0.89$)。

Group 3 は FLN (+)が 2.0 (0-16.7)に対して、FLN (-)が 0 (0-1.5)であった($P = 0.08$)。

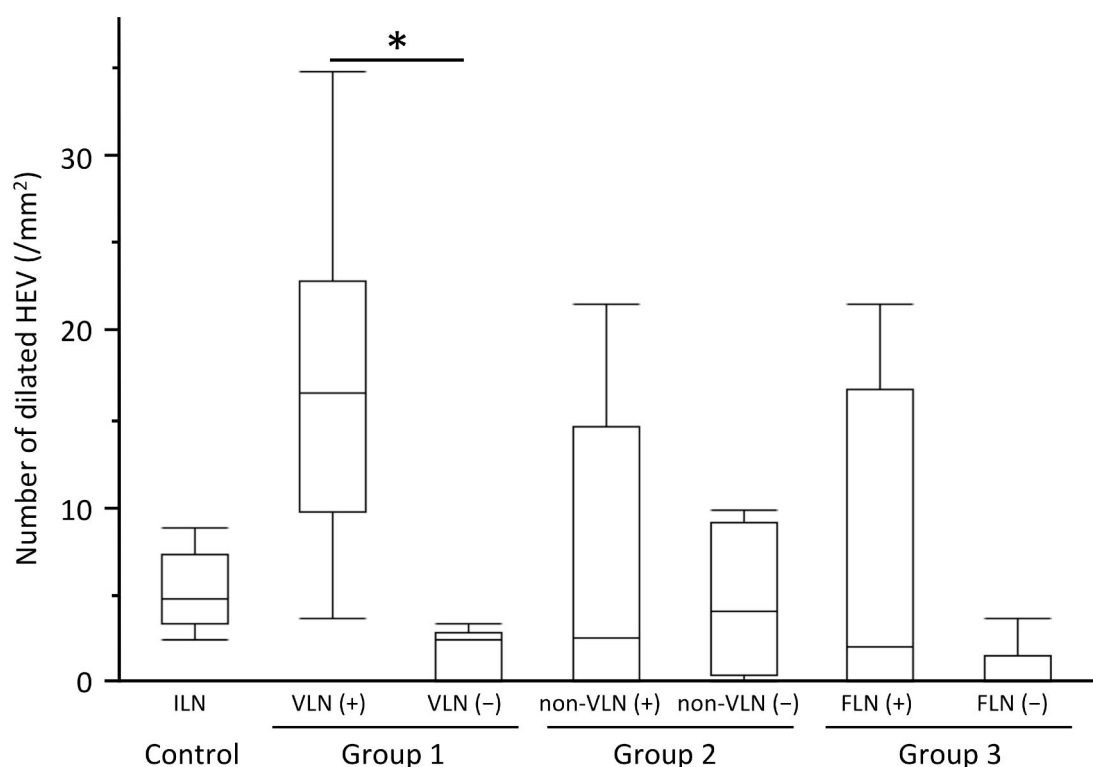


図 27. マウスリンパ節移植モデルのリンパ節における拡張 HEV 数/mm²

FLN. free non-vascularized lymph node, ILN. inguinal lymph node, VLN. vascularized lymph node, (+). with afferent lymphatic reconnection, (-). without afferent lymphatic reconnection, *. $P < 0.05$ (Group 内の Wilcoxon 順位和検定)

各群の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と対側の単径リンパ節の間の多群間の比較では、リンパ節における拡張 HEV 数/mm²は、Group 1 の VLN (+)が、対側の単径リンパ節よりも有意に多かった($P = 0.006$)。

2.3.4.3 リンパ節における総 HEV 数に占める拡張 HEV 数の割合の検討

マウスリンパ節移植モデルのリンパ節における拡張 HEV 数／総 HEV 数(図 28)は、対側の単径リンパ節は 0.21 (0.15-0.31) であった。

Group 1 は VLN (+) が 0.33 (0.25-0.41) に対して、VLN (-) が 0.07 (0-0.14) であった ($P = 0.01$)。

Group 2 は non-VLN (+) が 0.05 (0-0.19) に対して、non-VLN (-) が 0.13 (0.03-0.14) であった ($P = 0.95$)。

Group 3 は FLN (+) が 0.10 (0-0.21) に対して、FLN (-) が 0 (0-0.09) であった ($P = 0.19$)。

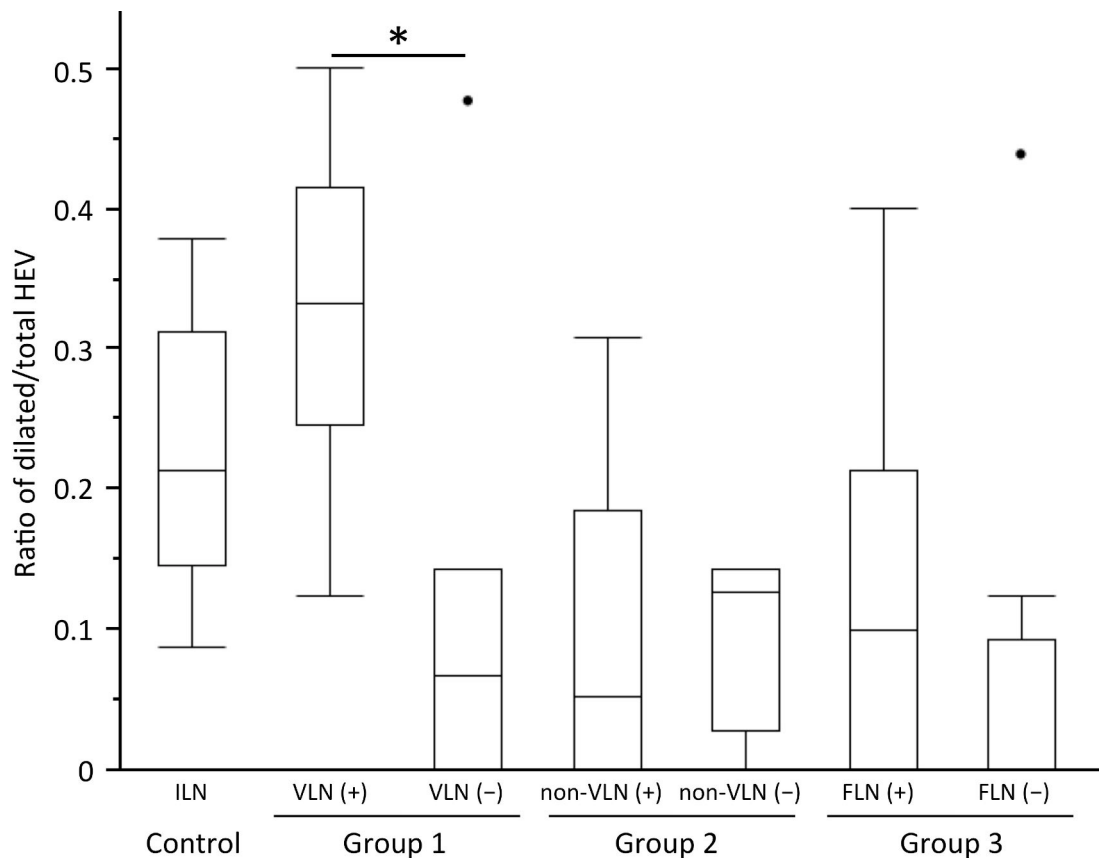


図 28. マウスリンパ節移植モデルのリンパ節における拡張／総 HEV 数

FLN. free non-vascularized lymph node, ILN. inguinal lymph node, VLN. vascularized lymph node, (+) . with afferent lymphatic reconnection, (-) . without afferent lymphatic reconnection, *. $P < 0.05$ (Group 内の Wilcoxon 順位和検定)

各群の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と対側の単径リンパ節の間の多群間の比較では、リンパ節における拡張 HEV 数／総 HEV 数は、Group 1 の VLN (+) が、Group 2 の non-VLN (+) および Group 3 の FLN (+) よりも有意に高かった ($P = 0.004$ and $P = 0.049$, respectively)。

2.3.4.4 リンパ節における免疫細胞の組織学的検討

Group 1 の有茎血管柄付きリンパ節移植群では、輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節において、B220 に対する免疫組織化学染色で、皮質における B 細胞の集積する明瞭な濾胞構造を認めた(図 29A)。CD3 に対する免疫組織化学染色で、傍皮質領域における T 細胞の集積する染色を認めた(図 29B)。CD11c に対する免疫組織化学染色で、散在する樹状細胞の点状の染色を認めた(図 29C)。

一方、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節においては、B220 に対する免疫組織化学染色で、皮質における B 細胞の集積する濾胞構造を認めなかった(図 29D)。CD3 に対する免疫組織化学染色で、傍皮質領域における T 細胞の集積する染色を認めた(図 29E)。CD11c に対する免疫組織化学染色で、傍皮質領域に散在する樹状細胞の点状の染色を認めた(図 29F)。

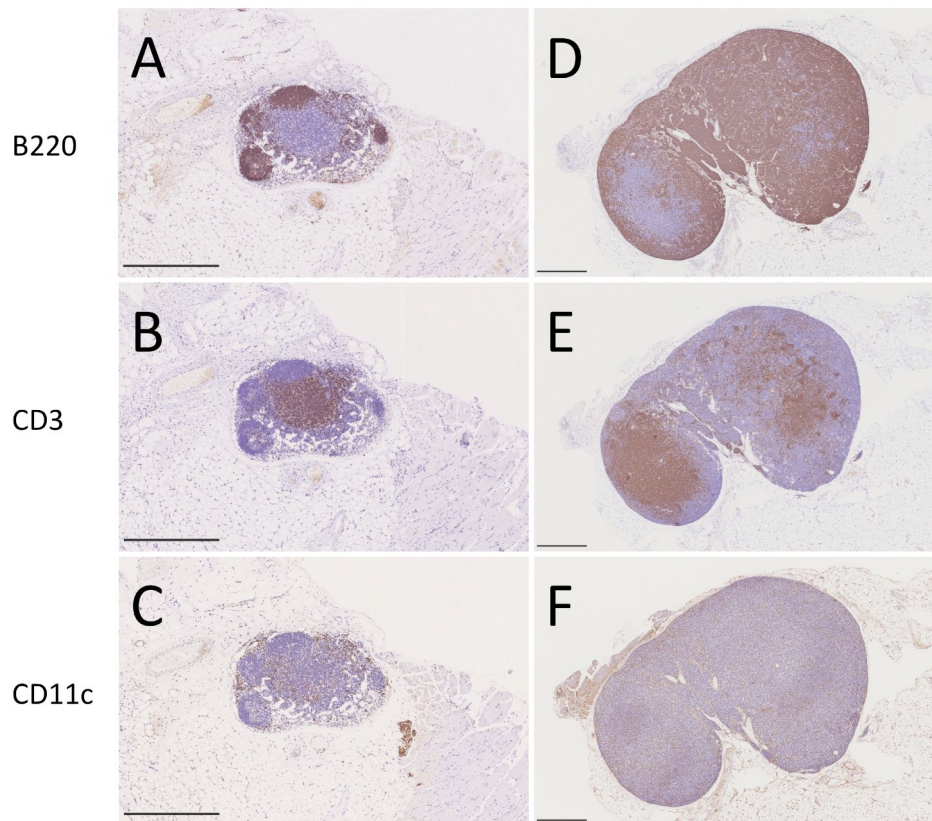


図 29. Group 1 の移植リンパ節の B220, CD3, CD11c に対する免疫組織化学染色

A, B, C. 輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節, VLN (+)

D, E, F. 輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節, VLN (-)

Bars. 500 μ m

Group 2 の有茎血管柄結紮リンパ節移植群では、輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節において、B220 に対する免疫組織化学染色で、皮質における B 細胞の集積する濾胞構造を認めた(図 30A)。CD3 に対する免疫組織化学染色で、傍皮質領域における T 細胞の集積する染色を認めた(図 30B)。CD11c に対する免疫組織化学染色で、散在する樹状細胞の点状の染色を認めた(図 30C)。

一方、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節においては、B220 に対する免疫組織化学染色で、皮質における B 細胞の集積する濾胞構造を認めなかった(図 30D)。CD3 に対する免疫組織化学染色で、傍皮質領域における T 細胞の集積する染色を認めた(図 30E)。CD11c に対する免疫組織化学染色で、傍皮質領域に散在する樹状細胞の点状の染色を認めた(図 30F)。

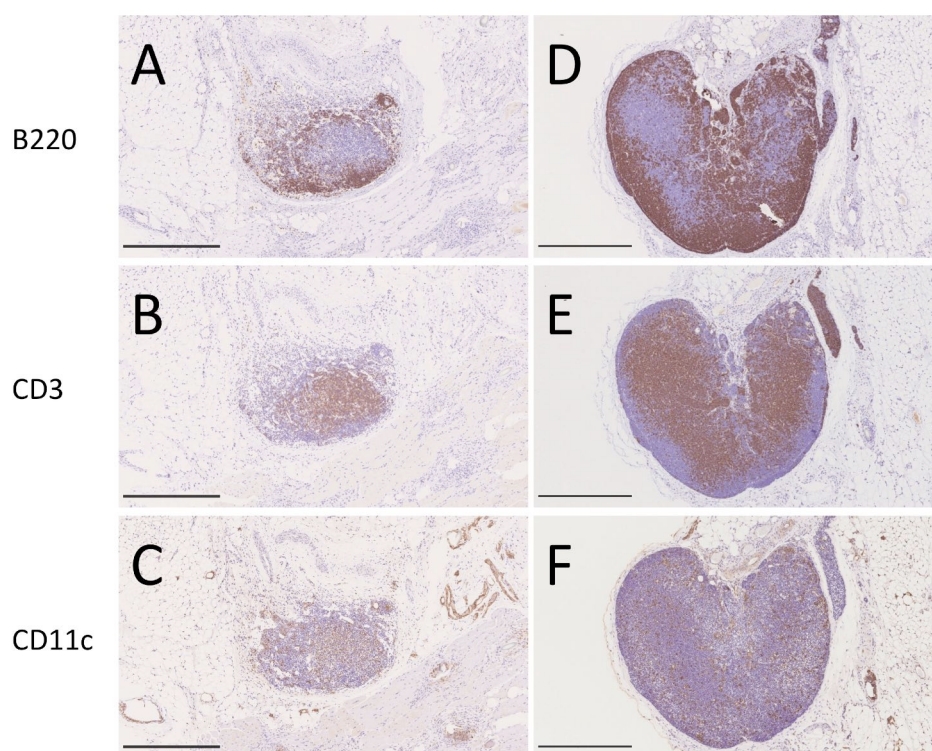


図 30. Group 2 の移植リンパ節の B220, CD3, CD11c に対する免疫組織化学染色

A, B, C. 輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節, non-VLN (+)

D, E, F. 輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節, non-VLN (-)

Bars. 500 μ m

Group 3 の遊離リンパ節移植群では、輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節において、B220 に対する免疫組織化学染色で、皮質における B 細胞の集積する濾胞構造を認めた(図 31A)。CD3 に対する免疫組織化学染色で、傍皮質領域における T 細胞の集積する染色を認めた(図 31B)。CD11c に対する免疫組織化学染色で、散在する樹状細胞の点状の染色を認めた(図 31C)。

一方、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節においては、B220 に対する免疫組織化学染色で、皮質における B 細胞の集積する濾胞構造を認めなかった(図 31D)。CD3 に対する免疫組織化学染色で、傍皮質領域における T 細胞の集積する染色を認めた(図 31E)。CD11c に対する免疫組織化学染色で、傍皮質領域に散在する樹状細胞の点状の染色を認めた(図 31F)。

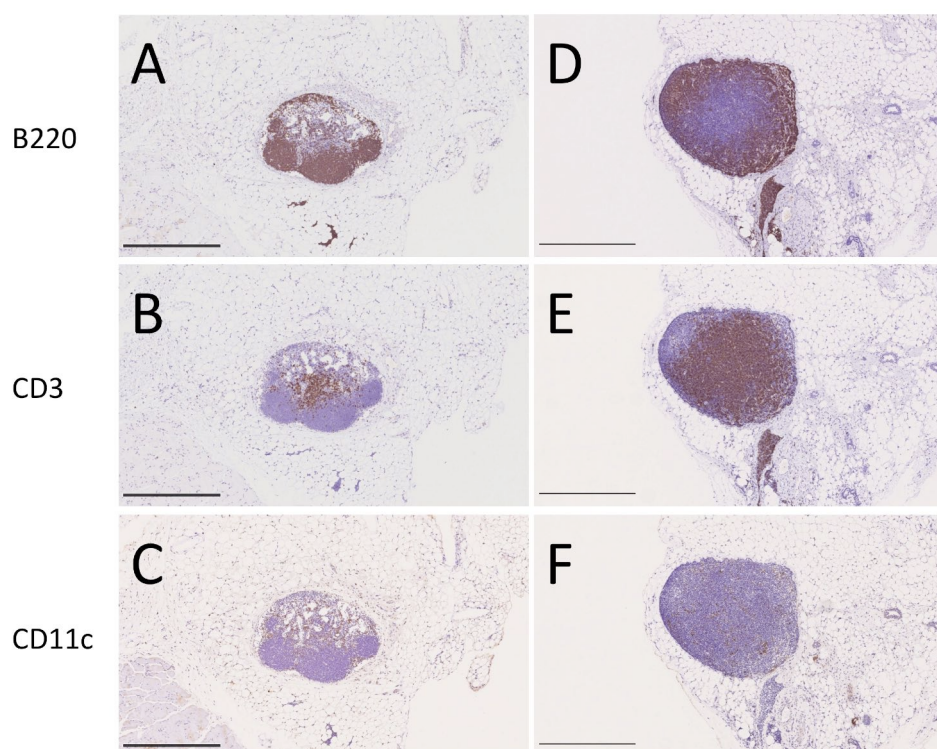


図 31. Group 3 の移植リンパ節の B220, CD3, CD11c に対する免疫組織化学染色

A, B, C. 輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節, FLN (+)

D, E, F. 輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節, FLN (-)

Bars. 500 μ m

2.3.4.5 リンパ節における B 細胞の割合の検討

マウスリンパ節移植モデルのリンパ節における B 細胞の割合 (図 32) は, 対側の単径リンパ節は 26.4 (24.1-31.9) であった。

Group 1 は VLN (+) が 27.9 (19.6-31.2) に対して, VLN (-) が 41.4 (19.7-53.2) であった ($P=0.11$)。

Group 2 は non-VLN (+) が 21.6 (13.2-38.7) に対して, non-VLN (-) が 34.4 (24.7-59.4) であった ($P=0.21$)。

Group 3 は FLN (+) が 36.2 (27.9-43.3) に対して, FLN (-) が 47.6 (29.8-61.9) であった ($P=0.18$)。

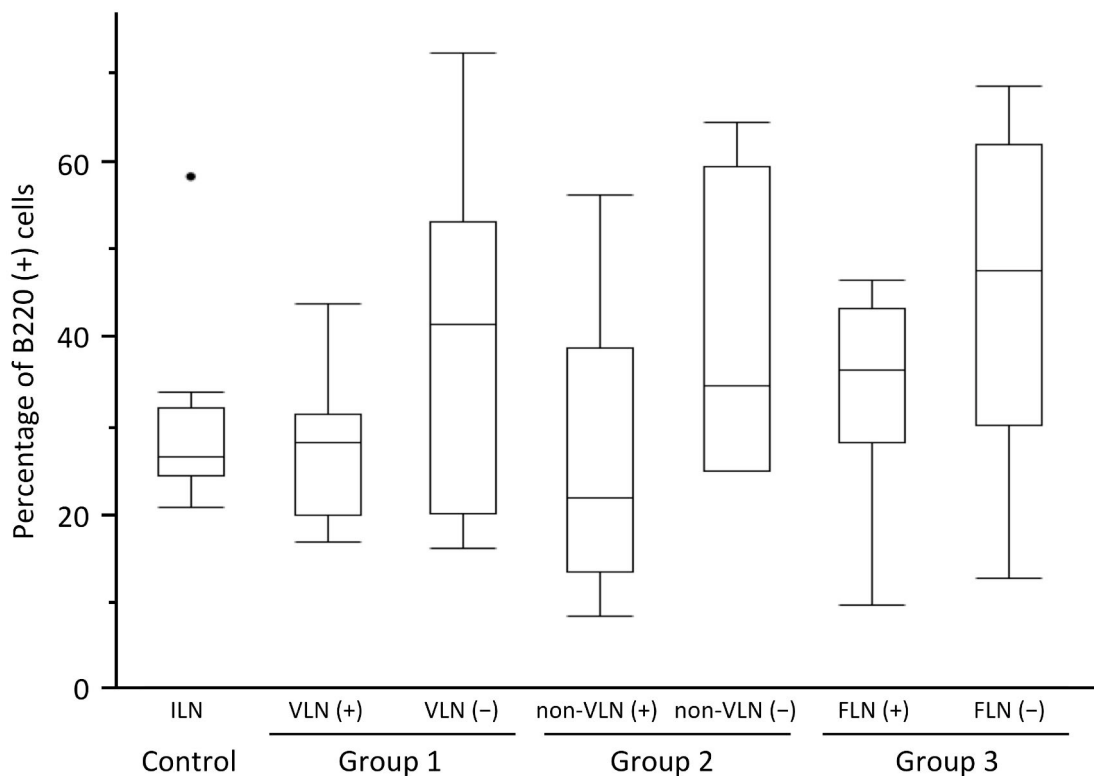


図 32. マウスリンパ節移植モデルのリンパ節における B 細胞の割合

FLN. free non-vascularized lymph node, ILN. inguinal lymph node, VLN. vascularized lymph node, (+) . with afferent lymphatic reconnection, (-) . without afferent lymphatic reconnection

リンパ節における B 細胞の割合において, 各群の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と対側の単径リンパ節の間の多群間の比較では, いずれの群間にも有意差はなかった。

2.3.4.6 リンパ節における T 細胞の割合の検討

マウスリンパ節移植モデルのリンパ節における T 細胞の割合 (図 33) は、対側の単径リンパ節は 21.6 (17.4-30.2) であった。

Group 1 は VLN (+) が 12.7 (3.5-23.2) に対して、VLN (-) が 24.0 (15.3-43.9) であった ($P=0.08$)。

Group 2 は non-VLN (+) が 24.6 (2.1-29.9) に対して、non-VLN (-) が 22.7 (2.2-55.0) であった ($P=0.65$)。

Group 3 は FLN (+) が 23.9 (12.0-32.2) に対して、FLN (-) が 35.7 (20.8-53.8) であった ($P=0.12$)。

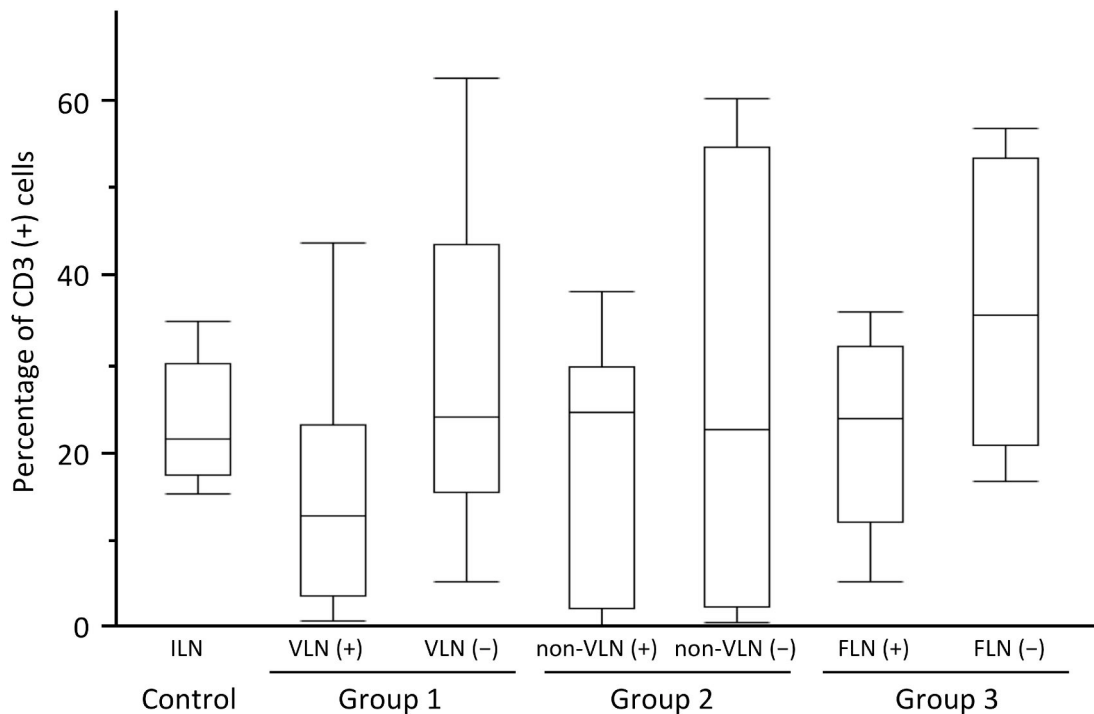


図 33. マウスリンパ節移植モデルのリンパ節における T 細胞の割合

FLN. free non-vascularized lymph node, ILN. inguinal lymph node, VLN. vascularized lymph node, (+). with afferent lymphatic reconnection, (-). without afferent lymphatic reconnection

リンパ節における T 細胞の割合において、各群の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と対側の単径リンパ節の間の多群間の比較では、いずれの群間にも有意差はなかった。

2.3.4.7 リンパ節における樹状細胞の割合の検討

マウスリンパ節移植モデルのリンパ節における樹状細胞の割合(図 34)は、対側の単径リンパ節は 0.12 (0.07-1.00) であった。

Group 1 は VLN (+) が 1.05 (0.61-2.89) に対して、VLN (-) が 0.90 (0.61-1.31) であった ($P=0.63$)。

Group 2 は non-VLN (+) が 0.89 (0.54-3.77) に対して、non-VLN (-) が 0.95 (0.28-1.84) であった ($P=0.65$)。

Group 3 は FLN (+) が 0.34 (0.13-1.79) に対して、FLN (-) が 0.23 (0.13-1.17) であった ($P=0.42$)。

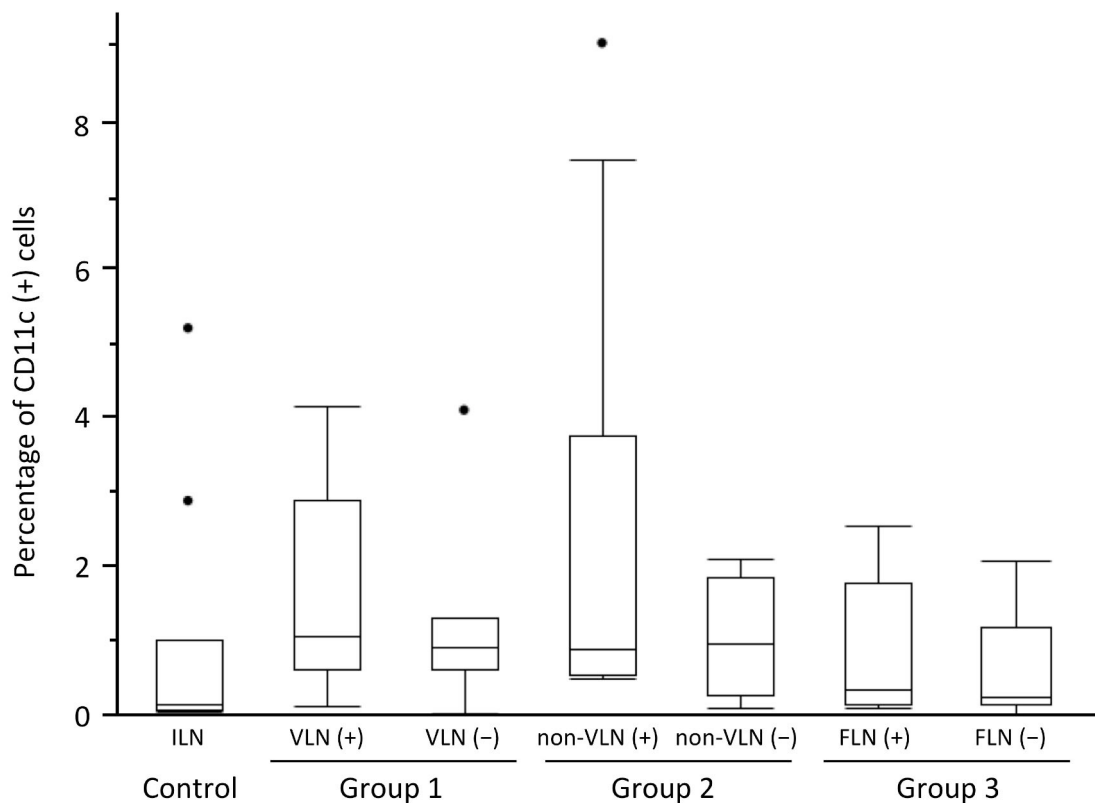


図 34. マウスリンパ節移植モデルのリンパ節における樹状細胞の割合

FLN. free non-vascularized lymph node, ILN. inguinal lymph node, VLN. vascularized lymph node, (+) . with afferent lymphatic reconnection, (-) . without afferent lymphatic reconnection

リンパ節における樹状細胞の割合において、各群の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と対側の単径リンパ節の間の多群間の比較では、いずれの群間にも有意差はなかった。

2.4 考察

2.4.1 移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通

本モデルの有茎リンパ節脂肪弁移植である Group 1 および Group 2 における術後 4 週での輸入リンパ管再疎通率はそれぞれ 65.0%, 66.7%であった。一方、遊離リンパ節移植である Group 3 は 46.7%であり、Group 1, 2 と比べ、低い輸入リンパ管再疎通率となった。これは、摘出した膝窩リンパ節を同膝窩に遊離リンパ節移植したマウスモデルにおいて、術後 4 週における輸入リンパ管再疎通率は 100%であったという報告 (Maeda et al., 2018b) とは異なる結果となった。

第一章において、有茎単径リンパ節脂肪弁を膝窩に移植するラットモデルの術後 5 週における輸入リンパ管再疎通率は、膝窩リンパ節郭清を行い、単径リンパ節脂肪弁の先端にある単径リンパ節を露出させた場合は 57%と有意に高かったという報告 (Rabson et al., 1982) から、有茎リンパ節脂肪弁移植において、血管の流入する門部側は、リンパ節が脂肪組織に覆われており、全周性にリンパ節を露出可能な血管柄のない遊離リンパ節移植に比べ、リンパ管の再疎通が起こりやすい面積が減少している状態と考えられる、と考察した。

この乖離は、本モデルの Group 3 では、異所に大きさ・形状の異なるリンパ節を移植するため、そら豆形の単径リンパ節の三次元的配置による輸入リンパ管断端の向きの違いなどが影響した可能性が考えられる。また、有茎リンパ節脂肪弁移植である Group 1 および Group 2 では、単径リンパ節周囲の脂肪弁を大腿二頭筋に 3 針縫合するため、単径リンパ節を膝窩に嵌め込み、膝窩を閉鎖するよう大腿二頭筋と脂肪組織を 1 針縫合する Group 3 よりも、移植リンパ節の固定性がよく、術後マウスが動いた際に、移植リンパ節の安静が保たれたことも一因と考えられる。

2.4.2 移植リンパ節の組織学的検討

2.4.2.1 移植リンパ節の再生

移植リンパ節の再生は、これまで主要な関心事の一つであったが、多くは血管柄のない遊離リンパ節移植モデルにおける報告である (Tammela et al., 2007)。過去のラットモデルにおいて、血管柄付き移植リンパ節は術後 4 週間正常な組織像を維持したが、遊離移植リンパ節は 4 週以内に徐々に線維化をきたしたとされる (Rabson et al., 1982)。しかし、過去のマウスモデル (Wolvers et al., 1999) やラットモデル (Ahrendt et al., 2008) において、血管柄のない遊離リンパ節移植や分割リンパ節移植でも、術後 3~8 週以内にリンパ節の再生が認められたとされる。この乖離は、移植リンパ節の数や移植部位、術後の組織採取時期などが影響した可能性が考えられる (Buettner and Bode, 2011; Tourani et al., 2016)。

本研究の血流のあるリンパ節移植である Group 1 において、輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節は、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節よりも有意に縮小したが、血流のないリンパ節移植である Group 2 および Group 3 においては、それぞれの輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節の大きさの間に有意差はなかった。この結果は、移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通のなかった場合、移植リンパ節への血流がそのリンパ節の大きさの保持に寄与したためと考えられる。

一方、移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通のあった場合、移植リンパ節への血流があったとしても、移植した単径リンパ節がレシピエントの膝窩リンパ節に近い大きさにリモデリングが起き、移植リンパ節への血流のない Group 2 および Group 3 と同程度に縮小した可能性が考えられた。それらの移植リンパ節の縮小の程度は、移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通のなかった場合と有意な差がなかったが、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節において移植リンパ節内の細胞密度が組織学的に高く観察され、輸入リンパ管再疎通のなかった場合のリンパ球の循環障害と考えられた。

2.4.2.2 移植リンパ節における HEV の再生

移植リンパ節における HEV の再生は、これまでラット (Ahrendt et al., 2008; Liu et al., 1992; Sasaki et al., 1994) やマウス (Mebius et al., 1993) などの動物モデルにおいて検討されてきた。

血管柄付き腸間膜リンパ節のラット同種皮下移植モデルにおいては、32 匹全例で移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通はなく、移植リンパ節は術後 1 ヶ月で HEV は不明瞭化、濾胞は減少し、術後 3 ヶ月で HEV はほぼ消失したとされる (Liu et al., 1992)。

同所での血管柄付きリンパ節移植に近い、マウス膝窩リンパ節の輸入リンパ管切断モデルにおいては、術後 7 日で HEV は平坦化、PNA_d の発現が低下および管腔側のみに限局し、*in vivo* リンパ球ホーミングアッセイでは術後 8 日でリンパ球ホーミングが 80% 以上低下したとされ、HEV の機能維持は輸入リンパ管からの液性因子や抗原提示細胞に依存している可能性が示唆された (Mebius et al., 1991b)。

一方、腸間膜リンパ節を分割リンパ節移植として腎皮質へ自家移植するラットモデルにおいては、術後 10 日で HEV が確認され、術後 28 日で正常に近い HEV を伴う移植リンパ節の再生が認められたとされる (Sasaki et al., 1994)。

免疫感作後の HEV リモデリングには、以下のような仮説が提唱されている (Liao and Ruddle, 2006)。免疫感作 2～5 日後のリモデリング期には、リンパ節内の HEV 数が増加し、B 細胞に起因するリンパ管新生が起きる。免疫感作 7～10 日後には、リンパ管新生がピークに達し、輸入リンパ管からの液性因子や抗原提示細胞により、背の高い立方体様の内皮細胞が特徴の成熟 HEV が再生する。

本研究では、輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節において、移植リンパ節を血流の有無で比較することができた。総 HEV 数/mm² および拡張 HEV 数/mm² は、Group 1 の VLN (+) が、対側の単径リンパ節よりも有意に多く、その割合である拡張 HEV 数／総 HEV 数は、Group 1 の VLN (+) が、Group 2 の non-VLN (+) および Group 3 の FLN (+) よりも有意に高いという結果を得た。

この結果は、移植した単径リンパ節は縮小するが、Group 1 の VLN (+) においてのみ、リンパ節内の機能的構造である HEV および拡張 HEV を多く保ったため、単位面積あたりの総 HEV 数および拡張 HEV 数として、有意差が出たと考えられた。それを拡張 HEV 数／総 HEV 数として表すと、Group 1 の VLN (+) は、対側の単径リンパ節と有意差はなく、Group 2 の non-VLN (+) および Group 3 の FLN (+) よりも有意に多くなったと捉えることができる。つまり、血流のあるリンパ節移植の方が、血流のないリンパ節移植に比べ、より多くの機能的な拡張した HEV を保持していたと考えられた。

以上の結果から、移植リンパ節がレシピエントのリンパ管と再疎通することに加え、移植リンパ節への血流もリンパ節の機能的 HEV 保持のために重要な要素であると考えられた。

我々は摘出した膝窩リンパ節を同膝窩に遊離リンパ節移植したマウスに B16F10 メラノーマ細胞を移植したモデルにおいて、B16F10 メラノーマ細胞を移植しただけのコントロールの正常膝窩リンパ節に比べ、術後 6 週(腫瘍移植後 2 週)の前転移状態で移植リンパ節における HEV の内腔が拡張していないことを示した(Maeda et al., 2018a)。血流のない遊離リンパ節移植において、移植リンパ節が一時的な乏血流状態に陥った結果、HEV が萎縮し、リンパ節内へのリンパ球の血管外遊走が障害され、獲得免疫反応が減衰した可能性を示した我々の報告(Maeda et al., 2018a)と合わせて考えると、血管柄付きリンパ節移植は機能的 HEV を保持することにより、移植リンパ節の免疫能の観点からも有用であることが示唆された。

2.4.2.3 移植リンパ節における免疫細胞

マウスのリンパ節における機能的 HEV の恒常性維持には、HEV の内皮細胞が発現するリンホトキシン β 受容体(Liao and Ruddle, 2006)を介したシグナル伝達が重要であり(Browning et al., 2005)、CD11c 陽性樹状細胞由来のリンホトキシンがそのシグナル伝達によるリンパ球ホーミングに重要である(Moussion and Girard, 2011)とされる。

第一章と同様に、いずれ 3 群においても、輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節は、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節よりも、皮質における明瞭な濾胞構造を認めた。一方、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節は、リンパ節内の細胞密度が高いため明らかな濾胞構造を認めなかった。皮質における明瞭な濾胞構造

については、輸入リンパ管からリンパ節内へ到達した抗原や抗原提示細胞に対する B 細胞応答が起きている可能性を示唆する所見と考えられた。

リンパ節における B 細胞, T 細胞, 樹状細胞の割合は、各群における輸入リンパ管再疎通の有無で有意差はなかった。また、リンパ節における B 細胞, T 細胞, 樹状細胞の割合は、各群の輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節と対側の単径リンパ節の間の多群間の比較においても有意差はなかった。移植リンパ節の免疫細胞を評価するためには、免疫感作が必要であると考えられた。過去には、接触性皮膚炎を誘導するための皮膚へのオキサゾロン (Liao and Ruddle, 2006) やジニトロフルオロベンゼン (Betts et al., 2003) の塗布、ヒツジ赤血球を加えた Ribi アジュバント (Hoke et al., 1995) や卵白の主要タンパク質であるオボアルブミンを加えた完全フロイントアジュバント (Browning et al., 2005; Joseph et al., 2014; Liao and Ruddle, 2006) の皮下注射や腫瘍細胞の移植 (Maeda et al., 2018a; Rabson et al., 1982) などが報告されている。また、本検討はリンパ節における各免疫細胞の割合での比較であり、細胞数の違いが反映されなかったことも一因と考えられた。

2.4.3 限界

本研究には、次に述べる限界がある。

第一に、本マウスモデルはリンパ浮腫のモデルではない。しかし、臨床的には血管柄付きリンパ節移植は、中等度から進行したリンパ浮腫の患者に適応される術式である。マウス後肢のリンパ浮腫のモデルとしては、当教室で開発された単径部に 30Gy 単回の放射線照射した 1 週間後に、同単径の皮膚を全周性に切除し、リンパ管を 10-0 ナイロン糸で 3 針結紮後に、膝窩リンパ節と単径リンパ節を切除し、皮膚に全周性のギャップができるよう単径切開部の皮膚縁を下床の筋肉に縫合固定するという方法 (Oashi et al., 2012) や単径の皮膚を全周性に切除した上、単径リンパ節を周囲の脂肪組織を含めて切除し、膝窩リンパ節の前後のリンパ管を 10-0 ナイロン糸で結紮後に、膝窩リンパ節を周囲の脂肪組織を含めて切除し、シリコンシートを単径切開部の皮膚間に下床の筋肉と縫合固定するという放射線照射を用いない方法 (Iwasaki et al., 2017) がある。いずれの方法 (Iwasaki et al., 2017; Oashi et al., 2012) もリンパ浮腫モデルの作製時に、単径リンパ節が切除されるため、本モデルを作製することは不可能である。

第二に、臨床においては複数個のリンパ節を含む血管柄付き遊離複合組織移植として血管柄付きリンパ節移植が行われ、ドナーも単径、腋窩、顎下などの皮下リンパ節から空腸腸間膜、大網などの腹腔内リンパ節まで様々である。本モデルは、単一のリンパ節移植であるため、リンパ節移植のモデルとしては、非常に単純化されたものである。

第三に、術後4週という一時点での移植リンパ節を評価したが、移植リンパ節の再生を観察するためには、術後より長期間経過した時期における観察も必要である。ラットの血管柄のない分割リンパ節移植モデル(Ahrendt et al., 2008)において、術後2週で一時的に破壊されたB細胞、T細胞領域が術後8週で再生したとされ、術後8週での移植リンパ節の評価も検討する意義があると考えられる。

第四に、移植リンパ節のHEVを評価するためには、管腔構造であるHEVの組織学的観察が必須と考え、HEVの定量化を組織スライドからの画像解析として行った。PNAdに対する免疫組織化学染色で染色された外周100 μm^2 以上の管腔構造をHEVとしてカウントし、過去の報告(Lee et al., 2012; Qian et al., 2006)に準じて、そのうち内腔80 μm^2 以上の管腔構造を機能的な拡張HEVとしてカウントした。三次元的な脈管構造の二次元切片での評価であり、脈管の軸に対して垂直な切片とならなかった脈管の面積を測定する上で、その面積補正の計算(Qian et al., 2006)も検討課題である。また、内腔80 μm^2 以上の管腔構造を機能的な拡張HEVとして定義したが、これは細静脈の最小直径とされる10 μm から設定された値である(Qian et al., 2006)。マウス単経リンパ節には*in vivo* 蛍光顕微鏡による観察で、内径15~120 μm の細静脈があり、そのうちHEVは傍皮質領域に存在するクラスV(内径 $20 \pm 4 \mu\text{m}$)からクラスIII(内腔 $42 \pm 18 \mu\text{m}$)に分類される細静脈であるとされ(von Andrian, 1996)、機能的HEVの定義には検討の余地がある。

さらに、HEVの機能評価として、リンパ球とHEVとの選択的親和性をずり応力存在下に観察する*in vitro* リンパ球-HEV結合アッセイ(Butcher et al., 1979; Mebius et al., 1993; Stamper and Woodruff, 1976; Streeter et al., 1988)や、放射性同位元素で標識したリンパ球をマウスに静脈内投与した後に標的リンパ節の放射線量を測定する*in vivo* リンパ球ホーミングアッセイ(Mebius et al., 1991b; Streeter et al., 1988)なども検討する意義があると考えられる。また、HEVに発現するL-セレクトインリガンド分子PNAdのコアタンパクであるglycosylation-dependent cell adhesion molecule 1やCD34、およびこれらの分子に含まれるL-セレクトインの認識構造シアリル6-スルホルイスX糖鎖を合成するフコース転移酵素やN-アセチルグルコサミン-6-硫酸転移酵素などの遺伝子発現を検討すること(Liao and Ruddie, 2006)もHEVの機能評価の一方法である。

第五に、移植リンパ節の免疫細胞を評価するためには、免疫感作が必要であると考えられる。また、本モデルでは移植リンパ節の組織学的観察が必須と考え、免疫細胞の定量化を組織スライドからの画像解析として行った。組織学的観察はできなくなるが、フローサイトメトリーを用いることにより、各免疫細胞をCD4陽性ヘルパーT細胞、CD8陽性細胞傷害性T細胞、濾胞性ヘルパーT細胞などの詳細なサブセットまで定量化して評価すること(Maeda et al., 2018a)は可能であると考えられる。

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

- ・ 浅腹壁動脈を茎とする単径リンパ節脂肪弁を膝窩リンパ節摘出部に移植するマウス血管柄付きリンパ節移植モデルを確立した。
- ・ 本モデルの術後4週における輸入リンパ管再疎通率は64.0%であった。
- ・ 術後3週以降のICG蛍光リンパ管造影で輸入リンパ管再疎通を予測可能であった。
- ・ 輸入リンパ管再疎通のあった移植リンパ節は、輸入リンパ管再疎通のなかった移植リンパ節よりも有意に縮小した。

第二章

- ・ 移植リンパ節への輸入リンパ管再疎通のあった場合、血管柄付きリンパ節移植の方が、血流のないリンパ節移植に比べ、移植リンパ節の総HEV数に占める拡張HEV数の割合が有意に高かった。
- ・ 免疫感作を加えなかった本モデルにおいて、リンパ節におけるB細胞、T細胞、樹状細胞の割合は、いずれの群間にも有意差を認めなかった。

3.2 新知見の意義

第一章において確立したマウス血管柄付きリンパ節移植モデルは、マウスにおいて1つしかない単径リンパ節を膝窩リンパ節摘出部に移植することで、移植リンパ節の単純な組織学的比較が可能である。マウスはラットよりも抗体等の試薬が充実しているため、今後の移植リンパ節の免疫系としての機能解析に有用なモデルである。

これまで、移植リンパ節へのリンパ流がリンパ節におけるHEVの維持に重要であることは数多く報告されているが、移植リンパ節への血流がHEVにどのように影響するかという報告はなかった。第二章において、機能的リンパ系再構築には、移植リンパ節がレシピエントのリンパ管と再疎通することに加え、移植リンパ節への血流もリンパ節の機能的HEV保持のために重要な要素であると考えられた。血管柄付きリンパ節移植は、機能的HEVを保持することにより、移植リンパ節の免疫系としての機能の観点からも有用であることが示唆された。

3.3 今後の展開

血管柄付きリンパ節移植は、四肢のリンパ浮腫に対する治療としての臨床報告が相次いでいるが、いまだ国際的に標準化された術式はないのが現状である。

さらに近年では、先天性の脈管奇形に対する血管柄付きリンパ節移植の臨床応用も

報告された (Roka-Palkovits et al., 2018)。脈管奇形は、局所的な脈管形成異常により生じた先天性の病変であり、病変を構成する脈管の種類により動静脈奇形、静脈奇形、毛細血管奇形、リンパ管奇形およびそれらの混合型脈管奇形に分類される (Enjolras, 1997)。皮膚のポートワイン斑(毛細血管奇形)、静脈瘤(静脈奇形)、骨・軟部組織の肥大の3徴をもつ疾患として報告された Klippel-Trenaunay 症候群 (Klippel and Trenaunay, 1900) は、56%にリンパ管奇形を合併 (Maari and Frieden, 2004) し、リンパ浮腫を生じる。また、Klippel-Trenaunay 症候群の9~13%は、蜂窩織炎を合併し (Gloviczki et al., 1991; Jacob et al., 1998)、幼少期から繰り返すことも多い。今後、リンパ浮腫を合併する脈管奇形に対しても、免疫系としての機能を併せもつ血管柄付きリンパ節移植の適応拡大の可能性がある。

本モデルを用いて、血管柄付きリンパ節移植における移植リンパ節の機能の解析をさらに進めることで、本治療法の適応や限界についての基礎的データとなりうることが予想される。

3.4 今後の課題

臨床に即した観点で、移植リンパ節への血流の効果を解明するためには、本モデルを用いて、より長い術後観察期間を設定して、免疫感作を加える実験系を検討する必要があると考えられる。

さらに近年、大網などの腹腔内リンパ節を用いた血管柄付きリンパ節移植 (Agko et al., 2018; Ciudad et al., 2017) において、より高い免疫能が期待されており、その動物モデルの検討および本モデルとの比較も有用であると考えられる。

本モデルは、ヒトと異なり、リンパ流として膝窩リンパ節の上流ではない単径リンパ節を膝窩に移植するため、膝窩リンパ節の上流のリンパ流を直接的に障害しない。そして、本モデルを用いて、同種移植可能な B16F10 メラノーマ細胞株を用いた腫瘍移植モデル (Maeda et al., 2018a; Oashi et al., 2013) が作製可能であり、臨床研究では難しい移植リンパ節の抗腫瘍効果 (Nicoli et al., 2015) としての免疫能についての研究の発展性がある。

謝辞

本研究は、JSPS 科研費 JP16H05491 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、舟山恵美准教授ならびに前田 拓助教に心より深謝申し上げます。

北海道大学 大学院歯学研究院 口腔病態学分野 口腔顎顔面外科学教室・林 利彦准教授(兼 北海道大学病院客員臨床教授)、北海道大学病院 形成外科・村尾尚規講師、大澤昌之助教ならびに医員の皆様には、リサーチカンファレンス“Monthly discussion: Research project”において定期的に御助言をいただきました。ここに深く感謝申し上げます。

本研究期間中に北海道大学 大学院医学研究院 機能再生医学分野 形成外科学教室に在籍された福島県立医科大学医学部形成外科学講座・小山明彦教授(兼 北海道大学病院客員臨床教授)ならびに愛知医科大学形成外科・古川洋志特任教授(兼 北海道大学病院客員臨床教授)には、研究方法についての的確な御助言をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

統計解析において御助言をいただいた北海道大学 大学院医学研究院 社会医学分野 医学統計学教室・横田 勲准教授に深く感謝申し上げます。

本研究の全般において温かい御支援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・澤口恵美学術研究秘書ならびに本間千夏教室秘書に感謝申し上げます。

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・土佐紀子助教ならびに技術職員の皆様に深く感謝申し上げます。

免疫組織化学染色において多大なる御協力をいただいた株式会社モルフォテクノロジー・船山貴智代表取締役役に深く感謝申し上げます。

マウスのイラストシエーマ制作において御協力をいただいた医療イラスト制作事務所ダビンチ・津田佳彦代表に感謝申し上げます。

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の尽力の結果である研究環境がなければ、本研究は成り立ちませんでした。ここ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

- Agko, M., Ciudad, P., and Chen, H.C. (2018). Staged surgical treatment of extremity lymphedema with dual gastroepiploic vascularized lymph node transfers followed by suction-assisted lipectomy-a prospective study. *J Surg Oncol* 117, 1148-1156.
- Ahrendt, M., Hammerschmidt, S.I., Pabst, O., Pabst, R., and Bode, U. (2008). Stromal cells confer lymph node-specific properties by shaping a unique microenvironment influencing local immune responses. *J Immunol* 181, 1898-1907.
- Akita, S., Mitsukawa, N., Kuriyama, M., Kubota, Y., Hasegawa, M., Tokumoto, H., Ishigaki, T., Togawa, T., Kuyama, J., and Satoh, K. (2015). Comparison of vascularized supraclavicular lymph node transfer and lymphaticovenular anastomosis for advanced stage lower extremity lymphedema. *Ann Plast Surg* 74, 573-579.
- Alitalo, K. (2011). The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med* 17, 1371-1380.
- Althubaiti, G.A., Crosby, M.A., and Chang, D.W. (2013). Vascularized supraclavicular lymph node transfer for lower extremity lymphedema treatment. *Plast Reconstr Surg* 131, 133e-135e.
- Aschen, S.Z., Farias-Eisner, G., Cuzzzone, D.A., Albano, N.J., Ghanta, S., Weitman, E.S., Ortega, S., and Mehrara, B.J. (2014). Lymph node transplantation results in spontaneous lymphatic reconnection and restoration of lymphatic flow. *Plast Reconstr Surg* 133, 301-310.
- Badger, C.M., Peacock, J.L., and Mortimer, P.S. (2000). A randomized, controlled, parallel-group clinical trial comparing multilayer bandaging followed by hosiery versus hosiery alone in the treatment of patients with lymphedema of the limb. *Cancer* 88, 2832-2837.
- Basta, M.N., Gao, L.L., and Wu, L.C. (2014). Operative treatment of peripheral lymphedema: a systematic meta-analysis of the efficacy and safety of lymphovenous microsurgery and tissue transplantation. *Plast Reconstr Surg* 133, 905-913.
- Batista, B.N., Germain, M., Faria, J.C., and Becker, C. (2017). Lymph node flap transfer for patients with secondary lower limb lymphedema. *Microsurgery* 37, 29-33.
- Becker, C., Arrive, L., Saaristo, A., Germain, M., Fanzio, P., Batista, B.N., and Piquilloud, G. (2012). Surgical treatment of congenital lymphedema. *Clin Plast Surg* 39, 377-384.
- Becker, C., Assouad, J., Riquet, M., and Hidden, G. (2006). Postmastectomy lymphedema: long-term results following microsurgical lymph node transplantation. *Ann Surg* 243, 313-315.

- Betts, C.J., Moggs, J.G., Caddick, H.T., Cumberbatch, M., Orphanides, G., Dearman, R.J., Ryan, C.A., Hulette, B.C., Frank Gerberick, G., and Kimber, I. (2003) . Assessment of glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1 as a correlate of allergen-stimulated lymph node activation. *Toxicology* 185, 103-117.
- Blum, K.S., Radtke, C., Knapp, W.H., Pabst, R., and Gratz, K.F. (2007) . SPECT-CT: a valuable method to document the regeneration of lymphatics and autotransplanted lymph node fragments. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34, 1861-1867.
- Browning, J.L., Allaire, N., Ngam-Ek, A., Notidis, E., Hunt, J., Perrin, S., and Fava, R.A. (2005) . Lymphotoxin-beta receptor signaling is required for the homeostatic control of HEV differentiation and function. *Immunity* 23, 539-550.
- Buettner, M., and Bode, U. (2011) . Lymph node transplantation and its immunological significance in animal models. *Clin Dev Immunol* 2011, 353510.
- Butcher, E.C., Scollay, R.G., and Weissman, I.L. (1979) . Lymphocyte adherence to high endothelial venules: characterization of a modified in vitro assay, and examination of the binding of syngeneic and allogeneic lymphocyte populations. *J Immunol* 123, 1996-2003.
- Chang, D.W., Suami, H., and Skoracki, R. (2013) . A prospective analysis of 100 consecutive lymphovenous bypass cases for treatment of extremity lymphedema. *Plast Reconstr Surg* 132, 1305-1314.
- Charles, R.H. (1912) . Elephantiasis scroti. In *A Systems of Treatment*, Vol. III, Latham, A., ed. (London: J. & A. Churchill Ltd.), pp. 504-513.
- Chen, H.C., O'Brien, B.M., Rogers, I.W., Pribaz, J.J., and Eaton, C.J. (1990) . Lymph node transfer for the treatment of obstructive lymphoedema in the canine model. *Br J Plast Surg* 43, 578-586.
- Cheng, M.H., Huang, J.J., Nguyen, D.H., Saint-Cyr, M., Zenn, M.R., Tan, B.K., and Lee, C.L. (2012) . A novel approach to the treatment of lower extremity lymphedema by transferring a vascularized submental lymph node flap to the ankle. *Gynecol Oncol* 126, 93-98.
- Ciudad, P., Manrique, O.J., Date, S., Sacak, B., Chang, W.L., Kiranantawat, K., Lim, S.Y., and Chen, H.C. (2017) . A head-to-head comparison among donor site morbidity after vascularized lymph node transfer: pearls and pitfalls of a 6-year single center experience. *J Surg Oncol* 115, 37-42.
- Clodius, L., Smith, P.J., Bruna, J., and Serafin, D. (1982) . The lymphatics of the groin flap. *Ann Plast Surg* 9, 447-458.
- Coriddi, M., Skoracki, R., and Eiferman, D. (2017) . Vascularized jejunal mesenteric lymph node transfer for treatment of extremity lymphedema. *Microsurgery* 37, 177-178.

- Cornelissen, A.J., Qiu, S.S., Lopez Penha, T., Keuter, X., Piatkowski de Grzymala, A., Tuinder, S., and van der Hulst, R. (2017) . Outcomes of vascularized versus non-vascularized lymph node transplant in animal models for lymphedema. Review of the literature. *J Surg Oncol* 115, 32-36.
- Dayan, J.H., Dayan, E., and Smith, M.L. (2015) . Reverse lymphatic mapping: a new technique for maximizing safety in vascularized lymph node transfer. *Plast Reconstr Surg* 135, 277-285.
- Drayson, M.T., and Ford, W.L. (1984) . Afferent lymph and lymph borne cells: their influence on lymph node function. *Immunobiology* 168, 362-379.
- Enjolras, O. (1997) . Classification and management of the various superficial vascular anomalies: hemangiomas and vascular malformations. *J Dermatol* 24, 701-710.
- Földi, M. (1994) . Treatment of lymphedema. *Lymphology* 27, 1-5.
- Francois, C.G., Brouha, P.C., Laurentin-Perez, L.A., Perez-Abadia, G., Grossi, F.V., Barker, J.H., Hewitt, C.W., Kon, M., Ramsamooj, R., and Maldonado, C. (2006) . Vascularized lymph node transplantation induces graft-versus-host disease in chimeric hosts. *Transplantation* 81, 1435-1441.
- Furukawa, H., Osawa, M., Saito, A., Hayashi, T., Funayama, E., Oyama, A., Sekido, M., and Yamamoto, Y. (2011) . Microsurgical lymphaticovenous implantation targeting dermal lymphatic backflow using indocyanine green fluorescence lymphography in the treatment of postmastectomy lymphedema. *Plast Reconstr Surg* 127, 1804-1811.
- Gharb, B.B., Rampazzo, A., Spanio di Spilimbergo, S., Xu, E.S., Chung, K.P., and Chen, H.C. (2011) . Vascularized lymph node transfer based on the hilar perforators improves the outcome in upper limb lymphedema. *Ann Plast Surg* 67, 589-593.
- Girard, J.P., Moussion, C., and Forster, R. (2012) . HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 12, 762-773.
- Gloviczki, P., Stanson, A.W., Stickler, G.B., Johnson, C.M., Toomey, B.J., Meland, N.B., Rooke, T.W., and Cherry, K.J., Jr. (1991) . Klippel-Trenaunay syndrome: the risks and benefits of vascular interventions. *Surgery* 110, 469-479.
- Granzow, J.W., Soderberg, J.M., Kaji, A.H., and Dauphine, C. (2014) . An effective system of surgical treatment of lymphedema. *Ann Surg Oncol* 21, 1189-1194.
- Hadamitzky, C., Blum, K.S., and Pabst, R. (2009) . Regeneration of autotransplanted avascular lymph nodes in the rat is improved by platelet-rich plasma. *J Vasc Res* 46, 389-396.

- Hayashida, K., Yoshida, S., Yoshimoto, H., Fujioka, M., Saijo, H., Migita, K., Kumaya, M., and Akita, S. (2017) . Adipose-derived stem cells and vascularized lymph node transfers successfully treat mouse hindlimb secondary lymphedema by early reconnection of the lymphatic system and lymphangiogenesis. *Plast Reconstr Surg* 139, 639-651.
- Hendriks, H.R., Duijvestijn, A.M., and Kraal, G. (1987) . Rapid decrease in lymphocyte adherence to high endothelial venules in lymph nodes deprived of afferent lymphatic vessels. *Eur J Immunol* 17, 1691-1695.
- Hendriks, H.R., Eestermans, I.L., and Hoefsmit, E.C. (1980) . Depletion of macrophages and disappearance of postcapillary high endothelial venules in lymph nodes deprived of afferent lymphatic vessels. *Cell Tissue Res* 211, 375-389.
- Hoke, D., Mebius, R.E., Dybdal, N., Dowbenko, D., Gribbling, P., Kyle, C., Baumhueter, S., and Watson, S.R. (1995) . Selective modulation of the expression of L-selectin ligands by an immune response. *Curr Biol* 5, 670-678.
- Honkonen, K.M., Visuri, M.T., Tervala, T.V., Halonen, P.J., Koivisto, M., Lahtenvuo, M.T., Alitalo, K.K., Yla-Herttuala, S., and Saaristo, A.M. (2013) . Lymph node transfer and perinodal lymphatic growth factor treatment for lymphedema. *Ann Surg* 257, 961-967.
- International Society of Lymphology Executive Committee (2016) . The diagnosis and treatment of peripheral lymphedema: 2016 Consensus Document of the International Society of Lymphology. *Lymphology* 49, 170-184.
- Ishikawa, K., Sasaki, S., Furukawa, H., Nagao, M., Iwasaki, D., Saito, N., and Yamamoto, Y. (2013) . Preliminary experience with intraoperative near-infrared fluorescence imaging in percutaneous sclerotherapy of soft-tissue venous malformations. *Dermatol Surg* 39, 907-912.
- Ito, R., Zelken, J., Yang, C.Y., Lin, C.Y., and Cheng, M.H. (2016) . Proposed pathway and mechanism of vascularized lymph node flaps. *Gynecol Oncol* 141, 182-188.
- Iwasaki, D., Yamamoto, Y., Murao, N., Oyama, A., Funayama, E., and Furukawa, H. (2017) . Establishment of an acquired lymphedema model in the mouse hindlimb: technical refinement and molecular characteristics. *Plast Reconstr Surg* 139, 67e-78e.
- Jacob, A.G., Driscoll, D.J., Shaughnessy, W.J., Stanson, A.W., Clay, R.P., and Gloviczki, P. (1998) . Klippel-Trenaunay syndrome: spectrum and management. *Mayo Clinic proceedings* 73, 28-36.
- Joseph, W.J., Aschen, S., Ghanta, S., Cuzzzone, D., Albano, N., Gardenier, J., Savetsky, I., Torrisi, J., and Mehrara, B.J. (2014) . Sterile inflammation after lymph node transfer improves lymphatic function and regeneration. *Plast Reconstr Surg* 134, 60-68.

- Kasprzak, A., Surdacka, A., Tomczak, M., and Konkol, M. (2013) . Role of high endothelial postcapillary venules and selected adhesion molecules in periodontal diseases: a review. *J Periodontal Res* 48, 1-21.
- Kawashima, Y., Sugimura, M., Hwang, Y.C., and Kudo, N. (1964) . The lymph system in mice. *Jap J Vet Res* 12, 69-78.
- Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M., and Altman, D.G. (2010) . Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 8, e1000412.
- Klippel, M., and Trenaunay, P. (1900) . Memoires originaux: du naevus variqueux osteo-hypertrophique. *Arch Gen Med (Paris)* 3, 641-672.
- Kochi, T., Imai, Y., Takeda, A., Watanabe, Y., Mori, S., Tachi, M., and Kodama, T. (2013) . Characterization of the arterial anatomy of the murine hindlimb: functional role in the design and understanding of ischemia models. *PLoS One* 8, e84047.
- Kwiecien, G.J., Uygur, S., Korn, J., Gharb, B.B., Madajka, M., Djohan, R., Zins, J.E., and Schwarz, G.S. (2015) . Vascularized axillary lymph node transfer: a novel model in the rat. *Microsurgery* 35, 662-667.
- Lähteenvuo, M., Honkonen, K., Tervala, T., Tammela, T., Suominen, E., Lähteenvuo, J., Kholová, I., Alitalo, K., Yla-Herttuala, S., and Saaristo, A. (2011) . Growth factor therapy and autologous lymph node transfer in lymphedema. *Circulation* 123, 613-620.
- Lasinski, B.B., McKillip Thrift, K., Squire, D., Austin, M.K., Smith, K.M., Wanchai, A., Green, J.M., Stewart, B.R., Cormier, J.N., and Armer, J.M. (2012) . A systematic review of the evidence for complete decongestive therapy in the treatment of lymphedema from 2004 to 2011. *PM R* 4, 580-601.
- Lee, S.Y., Chao-Nan, Q., Seng, O.A., Peiyi, C., Bernice, W.H., Swe, M.S., Chii, W.J., Jacqueline, H.S., and Chee, S.K. (2012) . Changes in specialized blood vessels in lymph nodes and their role in cancer metastasis. *J Transl Med* 10, 206.
- Liao, S., and Ruddle, N.H. (2006) . Synchrony of high endothelial venules and lymphatic vessels revealed by immunization. *J Immunol* 177, 3369-3379.
- Lin, C.H., Ali, R., Chen, S.C., Wallace, C., Chang, Y.C., Chen, H.C., and Cheng, M.H. (2009) . Vascularized groin lymph node transfer using the wrist as a recipient site for management of postmastectomy upper extremity lymphedema. *Plast Reconstr Surg* 123, 1265-1275.
- Liu, N.F., Maldik, J., and Olszewski, W. (1992) . Mesenteric lymph node transplantation in syngeneic rats: changes in cellularity and architecture. *Lymphology* 25, 139-144.

- Maari, C., and Frieden, I.J. (2004) . Klippel-Trenaunay syndrome: the importance of "geographic stains" in identifying lymphatic disease and risk of complications. *J Am Acad Dermatol* 51, 391-398.
- Maeda, T., Hayashi, T., Furukawa, H., Iwasaki, D., Ishikawa, K., Funayama, E., Murao, N., Osawa, M., Oyama, A., and Yamamoto, Y. (2018a) . Immune-mediated antitumor effect of a transplanted lymph node. *Int J Cancer* 143, 1224-1235.
- Maeda, T., Yamamoto, Y., Iwasaki, D., Hayashi, T., Funayama, E., Oyama, A., Murao, N., and Furukawa, H. (2018b) . 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* 16, 165-173.
- Marshall, M.V., Rasmussen, J.C., Tan, I.C., Aldrich, M.B., Adams, K.E., Wang, X., Fife, C.E., Maus, E.A., Smith, L.A., and Sevick-Muraca, E.M. (2010) . Near-infrared fluorescence imaging in humans with indocyanine green: a review and update. *Open Surg Oncol J* 2, 12-25.
- Mebius, R.E., Bauer, J., Twisk, A.J., Breve, J., and Kraal, G. (1991a) . The functional activity of high endothelial venules: a role for the subcapsular sinus macrophages in the lymph node. *Immunobiology* 182, 277-291.
- Mebius, R.E., Breve, J., Kraal, G., and Streeter, P.R. (1993) . Developmental regulation of vascular addressin expression: a possible role for site-associated environments. *Int Immunol* 5, 443-449.
- Mebius, R.E., Streeter, P.R., Breve, J., Duijvestijn, A.M., and Kraal, G. (1991b) . The influence of afferent lymphatic vessel interruption on vascular addressin expression. *J Cell Biol* 115, 85-95.
- Miranda Garcés, M., Mirapeix, R., Pons, G., Sadri, A., and Masià, J. (2016) . A comprehensive review of the natural lymphaticovenous communications and their role in lymphedema surgery. *J Surg Oncol* 113, 374-380.
- Miranda Garcés, M., Pons, G., Mirapeix, R., and Masià, J. (2017) . Intratissue lymphovenous communications in the mechanism of action of vascularized lymph node transfer. *J Surg Oncol* 115, 27-31.
- Mokhtar, H.M., Giribabu, N., Muniandy, S., and Salleh, N. (2014) . Testosterone decreases the expression of endometrial pinopode and L-selectin ligand (MECA-79) in adult female rats during uterine receptivity period. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 1967-1976.
- Moussion, C., and Girard, J.P. (2011) . Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *Nature* 479, 542-546.

- Nguyen, D.H., Chou, P.Y., Hsieh, Y.H., Momeni, A., Fang, Y.H., Patel, K.M., Yang, C.Y., and Cheng, M.H. (2016) . Quantity of lymph nodes correlates with improvement in lymphatic drainage in treatment of hind limb lymphedema with lymph node flap transfer in rats. *Microsurgery* 36, 239-245.
- Nicoli, F., Ciudad, P., Lim, S.Y., Lazzeri, D., D'Ambrosia, C., Kiranantawat, K., Chilgar, R.M., Sapountzis, S., Sacak, B., and Chen, H.C. (2015) . Potential use of transferred lymph nodes as metastasis detectors after tumor excision. *Arch Plast Surg* 42, 478-483.
- O'Brien, B.M., Hickey, M.J., Hurley, J.V., Dvir, E., Khazanchi, R.K., Pederson, W.C., and Pribaz, J.J. (1990) . Microsurgical transfer of the greater omentum in the treatment of canine obstructive lymphoedema. *Br J Plast Surg* 43, 440-446.
- O'Brien, B.M., Khazanchi, R.K., Kumar, P.A., Dvir, E., and Pederson, W.C. (1989) . Liposuction in the treatment of lymphoedema; a preliminary report. *Br J Plast Surg* 42, 530-533.
- O'Brien, B.M., Sykes, P., Threlfall, G.N., and Browning, F.S. (1977) . Microlymphaticovenous anastomoses for obstructive lymphedema. *Plast Reconstr Surg* 60, 197-211.
- Oashi, K., Furukawa, H., Nishihara, H., Ozaki, M., Oyama, A., Funayama, E., Hayashi, T., Kuge, Y., and Yamamoto, Y. (2013) . Pathophysiological characteristics of melanoma in-transit metastasis in a lymphedema mouse model. *J Invest Dermatol* 133, 537-544.
- Oashi, K., Furukawa, H., Oyama, A., Funayama, E., Hayashi, T., Saito, A., and Yamamoto, Y. (2012) . A new model of acquired lymphedema in the mouse hind limb: a preliminary report. *Ann Plast Surg* 69, 565-568.
- Ozturk, C.N., Ozturk, C., Glasgow, M., Platek, M., Ashary, Z., Kuhn, J., Aronoff, N., Lohman, R., Djohan, R., and Gurunluoglu, R. (2016) . Free vascularized lymph node transfer for treatment of lymphedema: a systematic evidence based review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 69, 1234-1247.
- Pappalardo, M., Patel, K., and Cheng, M.H. (2018) . Vascularized lymph node transfer for treatment of extremity lymphedema: an overview of current controversies regarding donor sites, recipient sites and outcomes. *J Surg Oncol* 117, 1420-1431.
- Patel, K.M., Chu, S.Y., Huang, J.J., Wu, C.W., Lin, C.Y., and Cheng, M.H. (2014) . Preplanning vascularized lymph node transfer with duplex ultrasonography: an evaluation of 3 donor sites. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2, e193.
- Qian, C.N., Berghuis, B., Tsarfaty, G., Bruch, M., Kort, E.J., Ditlev, J., Tsarfaty, I., Hudson, E., Jackson, D.G., Petillo, D. et al. (2006) . Preparing the "soil": the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. *Cancer Res* 66, 10365-10376.

- Rabson, J.A., Geyer, S.J., Levine, G., Swartz, W.M., and Futrell, J.W. (1982) . Tumor immunity in rat lymph nodes following transplantation. *Ann Surg* 196, 92-99.
- Randolph, G.J., Angeli, V., and Swartz, M.A. (2005) . Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5, 617-628.
- Rockson, S.G. (2001) . Lymphedema. *Am J Med* 110, 288-295.
- Roka-Palkovits, J., Steinbacher, J., Tinhofer, I., Pona, I., Matzek, W.K., Staudenherz, A., Rath, T., Radtke, C., Weninger, W., and Tzou, C.J. (2018) . Treatment of cervicofacial lymphatico-venous malformation with vascularized lymph node transfer. *Plast Reconstr Surg* 142, 425e-426e.
- Rosen, S.D. (2004) . Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 22, 129-156.
- Sasaki, K., Pabst, R., and Rothkotter, H.J. (1994) . Development of the high endothelial venule in rat lymph node autografts. *Anat Rec* 238, 473-479.
- Scaglioni, M.F., Arvanitakis, M., Chen, Y.C., Giovanoli, P., Chia-Shen Yang, J., and Chang, E.I. (2018) . Comprehensive review of vascularized lymph node transfers for lymphedema: outcomes and complications. *Microsurgery* 38, 222-229.
- Schindewolf, L., Breves, G., Buettner, M., Hadamitzky, C., and Pabst, R. (2014) . VEGF-C improves regeneration and lymphatic reconnection of transplanted autologous lymph node fragments: an animal model for secondary lymphedema treatment. *Immun Inflamm Dis* 2, 152-161.
- Shesol, B.F., Nakashima, R., Alavi, A., and Hamilton, R.W. (1979) . Successful lymph node transplantation in rats, with restoration of lymphatic function. *Plast Reconstr Surg* 63, 817-823.
- Shioya, R., Furukawa, H., Murao, N., Hayashi, T., Oyama, A., Funayama, E., Yamamoto, Y., and Saito, N. (2016) . Prevention of lymphedematous change in the mouse hindlimb by nonvascularized lymph node transplantation. *Ann Plast Surg* 76, 442-445.
- Stamper, H.B., Jr., and Woodruff, J.J. (1976) . Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. *J Exp Med* 144, 828-833.
- Steinbacher, J., Tinhofer, I.E., Meng, S., Reissig, L.F., Placheta, E., Roka-Palkovits, J., Rath, T., Cheng, M.H., Weninger, W.J., and Tzou, C.H. (2017) . The surgical anatomy of the supraclavicular lymph node flap: a basis for the free vascularized lymph node transfer. *J Surg Oncol* 115, 60-62.
- Stewart, F.W., and Treves, N. (1948) . Lymphangiosarcoma in postmastectomy lymphedema; a report of six cases in elephantiasis chirurgica. *Cancer* 1, 64-81.

- Streeter, P.R., Rouse, B.T., and Butcher, E.C. (1988) . Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J Cell Biol* 107, 1853-1862.
- Suami, H., Pan, W.R., and Taylor, G.I. (2007) . The lymphatics of the skin filled by a dermal backflow: an observation in a scarred cadaver leg. *Lymphology* 40, 122-126.
- Tammela, T., Saaristo, A., Holopainen, T., Lyytikka, J., Kotronen, A., Pitkonen, M., Abo-Ramadan, U., Yla-Herttuala, S., Petrova, T.V., and Alitalo, K. (2007) . Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat Med* 13, 1458-1466.
- Tervala, T.V., Hartiala, P., Tammela, T., Visuri, M.T., Yla-Herttuala, S., Alitalo, K., and Saarikko, A.M. (2015) . Growth factor therapy and lymph node graft for lymphedema. *J Surg Res* 196, 200-207.
- Tilak, S.P., and Howard, J.M. (1965) . Regeneration and autotransplantation of lymph nodes. *Ann Surg* 161, 441-446.
- Tilney, N.L. (1971) . Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *J Anat* 109, 369-383.
- Tobbia, D., Semple, J., Baker, A., Dumont, D., and Johnston, M. (2009) . Experimental assessment of autologous lymph node transplantation as treatment of postsurgical lymphedema. *Plast Reconstr Surg* 124, 777-786.
- Tourani, S.S., Taylor, G.I., and Ashton, M.W. (2016) . Vascularized lymph node transfer: a review of the current evidence. *Plast Reconstr Surg* 137, 985-993.
- Uygur, S., Ozturk, C., Bozkurt, M., Kwiecien, G., Madajka, M., and Siemionow, M. (2013) . A new vascularized cervical lymph node transplantation model: an anatomic study in rats. *Ann Plast Surg* 71, 671-674.
- von Andrian, U.H. (1996) . Intravital microscopy of the peripheral lymph node microcirculation in mice. *Microcirculation* 3, 287-300.
- von Andrian, U.H., and Mempel, T.R. (2003) . Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 3, 867-878.
- Willard-Mack, C.L. (2006) . Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol Pathol* 34, 409-424.
- Wolvers, D.A., Coenen-de Roo, C.J., Mebius, R.E., van der Cammen, M.J., Tirion, F., Miltenburg, A.M., and Kraal, G. (1999) . Intranasally induced immunological tolerance is determined by characteristics of the draining lymph nodes: studies with OVA and human cartilage gp-39. *J Immunol* 162, 1994-1998.

- Yamamoto, T., Matsuda, N., Doi, K., Oshima, A., Yoshimatsu, H., Todokoro, T., Ogata, F., Mihara, M., Narushima, M., Iida, T. et al. (2011a) . The earliest finding of indocyanine green lymphography in asymptomatic limbs of lower extremity lymphedema patients secondary to cancer treatment: the modified dermal backflow stage and concept of subclinical lymphedema. *Plast Reconstr Surg* 128, 314e-321e.
- Yamamoto, T., Narushima, M., Doi, K., Oshima, A., Ogata, F., Mihara, M., Koshima, I., and Mundinger, G.S. (2011b) . Characteristic indocyanine green lymphography findings in lower extremity lymphedema: the generation of a novel lymphedema severity staging system using dermal backflow patterns. *Plast Reconstr Surg* 127, 1979-1986.
- Yamamoto, T., Yamamoto, N., Doi, K., Oshima, A., Yoshimatsu, H., Todokoro, T., Ogata, F., Mihara, M., Narushima, M., Iida, T. et al. (2011c) . Indocyanine green-enhanced lymphography for upper extremity lymphedema: a novel severity staging system using dermal backflow patterns. *Plast Reconstr Surg* 128, 941-947.
- Yamamoto, Y., Horiuchi, K., Sasaki, S., Sekido, M., Furukawa, H., Oyama, A., Yajima, K., and Sugihara, T. (2003) . Follow-up study of upper limb lymphedema patients treated by microsurgical lymphaticovenous implantation (MLVI) combined with compression therapy. *Microsurgery* 23, 21-26.
- Yamamoto, Y., and Sugihara, T. (1998) . Microsurgical lymphaticovenous implantation for the treatment of chronic lymphedema. *Plast Reconstr Surg* 101, 157-161.
- Yang, C.Y., Nguyen, D.H., Wu, C.W., Fang, Y.H., Chao, K.T., Patel, K.M., and Cheng, M.H. (2014) . Developing a lower limb lymphedema animal model with combined lymphadenectomy and low-dose radiation. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2, e121.

(引用文献数 112)