

氏名(本籍)	柴田真治(岐阜県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第413号
学位授与年月日	平成19年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	ラットならびにイヌの横隔膜からのリンパ排導に関する研究
論文審査委員	(主査) 浅利昌男 (副査) 有嶋和義 二宮博義 早川敏之 (東京慈恵会医科大学医学部医学科解剖学第二講座助教授)

論文内容の要旨

〔論文要旨〕

リンパ循環は、リンパ液のみならず、その含有物である、ある種の免疫担当細胞、病原物質、老廃物あるいは腫瘍細胞を全身血液循環へと運ぶ第二の循環系である。リンパは皮膚あるいは消化器官、呼吸器官などの末梢からリンパ管を経て、最終的には静脈系に流入するほぼ一定の排導経路を持ち、その途上に生物学的ろ過装置として知られる領域リンパ節を持つことが知られている。これらの特徴からリンパ行性に進むリンパ(含有物)の進路を、リンパ排導経路上にあるそれぞれの領域リンパ節を含めて予測でき、さらにそれらの領域リンパ節ごとの生体反応をみることで、末梢領域に起こっている異常を追跡できることになり、その経路を解明することの臨床的な意義は大きい。

本研究は四足歩行動物であるラットならびにイヌの腹腔内のリンパ液あるいはその含有物が、腹腔から、腹腔内最大の吸収器官である横隔膜を介して吸収された後、体内をどのように通過し、血液循環に流入するかというリンパの排導路を明らかにする目的で、マウス、ラットおよびイヌを用いて解剖学的検討を行った。

本研究では、はじめにリンパの吸収の場となる横隔膜の腹膜表面形態、特に「取り込み口」といわれるリンパ管前通液路(stomata)について、その形態、大きさおよび分布について観察するとともに、吸収活性の部位的相違から吸収活性の高い領域における吸収機構について検討した(第一章)。次に、横隔膜吸収後のリンパの排導路を検討するため、ラットおよびイヌを用いて、実験的に腹膜内に投与された物質が、横隔膜を経て胸膜側に至った後、どのような排導路を辿って血液循環系に流入するか

について、時系列的に検討した（第二章・第三章）。

第一章 横隔膜腹膜面における stomata の表面形態について

第一章では、横隔膜腹膜面にあり腹膜腔からのリンパ、およびその含有物の吸収の場、即ち「取り込み口」である stomata の形態、大きさおよび分布を調べる目的で、イヌを用いて stomata の表面形態を走査型電子顕微鏡（Scanning electron microscope; SEM）で、また、ラットおよびマウスを用いて実験的にラテックス微粒子を腹腔内に投与した後の stomata の大きさの変化について SEM および凍結割断標本を用いて検討した。横隔膜腹膜表面を SEM で観察すると横隔膜腹膜中皮は大型扁平上皮であり、細胞表面には散在的な微絨毛を認め、さらには細胞間接合部には微絨毛が重なり密在しており、細胞の境界を明瞭にしていた。Stomata は各上皮細胞間の開口部として見られ、stomata の大きさ（直径）は無処置ラットで平均 $5.81 \mu\text{m}$ （範囲： $2.5\text{-}10 \mu\text{m}$ ）であったものが、ラテックス粒子の腹腔内投与後には stomata は大きく開口し、平均 $8.9 \mu\text{m}$ （範囲： $2.8\text{-}20 \mu\text{m}$ ）になっていた。また、マウスを用いて同様に腹腔内にラテックス粒子を投与して、3 分間の時間経過後、横隔膜を背腹側ならびに左右側に四分割して、筋部および腱中心を含む横隔膜全表面の stomata の数を SEM で得られた写真上で計測した結果、stomata は横隔膜腹膜側の左側部に比べ右側部に有意に多く見られ、その中でも右腹側部（筋部）に最も多く見られた。このことから横隔膜腹膜面における stomata の分布は横隔膜全体に一様ではなく、明らかな部位差が見られた。横隔膜の凍結割断標本では腹膜中皮と、より深層の横隔膜筋線維との間に横隔膜中皮下リンパ腔を認めた。横隔膜中皮下リンパ腔は腹腔内圧の上昇に比例して拡大することが知られているが、これは腹腔内液の吸収量を増加させるための恒常性維持反応と考えられる。横隔膜中皮下リンパ腔では、その位置から横隔膜筋線維の緊張と弛緩でリンパ腔の内皮細胞間に間隙の差が生じ、腹腔内から stomata を通じて横隔膜リンパ系へリンパが吸収されやすくなることが考えられた。横隔膜の stomata はその機能から、臨床的には、腹膜腔内投与物質の全身循環への吸収口となることや腹水中に含有する癌細胞の播種性転移との関連が考えられる。胃や肝臓は横隔膜に近接していることから、それらの臓器の漿膜に浸潤した癌細胞が腹膜腔内に脱落すると、それが刺激になり、容易に横隔膜の stomata が拡大し、そこから癌細胞が侵入し、横隔膜リンパ管内に進展する可能性が示唆された。

第二章 ラットの横隔膜からのリンパ排導について

第二章ではラットの腹膜腔からのリンパ排導について、腹膜腔に分泌されたリンパあるいはその含有物質が横隔膜を通過した後、どのような経路で排導されていくかを明らかにするためマーカー（India ink）投与後、時系列的に解剖学的な観察を進めた。本実験に先立って、実験 1 として腹腔内に投与される India ink の有用性に関する検討を行った。すなわち、腹腔内に生理的食塩水の中に India

inkを溶かしたものならびに腹膜還流液EL-3号にIndia inkを溶かしたもの、蒸留水にIndia inkを溶かしたものの3種の溶液を別々の個体に投与して、それぞれの排導の速さ、排導路について実験2と同様、時系列的に観察し、実験2で進めるリンパ排導路検索のために最も適した投与剤について検討した。その結果、生理的食塩水を溶媒としたIndia inkおよびEL-3号を溶媒としたIndia inkの両者とも排導状態の安定性が確認された。この実験1を経て、実験2ではラットの腹膜腔内に生理食塩水に溶かしたIndia inkを投与して、その排導の様子について時系列的に観察した。各排導路の時系列的な排導状況を比較すると、最も早期に排導が見られたのは、横隔膜や肋間から起こり、胸壁腹側の内胸動脈・静脈に沿って走る内胸リンパ幹管や、横隔神経や後大静脈に沿って胸郭前口に向かって進むリンパ管で、ともに上前縦隔リンパ節内側群に還流する経路であり、左右両側ともほぼ同量のIndia inkの流入が実験開始直後（3分後）から見られた。一方、胸大動脈右側を併走する胸管に還流する経路では3個体中1個体で投与後1時間経過して初めてIndia inkが確認されたが、しかし2時間経過後には3個体全てにこの経路が確認された。また、India inkの還流を受ける胸腔内の上前縦隔リンパ節内側群に属するリンパ節は、腹腔投与直後の個体から、4時間経過した個体まで、左右いずれも全ての個体でIndia inkの取り込みが確認された。一方、同外側群では、投与直後におけるIndia inkの流入は不定であったが、1時間を経て安定的なIndia inkの流入が観察された。また、上前縦隔リンパ節では右側にあるものの方が、左側にあるものよりIndia inkの流入量が多いことが観察された。一部の個体では、左右の内胸動脈に沿う内胸リンパ幹管、横隔神経に沿うリンパ管、より背側の右側胸椎側リンパ幹管から、頸部の浅頸リンパ節および腋窩リンパ節にIndia inkの漏出が観察された。本章の研究は排導の速さに、排導路間で差が見られることを実験的に明らかにした最初の報告となる。

第三章 イヌの横隔膜からのリンパ排導について

第三章では、ラットと同様にイヌの腹膜腔からのリンパ排導を観察する目的で、腹膜腔に加えて、骨盤腔からの排導に関しても検討を加え、リンパの排導経路を時系列的に観察し、その経路を明らかにした。腹膜腔内投与後30分ではラットと同様に、India inkは胸腔底部を走行する内胸動・静脈に沿った内胸リンパ幹管のみを描出していた。この経路ではIndia inkは胸骨リンパ節を中継し、最終的には左右側とも前縦隔リンパ節に流入していた。また左右のリンパ管の描出の濃淡差では右側の内胸リンパ幹管が極めて濃く現れ、多量のIndia inkの取り込みが認められた。腹膜腔内投与後1時間では、左右の内胸リンパ幹管に加え、新たに食道表面の左迷走神経に沿って走行するリンパ管の経路も観察された。この経路はその途上、気管分岐下リンパ節や左気管支リンパ節を経由し、最終的に左右の前縦隔リンパ節に続いていた。腹膜腔内投与後2時間30分および骨盤腔内投与1時間では、左右の内胸リンパ幹管、迷走神経に沿うリンパ管に加え、胸椎側リンパ幹管、胸管の経路が観察された。さらに胸椎側リンパ幹管からは肋間リンパ管への漏出と見られる所見も得られた。骨盤腔内投与後2時間30分では、腹膜腔内投与で得られた経路と同様に内胸リンパ幹管、迷走神経に沿うリンパ管、胸椎

側リンパ幹管、胸管の描出が見られ、そのうち胸椎側リンパ幹管は第六肋骨の位置で胸管に流入していた。また、浅頸リンパ節への India ink の流入が見られ、胸骨リンパ節からの漏出があったものと考えられる。また、腹膜腔内投与後2時間30分の標本において、胸管よりも内胸リンパ幹管が強く描出されていたのに対し、骨盤腔投与後2時間30分のものでは胸管がより強く描出されていた。これらをまとめると、イヌでの腹膜腔からのリンパ排導の時系列的な観察結果をラットの結果と比較すると両者はほぼ一致していた。この一致はイヌとラットが共に四足歩行動物であり、四足歩行動物では個体にかかる重力が体幹腹側方向へかかるため、注入された India ink が腹腔の腹側に集まる傾向があることや第一章で示したように横隔膜腹膜の stomata の分布差を反映していると考えられる。また、リンパ管内での India ink の移動が、基本的には重力や筋肉運動、呼吸運動などの受動的な圧力によって促進されることも理由であると思われた。最も遅くリンパの排導が開始されるのは胸管と胸椎側リンパ幹管であったが、India ink の骨盤腔内投与では実験開始後1時間より胸腔最背側に位置する胸管や胸椎側リンパ幹管において、すでにそれが描出され、2時間半ではさらに強くなっていた。これは腹腔後部および骨盤腔内のリンパ排導が胸椎側リンパ幹管や胸管によることを示唆するものである。このように今回の実験では第二章のラットにおける観察と同様、イヌでも腹膜腔からの主排導路は、腹膜腔内の含有物質の滞在時間が長いほど、あるいは腹膜腔内の含有物質が腹腔内のどこに存在するかという位置によって変わることが明らかになった。イヌの場合、従来から腹膜腔からのリンパの排導には胸管はほとんど関与していないという考え方が支配的であり、実際、今回の実験例でも、そのような結果が見られた。しかし、その場合は India ink の投与が腹膜腔内に限定され、観察も投与後1時間以内の短時間に行われた場合のものであり、比較的長い時間の腹膜腔内および骨盤腔内投与などを行った実験の結果では、胸管も主要な排導路であることが示された。本実験では、数個体で腹膜腔からの India ink の逆流による漏出が見られた。このことから腹膜腔から吸収された細胞はリンパ行性に末梢リンパ節に向かうことが明らかになり、これらの経路が腹膜腔からの癌細胞などの転移経路のひとつになりうる可能性を示した。

以上、本研究により腹膜腔内からのリンパ排導を精査した結果、①リンパの「取り込み口」となる横隔膜腹膜上に開く stomata は、腹膜腔内への粒子投与で stomata の拡大が見られたこと、およびその分布には明らかな部位差が見られ、横隔膜右側に多いことが明らかになった。また、②腹膜腔内に India ink を投与した場合、ラットおよびイヌで比較的早い時間から胸腔腹側を走る内胸リンパ幹管を経て、胸骨リンパ節および前縦隔リンパ節に還流する経路が観察されたが、時間を経るにしたがって胸腔内の中位構造である食道に併走するリンパ管、横隔神経に併走するリンパ管、後大静脈に併走するリンパ管から、胸腔背部を走る胸椎側リンパ幹管や胸管などに還流経路が広がることが明らかになった。しかし、③体腔の後方である骨盤腔内の投与では、早い時間から胸腔背部を走る胸管が主要な還流経路になり、排導される物質が体腔内のどこにあるかによって排導経路が異なることも明らかになった。つまり一般的には、四足歩行動物では腹膜腔内からのリンパおよびその含有物質の排導には、

胸腔底部にあるリンパ管が主要な還流路として考えられていたが、同時に胸腔背部を走る胸管も重要な役割を果たしていることが明らかになった。このことは腹膜腔からのリンパ排導には胸管はほとんど意義を持たないという従来の説とは異なる結果であった。

論文審査の結果の要旨

体内では1日数百 ml から数 l のリンパ（組織間液）が産生されている。リンパは組織を流れる血液の液体成分（血漿）の約 10% に相当し、組織間から盲端に始まるリンパ管に吸収され、次第に合流して太くなり最終的に静脈系に合流する第 2 の循環系である。リンパ管に入ったリンパの中には細胞の代謝産物や細胞の小片、リンパ球などの免疫担当細胞ならびに腫瘍細胞などを含む場合があり、それらを含んだリンパは呼吸運動や筋肉運動などにより、比較的ゆっくりリンパ管を移動し、その間にリンパ中の異物は次第に浄化される。このようなリンパの浄化や生体防御において、リンパ管の途中に作られる生物学的ろ過装置であるリンパ節は大きな役割を果たしている。これらのリンパ節は一定の末梢領域から全身循環系へとつづく一連のリンパの排導経路の途中に形成されるので、領域リンパ節として知られている。これらのリンパ排導路の走行上の特徴は、ある特定領域からリンパ管内を進むリンパ（リンパ液とその含有物）の進路がほぼ一定していること、ならびに、その途中に形成される領域リンパ節があらかじめ予測できることである。したがって、リンパの排導路を解明することは、リンパ行性に広がる病原体や腫瘍細胞の追跡を可能にするため、臨床的な意義がきわめて大きい。

これらのことから著者は、体表のリンパ排導に関する情報に比較して、蓄積の少ない腹膜腔内のリンパの排導が、腹腔内最大の吸収器官である横隔膜を介して体内をどのように排導されるかということ明らかにする目的で、ラットおよびイヌを用いて解剖学的検討を行った。

著者は、はじめにリンパの吸収の場となる横隔膜の腹膜表面形態、特に「取り込み口」といわれる stomata（篩状斑）について、その形態、大きさおよび分布について観察した（第一章）。次に、横隔膜吸収後のリンパの排導路を検討するため、実験的に腹膜内に投与された物質が、横隔膜を経て胸膜側に至った後、どのような排導路を辿って血液循環系に流入するかについて、ラットならびにイヌを用いて時系列的に検討した（第二章・第三章）。

第一章では横隔膜腹膜面における stomata の表面形態について検討した。横隔膜腹膜表面を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察した結果、腹膜中皮は大型扁平上皮であり、細胞表面には散在する微絨毛を認め、さらには細胞間接合部には微絨毛が重なり密在しており、細胞の境界が明瞭であったことを報告している。横隔膜の「取り込み口」である stomata はそれら各上皮細胞間隙の開口部として見られ、stomata の大きさ（直径）は無処置ラットで平均 $5.81 \mu\text{m}$ （範囲： $2.5\text{-}10 \mu\text{m}$ ）であったものが、ラテックス粒子の腹腔内投与後には stomata は大きく開口したことを明らかにしている。平均 $8.9 \mu\text{m}$ （範囲： $2.8\text{-}20 \mu\text{m}$ ）になっていたとの興味ある結果を示している。また、同様に腹腔内にラテックス粒子を投与して、3 分間の時間経過後、横隔膜を背腹側ならびに左右側に四分割して、筋部および腱中

心を含む横隔膜全表面の stomata の数を SEM で得られた写真上で計測した結果、また stomata は横隔膜腹膜側の左側部に比べ右側部に有意に多く見られ、その中でも右腹側部（筋部）に最も多く見られたことから、横隔膜腹膜面における stomata の分布は横隔膜全体に一様ではなく、明らかな部位差があるとの報告もしている。横隔膜の凍結切断標本では腹膜中皮と、より深層の横隔膜筋線維との間に横隔膜中皮下リンパ腔を認め、横隔膜中皮下リンパ腔では、その位置から横隔膜筋線維の緊張と弛緩でリンパ腔の内皮細胞間の間隙が変化して、腹腔内から stomata を通じて横隔膜リンパ系へリンパが吸収されやすくなることを考えた。横隔膜の stomata はその機能から、臨床的には、腹膜腔内投与物質の全身循環への吸収口となることや腹水中に含有する癌細胞の播種性転移との関連について考察した。

第二章ではラットの横隔膜からのリンパ排導について検討した。ラットの腹膜腔からのリンパ排導に関しては、腹膜腔に排出されたリンパ液あるいはその含有物質が横隔膜を通過した後、具体的に、どのような経路で排導されていくかについて時系列的に解剖学的な観察を進めた。著者は本実験に先立って、実験1として腹腔内に投与される India ink の有用性に関する検討を行った。その結果、生理的食塩水を溶媒とした India ink および EL-3 号を溶媒とした India ink の両者とも排導状態の安定性が確認された。この実験1を経て、筆者は実験2としてラットの腹膜腔内に生理的食塩水に溶かした India ink を投与して、各排導路の時系列的な排導状況を比較した。その結果、最も早期に排導が見られたのは、横隔膜や肋間から起こり、胸壁腹側の内胸動脈・静脈に沿って走る内胸リンパ幹管や、横隔神経や後大静脈に沿って胸郭前口に向かって進むリンパ管で、これらのリンパ管はともに上前縦隔リンパ節内側群に還流していた。一方、胸大動脈右側を併走する胸管に還流する経路は2時間経過後はじめて、実験に供した全ての個体にこの経路を確認した。また、India ink の還流を受ける胸腔内の上前縦隔リンパ節では右側にあるものの方が、左側にあるものより India ink の流入量が多いことを観察した。一部の個体では、左右の内胸動脈に沿う内胸リンパ幹管、横隔神経に沿うリンパ管、より背側の右側胸椎側リンパ幹管から、頸部の浅頸リンパ節および腋窩リンパ節に India ink の漏出を観察した。本章の研究は排導の速さに、各排導路間で差が見られることを実験的に明らかにした最初の報告となる。

第三章ではイヌの横隔膜からのリンパ排導について検討した。具体的には本研究はイヌの腹膜腔と骨盤腔からのリンパ排導を観察する目的で、リンパの排導経路を時系列的に観察した。その結果、腹膜腔内投与後30分ではラットと同様に、India ink は胸腔底部を走行する内胸動・静脈に沿った内胸リンパ幹管のみを描出していた。この経路では India ink は胸骨リンパ節を中継し、最終的には左右側とも前縦隔リンパ節へ流入が見られたという。また左右のリンパ管の描出の濃淡差では右側の内胸リンパ幹管が極めて濃く現れ、多量の India ink の取り込みを認めたという。腹膜腔内投与後1時間では、左右の内胸リンパ幹管に加え、新たに食道表面の左迷走神経に沿って走行するリンパ管の経路も観察した。この経路はその途上、気管分岐下リンパ節や左気管支リンパ節を経由し、最終的に左右の前縦隔リンパ節に続いていることも確認した。一方、腹膜腔内投与後2時間30分および骨盤腔内投与

1時間では、左右の内胸リンパ幹管、迷走神経に沿うリンパ管に加え、胸椎側リンパ幹管、胸管の経路を観察した。さらに胸椎側リンパ幹管からは肋間リンパ管への漏出と見られる所見も得た。また、浅頸リンパ節へのIndia inkの流入が見られ、胸骨リンパ節からの漏出があったものと考えた。

本研究により著者は四足歩行動物では、従来から腹膜腔からのリンパの排導には胸管はほとんど関与していないという定説的な考え方に対して、胸腔背部を走行する、胸管も主要な排導路であることを実証した。すなわち、腹膜腔からのリンパの排導は、排導されるリンパの体腔内での滞留時間と滞留場所の違いによっては、複数の排導路が、同時に重要なリンパの排導経路としての役割を持つことを明らかにした。また各リンパ排導路における領域リンパ節を精査したことで、腹膜腔からのリンパの排導経路の全容解明に繋がった。このことから本研究は、腹膜腔内からのリンパの排導経路について、解剖学的な記載をあらたに加えたばかりでなく、本研究を通して明らかになった結果が、将来の臨床応用への道を開いたことで獣医学上意義ある業績であると評価でき、博士（獣医学）の学位授与に値するものと認める。