

## 学位論文題名

スリットレーザ光を用いた蛍光生体顕微鏡法によるラット腸間膜  
集合リンパ管の蛋白濃縮輸送機能の解明

## 学位論文内容の要旨

リンパ系は、血漿容積の維持、組織内水分調節、脂肪・蛋白の輸送、リンパ球の輸送、リンパ節での免疫反応と有害物質のフィルター作用、などの働きを通して生体のホメオスタシス維持に重要な役割を果たしている。

このリンパ管の機能うち、リンパ管自発性収縮やリンパ管周囲組織からの外力によるリンパ輸送のメカニズムについては、近年、*in vivo*あるいは*in vitro*実験によって詳しく研究されてきた。一方、リンパの蛋白濃度に関する流れを考慮した直視下の研究は、計測技術の困難さから十分に行われていない。そのためリンパ管は単に物質を輸送するだけの経路として考えられてきたが、近年リンパ管からのサンプリングによって、リンパの蛋白濃度が末梢から胸管へ進むにつれて次第に高くなることが知られるようになった。また、リンパ管像影によっても同様の知見が得られているが、そのリンパ輸送過程に於ける蛋白の高濃度化現象の機序については今日まで解明されていない。本研究はこの蛋白濃縮輸送機能を解明するため、生体顕微鏡を用いラット腸間膜集合リンパ管を流れるリンパの濃度を、蛍光トレーサ（フルオレセイン・イソチオシアネートで蛍光標識したデキストラン、FITC-Dx : MW148,900）法によって*in vivo*下に観察した。この収縮弛緩運動を伴うリンパ管観察に、従来の透過光あるいは落射光照明による蛍光生体顕微鏡を使用した場合、リンパ管を通過する励起光によって顕微鏡焦点面以外の蛍光色素も励起されるため、蛍光情報の重畳が妨げとなり定量的な計測が困難とされてきた。この問題を解決するために、本研究ではリンパ管の内径よりも十分に薄い、厚さ20 $\mu$ mのレーザ光を斜め上方から励起光として照射する蛍光生体顕微鏡システムを開発した。斜めに進む薄い帯状のレーザ光は、顕微鏡焦点面に対して一定の厚さで蛍光色素を励起する為、リンパ管の内径に関係なくリンパのトレーサ濃度変化の定量的な計測を可能にした。そして、この開発した顕微鏡システムを用いて、リンパ管の収縮弛緩運動がリンパ輸送と同時に蛋白の濃縮に重要な役割を果たしていることを*in vivo*実験によって明らかにし、更にその生理学的意義を明らかにすることが、本研究の目的であ

る。

第1章は序論として、生体顕微鏡を用いた微小循環観察法の現状とその問題点を述べ、本研究の目的と意義を明示した。

第2章では、第4章で説明するラット腸間膜集合リンパ管の蛋白濃縮輸送機能の生理学的特徴を理解するため、リンパ間質液循環について文献を基に解説した。

第3章では、微小リンパ管内を流れる蛍光トレーサ濃度を計測・定量化するために開発された蛍光生体顕微鏡システムについて説明し、*in vitro* 試験による使用特性の検討結果を示した。

開発したスリットレーザ照明蛍光生体顕微鏡システムは、励起光照明に特徴があり、リンパ管の内径より十分に薄い、厚さ $20\ \mu\text{m}$ のレーザ光を試料面に対し斜め上方から照射する。顕微鏡対物レンズの面に対して斜めに進むレーザ光は、対物レンズの焦点面で一定の厚さの蛍光トレーサを励起する為、一般の照明法で問題となる試料の厚さに依存した蛍光の重畳問題は無く、定量的なトレーサ濃度の計測を可能とする。この顕微鏡システムの使用特性は、リンパ管にみためた微小ガラス管に FITC-Dx 溶液を封入し、テーパー部位での濃度計測を行う *in vitro* 試験によって検討した。その結果、スリットレーザ照明蛍光生体顕微鏡システムは、試料の厚さが $50\sim 200\ \mu\text{m}$ の範囲で FITC-Dx 溶液の濃度を定量的に計測できることが確認された。第4章で対象とするラット腸間膜集合リンパ管の収縮弛緩運動時の直径は $50\sim 200\ \mu\text{m}$ の範囲にあり、本計測システムによる *in vivo* 実験での定量的な計測が可能であることが示された。また、本計測システムを *in vivo* 計測に用いる際の諸条件を決定した。

第4章では、第3章の蛍光生体顕微鏡システムを用いて、ラット腸間膜集合リンパ管内のトレーサ濃度変化を計測した結果を示し、リンパ管の蛋白濃縮輸送機能を解明すると共にその機序について考察した。

分岐合流のない集合リンパ管に沿って上流・中流・下流の三点でトレーサ濃度を計測した結果、上流に比べ下流では濃度が統計的に有意に増加していることが認められた。

トレーサ静注10分後に得られたリンパ管の直径とリンパのトレーサ濃度の経時変化では、データ時系列の一部で収縮期に濃度が増加し拡張期に減少する傾向が見られるが、リンパ管の直径と濃度の明確な関係はつかめなかった。この理由としては、リンパ管の収縮弛緩運動によって、観察部位のリンパ液に上流からの異なった濃度のリンパ液が流入するため、リンパ管収縮とその運動によるトレーサ濃度変化との直接的な関係が得られなかったことによると考えられた。そこで、リンパ管の下流側・上流側を二本の血管縫合糸で結紮し上流からのリンパの流入を防ぎ、そ

のリンパ管閉塞部位でのリンパ管の収縮弛緩運動とトレーサ濃度の関係を調べた。その結果、リンパ管の直径とトレーサ濃度の経時変化は、収縮期に濃度が増加し拡張期に濃度が減少している傾向を顕著に示した。更に、直径と濃度の相互相関関数については、時間遅れ無し逆位相の関係を強く示した。また、この直径と濃度のデータを基に二者の逆位相の関係を相関回帰分析すると、負の傾きを持った回帰直線となり、その回帰係数は0.1%レベルで統計的に有意であった。すなわち、リンパ管の収縮期にトレーサ濃度が増加し拡張期に濃度が減少していることが定量的に確認された。

以上の結果を基に考察を示すと、リンパ管の蛋白濃縮輸送現象の機序については、毛細血管系に於ける Starling の水分調節機構と同様に、静水圧と膠質浸透圧によるリンパ管壁を介する水分濾過によるものと推察される。リンパ管壁の水分濾過、蛋白の非透過性を仮定すると、文献値を基に集合リンパ管壁を介して生じる静水圧差、膠質浸透圧差による水分駆動力は、収縮期に+4.5mmHg 程度となりリンパ管内から組織への水分濾過が生じ、また拡張期生には-0.5mmHg 程度となりリンパ内への若干の水分の再吸収が生じていると示唆される。

集合リンパ管の蛋白濃縮輸送機能の生理学的意義については、特に次の点にあると考えられる。一つは、リンパの脂質や蛋白の輸送の際、その輸送効率を上げるのに重要であると考えられる。蛋白濃縮輸送機構による蛋白の輸送効率は、粘性による損失を考慮しても、十分に良くなっていると考えられる。

もう一つの重要な役割は、局所的な浮腫を改善する働きである。先に述べたように、リンパ管壁を介して水分濾過が生じているとすると、静水圧の上昇した浮腫組織からのリンパが正常組織を通過する過程で組織へ濾過される。また、浮腫組織からの低膠質浸透圧であるリンパは、水の引込が弱いため相対的に組織への水分濾過を促進する。従って、局所的に発生した浮腫の過剰な組織液は、リンパ管の蛋白濃縮輸送機構によって正常組織へ分散される。これは、浮腫に対する防御因子の一つとして、重要な役割を果たしていると考えられる。

第5章では、本研究の結論を要約した。

第6章では、今後の課題について述べた。

## 学位論文審査の要旨

主査	教授	勇田	敏夫
副査	教授	山本	克之
副査	教授	狩野	猛
副査	教授	神谷	瞭

近年、生体顕微鏡を用いた微小循環における物質移動あるいは物質輸送に関する研究が盛んに行われている。しかし、従来の透過型あるいは落射型照明による蛍光生体顕微鏡観察は、顕微鏡対物レンズの焦点面前後から重畳する蛍光が妨げとなり、組織や血管系での蛍光物質濃度の定量化は困難であった。

本論文は、ラット腸間膜集合リンパ管を流れるリンパの蛍光物質（Fluorescein isothiocyanate labeled dextran, FITC-Dx ; MW148,900）濃度を計測・定量化するための蛍光生体顕微鏡システムを試作し、リンパ管の収縮弛緩運動がリンパ輸送と同時に蛋白（macromolecules）の濃縮に重要な役割を果たしていることを *in vivo* 実験によって示すと共にその生理学的意義を明らかにすることを目的としたものである。

第1章は序論として、生体顕微鏡を用いた微小循環観察法の現状とその問題点を述べ、本研究の目的と意義を明示している。

第2章では、第4章で解明するラット腸間膜集合リンパ管の蛋白濃縮輸送機能の生理学的特徴を理解するため、リンパ間質液循環について文献を基に解説している。

第3章では、第4章の動物実験に於ける微小リンパ管内を流れる FITC-Dx 濃度を計測・定量化するための蛍光生体顕微鏡システムを試作し、*in vitro* 試験による使用特性の検討結果を示している。

試作蛍光生体顕微鏡システムは、励起光照明に特徴があり、厚さ20 $\mu$ mのスリット状のレーザー光を試料面に対し斜め上方から照射する。顕微鏡対物レンズの面に対して斜めに進むレーザー光は、対物レンズの焦点面で一定の厚さの蛍光トレーサを励起する為、一般の照明法で問題となる試料の厚さに依存した蛍光の重畳問題は無く、定量的な FITC-Dx 濃度の計測を可能にしている。この顕微鏡システムの使用特性は、*in vivo* 実験で対象とするラット腸間膜集合リンパ管をモデルとした微小ガラス管に FITC-Dx 溶液を封入し、テーパー部位での濃度計測を行う *in vitro* 試験によって検討している。その結果、同一濃度の FITC-Dx 溶液が、テーパーによるガラス

管の太さにかかわらず同濃度の測定値を示している。したがって本蛍光生体顕微鏡計測システムは、試料の厚さが50~200  $\mu$  mの範囲で FITC-Dx 溶液の濃度を定量的に計測できることを示している。

第4章では、第3章の蛍光生体顕微鏡システムを用いて、ラット腸間膜集合リンパ管内の FITC-Dx 濃度変化を計測した結果を示し、リンパ管の蛋白濃縮輸送機能を解明すると共にその機序について考察している。

分岐合流のない集合リンパ管に沿って上流・中流・下流の三点で FITC-Dx 濃度を計測した結果、上流に比べ下流では濃度が統計的に有意に増加していることを示している。

FITC-Dx 溶液静注後に得られたリンパ管の直径とリンパの FITC-Dx 濃度の経時変化では、データ時系列の一部で収縮期に濃度が増加し拡張期に減少する傾向が見られるが、リンパ管の直径と濃度の明確な関係は得られていない。この理由として、リンパ管の収縮弛緩運動によって、観察部位のリンパ液に上流からの異なった濃度のリンパ液が流入するため、リンパ管収縮とその運動による FITC-Dx 濃度変化との直接的な関係が得られなかったとしている。そこで、この点を明らかにするためリンパ管の下流側・上流側を二本の血管縫合糸で結紮し上流からのリンパの流入を防ぎ、そのリンパ管の収縮弛緩運動と FITC-Dx 濃度の関係を調べている。その結果、リンパ管の直径と FITC-Dx 濃度の経時変化は、リンパ管の収縮期に濃度が増加し拡張期に濃度が減少していることを定量的に示している。

第5章では、本研究の結論を要約している。

以上のように本論文は、スリット状のレーザ光を蛍光生体顕微鏡の照明に適用した新たな計測システムを開発し、従来の顕微鏡観察で不可能であったリンパ管内蛍光標識物質 (FITC-Dx) 濃度の定量的な計測を可能にしたものである。また、リンパ管の収縮弛緩運動がリンパ輸送機能と同時に蛋白 (大分子物質) 濃縮機能に重要な役割を果たしているという新知見を得ている。この生理学上重要な知見は、本研究のスリット状のレーザ光を照明とする顕微鏡システムとその計測法によって初めて得られるものであり、著者は、学際領域に於ける生体工学の進歩に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。