

博士(医学) 田中宏樹

### 論文題目

Loss of lymphatic vessels and regional lipid accumulation is associated with great saphenous vein incompetence

(リンパ管の欠落と局所的な脂質蓄積は大伏在静脈不全に関係する)

### 論文の内容の要旨

#### [はじめに]

一次性下肢静脈瘤(VV)は、大伏在静脈(GSV)の静脈逆流を防止する静脈弁の組織変性により発症すると考えられていたが、近年は、静脈弁を含まない部位の静脈組織の変性も病態に深く関与していることが示唆されている。

これまでに、我々は GSV の静脈弁不全領域には特異的な脂質分子が蓄積することを質量顕微鏡法(IMS)により明らかにした。これらの分子は、Lyso-phosphatidylcholine (LPC)、Arachidonoyl phosphatidylcholine、Sphingomyeline など炎症に関与している脂質分子であった。

本研究では、弁組織を含まない VV 患者の静脈壁について IMS により解析した。

#### [患者ならびに方法]

対象は、浜松医科大学第二外科(血管外科)で、VV に対してストリッピング手術を施行した 38 例 50 肢とした。VV 患者は臨床病期分類の皮膚症状の有無によって、軽症の C2-3 群 22 例 27 肢と重症の C4-5 群 16 例 23 肢の 2 群に分類した。コントロール群として、閉塞性動脈硬化症のためバイパス手術を施行した 10 例から、静脈グラフトとして採取した GSV を用いた。採取された組織は、いずれも速やかに液体窒素を用いて急速凍結し、-80 度で保存した。

解析は、ヘマトキシリン・エオジン染色、エラスチカ・ワンギーソン染色に加えて、脂肪染色として広く利用されるオイルレッド O 染色を実施し、病理組織像を観察した。脂質分子の定量として、静脈壁内の脂質抽出を実施し、phosphatidylcholine(PC)と、triglyceride(TG)について比色法で測定した。IMS は、安息香酸を基質に用い、陽イオンモード、解像度 50  $\mu$  m、質量・電荷比 400-1000 の範囲で実施し、静脈壁における脂質分子の局在を解析した。

さらに、脈管構造の把握のために、血管内皮、リンパ管内皮について免疫組織染色を実施した。

#### [結果]

患者背景については、年齢、性別、血清脂質濃度(総コレステロール、中性脂肪など)、ヘモグロビン A<sub>1c</sub> 値ではコントロール群、VV の 3 群間に有意差を認めなかった。

病理組織像からは、VV 群ではコントロール群より有意に静脈壁が肥厚していたが、VV 患者においては、C2-3 群と C4-5 群では壁の厚さ有意差はなかった。脂肪染色であるオイルレッド O 染色では、VV 群の外膜側のみが染色された。

さらに静脈壁組織中の脂質定量では、VV群がコントロール群より有意に高値を示したが、VV患者では、C2-3群とC4-5群間に有意な差はなかった。これらの結果から、VVの静脈壁には脂質の蓄積があり、特に外膜に顕著であることが示唆された。

IMS解析では、静脈壁から無数のスペクトルが検出され、タンデムMS法により、9つの分子が同定された。VV患者では、LPC、Arachidonoyl PCは、内膜、中膜、外膜の全層において、コントロール群に比べて有意に強いイオン強度を示したが、VV患者では、C2-3群とC4-5群間に有意差はなかった。また、TGはVV患者の外膜にのみ、有意に強いイオン強度を示したが、C2-3群とC4-5群間に有意差はなかった。

血管内皮とリンパ管内皮について免疫組織染色を行うと、リンパ管内皮抗体の陽性である vasa lymphatics は静脈壁の外膜に局在していた。また、VV患者では静脈壁外膜に分布する vasa lymphatics の数が、コントロール群に比べて有意に減少していた。VV患者では、C2-3群とC4-5群間に有意差はなかった。

#### [ 考察 ]

静脈壁の肥厚は、過去に報告されているように慢性炎症による結果と思われる炎症性脂質の蓄積は静脈弁だけでなく、弁を含まない部位の静脈組織にも蓄積していた。これらは、内膜、中膜、外膜のいずれにも蓄積しており、慢性炎症が広く静脈組織内で生じていることを示唆している。

さらに、今回我々の同定した脂質の中で、TGはVV患者の外膜にのみ蓄積することが明らかになった。これまで、VVの病態は主として内膜、中膜の変性に注目されてきたが、外膜についての知見は乏しい。今回、静脈外膜に分布するリンパ管の欠落が明らかとなったが、リンパ管が高分子タンパクの運搬のみならず、脂質の運搬にも大きく関与していることを考慮すると、静脈瘤壁外膜へのTGの特異的な蓄積は、リンパ管によるリンパのドレナージ能の低下に伴う、組織中のリンパ停滞に起因する可能性がある。静脈とリンパ管は、共に組織間液をドレナージする重要な役割を担っており、相互に組織の恒常性を維持している。VV患者における静脈壁組織の変性は、静脈の透過性を亢進させることにより、組織内圧の上昇、組織間液を増加させ、その結果リンパ管ドレナージ機能に対しては過負荷状態となる。その結果、リンパ管の変性、機能低下を生じさせた可能性がある。リンパの停滞は免疫能の低下、慢性炎症にも関与し、炎症性サイトカインの停滞により、慢性炎症とも関連があると言われている。静脈とリンパ管不全の混合した病態は、phlebolympatology という疾患概念として知られているが、いまだ不明な点が多く、更なる研究が必要である。

#### [ 結論 ]

VV患者のGSV壁には、炎症に関与する脂質分子であるLPCとArachidonoyl PCの蓄積がIMS解析により明らかになった。これらの蓄積は、VVの病態に関与していることが示唆された。さらに、静脈不全を伴うGSVの外膜中に分布する vasa lymphatics のリンパ管がVV患者では減少していたことから、異常な脂質蓄積の原因としてリンパ管の欠落が関係しており、二次的に静脈壁の組織変性を惹起する可能性が考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

一次性下肢静脈瘤(VV)の発症機序として、静脈弁組織変性ととも弁を含まない静脈部位の組織変性も病態に深く関与していることが示唆されている。

申請者らは本研究で、VV 患者の大伏在静脈(GSV)における弁組織を含まない静脈壁の変化を質量顕微鏡法(IMS)等により解析した。

対象は、浜松医科大学第二外科(血管外科)で VV に対してストリッピング手術を施行した 38 例 50 肢とした。VV 患者は臨床病期分類の皮膚症状の有無によって、軽症の C2-3 群 22 例 27 肢と重症の C4-5 群 16 例 23 肢の 2 群に分類した。コントロール群として、閉塞性動脈硬化症のためバイパス手術を施行した 10 例から、静脈グラフトとして採取した GSV を用いた。病理組織像、脂肪染色および静脈壁組織中の脂質定量から、VV の静脈壁には脂質の蓄積があり、特に外膜に顕著であることが示唆された。一方、VV の臨床病期による差は認められなかった。IMS 解析、さらにタンデム MS 法により、静脈壁から 9 つの分子が同定された。VV では、内膜、中膜、外膜の全層において Lyso-phosphatidylcholine (LPC)、Arachidonoyl PC の有意に強いイオン強度が認められた。TG は VV 患者の外膜にのみ有意に強いイオン強度を示した。これらの変化に C2-3 群と C4-5 群で有意差はなかった。血管内皮とリンパ管内皮の免疫組織染色では、リンパ管内皮抗体陽性となる vasa lymphatics は静脈壁の外膜に局在していたが、VV 患者ではその数がコントロール群に比べて有意に減少していた。

申請者らは本研究により、VV 患者の GSV 壁において炎症に關与する脂質分子である LPC と Arachidonoyl PC が異常に蓄積し、さらに外膜にのみ TG が蓄積し、そこではリンパ管が減少していることを初めて明らかにした。その成果は、VV の病態として、弁以外の静脈組織変性、特に外膜についての新知見を IMS を活用し提示したものと高く評価される。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 渡邊 裕司  
副査 浦野 哲盟 副査 平川 聡史