

【27】

氏 名	まつ であ しゅうたろう 松 寺 翔太郎
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第792号
学位授与の日付	令和3年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (腫瘍外科学)
学位論文題目	Histopathological evaluation of the effectiveness of oral Eppikajutsuto treatment for lymphatic malformation (リンパ管奇形に対する越婢加朮湯経口投与の効果に関する病理組織 学的評価)
論文審査委員	(主査) 教授 吉 原 重 美 (副査) 教授 石 田 和 之 教授 藤 田 朋 恵

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

リンパ管腫は頸部、胸腹壁、四肢、腋窩、腹腔内を好発部位とするリンパ管の発生異常である。OK-432やブレオマイシンを用いた硬化療法と外科的切除が標準的治療法としてほぼ確立している。一方で、特に小児ではリンパ管腫が神経や血管、隣接臓器を圧迫し生命に危険を及ぼす場合があり、また約20%は硬化療法や切除が困難な難治性症例である。難治性症例に対しては越婢加朮湯などの利水作用をもつ漢方方剤を用いた症例報告が散見されるが、未だエビデンスに乏しいのが現状である。

【目 的】

研究の目的は、リンパ管奇形に対する越婢加朮湯経口投与の効果を病理組織学的に解明することである。

【対象と方法】

研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得たのち、獨協医科大学動物実験規程に従って行った。

獨協医科大学実験動物センターにおいて6週齢のC57BL/6系マウス12匹にアジュバント（Freund's incomplete adjuvant：FIA）懸濁液（FIA：リン酸緩衝生理食塩水=1：1）を1回0.2mL腹腔内に投与し、2週間後に同じ用量で再度腹腔内投与した（計2回）。

実験1：リンパ管奇形モデルマウス12匹を、越婢加朮湯投与群（0.15 g/kg/回 1日2回）6匹（治療群）と蒸留水投与群6匹（コントロール群）の2群に分け、2カ月間強制経口投与し病理組織学的

評価を行った。

実験2：薬剤濃度による効果の違いを確かめるために、追加の検討として、リンパ管奇形モデルマウス20匹を5匹ずつ、コントロール群（0g）、等倍治療群（0.3g/kg/day）、5倍治療群（1.5g/kg/day）、10倍治療群（3.0g/kg/day）の4群に分け、越婢加朮湯を2か月間自由経口摂取させ、病理組織学的評価を行った。

病理組織学的評価方法：マウスを安楽死させ、病変部位である腹膜や腸間膜を中心に摘出した。摘出組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、免疫染色（lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1：LYVE-1）を行い、リンパ節の数、リンパ節の面積、リンパ管の面積を各群で比較した。リンパ液の鬱滞の程度を正確に比較するために、リンパ管面積の測定範囲を「リンパ節被膜から1mmの範囲にあるリンパ管の面積」と定義した。また、各群のマウスの体重変化量についても比較検討した。

統計学的手法：Mann-WhitneyのU検定を行い、各群の比較検討を行った。統計学的有意水準を5%とした。

【結 果】

FIA腹腔内投与により、横隔膜下、腸間膜、肝門部を中心とした腹腔内には2mm以内の白色病変が散在性に認められた。この白色病変は異物肉芽腫で構成されていた。また腸間膜や腹膜の脂肪組織の小葉間隔壁には拡張したリンパ管が確認された。腹腔内にびまん性の炎症所見や腹水の貯留は認めなかった。その他、肝臓、腎臓、心臓、肺には病理学的な変化は認めなかった。

実験1：治療群とコントロール群で比較したところ、リンパ管面積は治療群で有意に縮小した（ $P=0.039$ ）。体重変化、リンパ節数、リンパ節面積に関しては統計学的な有意差は認めなかった。

実験2：コントロール群、等倍治療群、5倍治療群では体重は増加したが、10倍治療群では等倍群と比較し有意に体重が減少した（ $P=0.014$ ）。リンパ節面積についてはコントロール群と比較し5倍治療群において有意に縮小していた（ $P=0.027$ ）。またリンパ管面積についてはコントロール群と比較し10倍治療群において有意に縮小が認められた（ $P=0.027$ ）。一方で、リンパ節数については各群間に統計学的な有意差は認められなかった。

【考 察】

近年、リンパ管奇形に対する越婢加朮湯経口投与の効果に関する臨床的有用性の報告が増えてきている。小川らは縦隔巨大リンパ管腫をもつ2歳男児に対し越婢加朮湯と黄耆建中湯を投与し病変の縮小が得られたと報告した。その後いくつかの報告があったが、既存の報告は臨床的な症例報告であり、越婢加朮湯の治療効果を科学的エビデンスとして提供するものではなかった。そこで本研究では、Mancardiらの手法により作成したリンパ管奇形モデルマウスに対し、越婢加朮湯を経口投与することで、病理組織学的に評価及び検討を行った。

肉眼所見では主に横隔膜下、肝門部、腸間膜を中心に白色病変を認め、既存の報告と同様の結果であった。病理組織学的評価ではリンパ管の拡張を認め、腸間膜や腹膜のリンパ液の鬱滞が示唆された。越婢加朮湯を強制経口投与（実験1）もしくは自由経口投与（実験2）することで、コントロー

ル群と比較し有意にリンパ管面積が縮小することを明らかにした。しかし今回の研究で分子生物学的な機序の解明には至っていない。越婢加朮湯は石膏、麻黄、蒼朮、大棗、甘草、生姜の6種類の生薬から構成される。これらの構成生薬が炎症や水分調整をコントロールしていることが推測される。

本研究における実験2では、治療に適した越婢加朮湯の投与量を検討した。マウスの体重は越婢加朮湯濃度の上昇に伴い減少する傾向が見られた。これは越婢加朮湯の抗炎症作用と抗浮腫効果によるものと考えられる。また摂餌量は各群でほぼ同量であったが、越婢加朮湯濃度の上昇に伴いわずかに摂餌量は減少していた。これは越婢加朮湯の独特な臭いがマウスの嗜好性に影響したものと考えられる。

今後越婢加朮湯の構成生薬の詳細な薬物動態を明らかにすることにより、リンパ管奇形に対する新規治療戦略を確立させることが出来るものと思われる。

【結 論】

本研究はリンパ管奇形に対する越婢加朮湯の効果を、リンパ管奇形モデルマウスを用いて病理組織学的に解明した初めての比較試験である。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

リンパ管奇形はヒトの発生過程においてリンパ流が鬱滞または遮断することで発生すると考えられている。硬化療法と外科的切除が標準的治療法としてほぼ確立しているが、約20%は難治性であり、特に小児ではリンパ管奇形が神経や血管、隣接臓器を圧迫し生命に危険を及ぼす場合がある。近年、難治性症例に対し越婢加朮湯などの利尿作用をもつ漢方方剤を用いた症例報告が散見されるが、未だエビデンスに乏しいのが現状である。申請論文では、既存の報告に準じてリンパ管奇形モデルマウスを作成し、マウスに越婢加朮湯を経口投与させ、その効果を組織学的に明らかにすることを目的とした。リンパ管面積の測定範囲を「リンパ節被膜から1000 μ mの範囲のリンパ管面積」と定義をして組織学的に評価した。実験1として、リンパ管奇形モデルマウス12匹を、越婢加朮湯投与群（0.15g/kg/回 1日2回）6匹（治療群）と蒸留水投与群6匹（コントロール群）の2群に分け、2か月間強制経口投与させたところ、治療群においてコントロール群と比較し有意にリンパ管面積が縮小することを明らかにした（ $p=0.039$ ）。また、実験2では、越婢加朮湯の濃度による効果の違いを検証するため、リンパ管奇形モデルマウス20匹を5匹ずつ、コントロール群（0g）、等倍治療群（0.3g/kg/日）、5倍治療群（1.5g/kg/日）、10倍治療群（3.0g/kg/日）の4群に分け、越婢加朮湯を2か月間自由経口摂取させた。その結果、リンパ管面積はコントロール群と比較し10倍治療群において有意に縮小が認められた（ $p=0.027$ ）。以上の結果から、申請論文では越婢加朮湯がリンパ流の鬱滞を改善させ、その効果は用量依存的である可能性があると結論付けている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、リンパ管奇形に対する越婢加朮湯の効果を解明するために、リンパ管奇形モデルマウスに越婢加朮湯を経口投与しその効果を組織学的に検証している。

モデルマウスは既報の論文に則り正しく作成され、かつ適切な実験デザインの設定と客観的な統計解析を行っており、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

リンパ管奇形に対する越婢加朮湯の有用性に関する症例報告は近年散見されるが、その機序を解明しようとする研究は現在まで行われていなかった。申請論文ではリンパ管奇形に対する越婢加朮湯経口投与の効果を組織学的に評価し、リンパ管の拡張を縮小させることを明らかにした。この結果は今後の難治性リンパ管奇形に対する治療戦略を変える可能性があり、本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文は、確立された方法で動物実験を行い、その上で適切な統計解析を用いて、リンパ管奇形に対する越婢加朮湯の効果を組織学的に検討している。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、病理学や関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、越婢加朮湯の経口投与がリンパ管の拡張を縮小させることを明らかにした。この結果は、今後のリンパ管奇形に対する越婢加朮湯の効果に関する機序の解明に寄与するものと考えられ、大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、病理学、実験動物学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌への掲載が受理されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Journal of Pediatric Surgery

(56 (9) : 1668-1672, 2021)