



Mysteries in Lymph, Lymphatics, and Lymphoid Tissues

著者名	EZAKI Taichi, KOTANI Masahiko
journal or publication title	東京女子医科大学雑誌
volume	89
number	E1
page range	E4-E65
year	2019-07-31
URL	http://hdl.handle.net/10470/00032758



Mysteries in Lymph, Lymphatics, and Lymphoid Tissues

Taichi Ezaki¹ and Masahiko Kotani²

¹Department of Anatomy and Developmental Biology, School of Medicine, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

²Emeritas Professor, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

(Accepted March 8, 2019)

Lymphology has made remarkable progress in last two decades. Various techniques to identify lymphatic vessels in the body have been developed and brought about great changes in this fields including both basic and clinical research. Although multiple achievements have been made by our predecessors over time, however, many fundamental questions in this field of lymphology still remain unresolved. We recently described these issues in our review articles, titled "Seven Mysteries of the Lymphatics" and "Some Remaining Mysteries in Lymphology: Relationships between Lymph and Fat". In this review, we described several particularly important topics and interesting points being considered from various perspectives by emphasizing the unresolved mysteries.

Key Words: lymph, lymphatic vessel, lymphoid tissue, lymphatic system, fat

Foreword

Lymphology research has greatly progressed in recent years, with the discovery of specific lymphatic endothelial markers and the various factors and genes involved in their proliferation and reproduction, as well as various advancements in diagnostic and clinical technologies. However, while researchers tend to be drawn to discoveries using these new technologies and techniques, would this not lead to overlooking and neglecting older, better-known data and biological phenomena? Although multiple achievements have been made by our predecessors over time, many fundamental questions in this field of lymphology still remain unresolved.

We recently described these issues in our review articles, titled "Seven Mysteries of the Lymphatics"¹ and "Some Remaining Mysteries in Lymphology: Relationships between Lymph and Fat".² While an-

swers to some outstanding questions have been partially answered, new information may be obtained by retracing the flow of our research.

In **Parts 1-4** of this paper, we will describe several particularly important topics and interesting points being considered from various perspectives. This discussion will present these topics using more familiar phenomenology, as well as by using older data, while maintaining a short distance from the latest findings at the molecular and genetic levels. We invite younger researchers and clinicians to join us in understanding the lymphatic system.

Part 1: What is the Lymphatic System?

The lymphatic (vessel) system comprises of the following elements:

i) The entire vascular system lined with characteristic walls through which the lymph flows

Corresponding Author: Taichi Ezaki, Department of Anatomy and Developmental Biology, School of Medicine, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan. ezakit@twmu.ac.jp

doi: 10.24488/jtwmu.89.Extra1_E4

Copyright © 2019 Society of Tokyo Women's Medical University. This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution License (CC BY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original source is properly credited.

Table 1 Techniques mainly used for the observation of lymphatic vessels in the conventional histological methods.

Techniques	Specificity	Reliability	Requirement for skill	References*
Dye injection	– #	±	±	Kutsuna (1968) ¹⁹
Intraarterial injection of AgNO ₂	–	±	+	Mori (1969) ¹³¹
Transmission electron microscopy	–	++	++	Fraley & Weiss (1961) ¹³² Leak & Burke (1968) ¹³³
Scanning electron microscopy				
i) Corrosion casts	–	±	++	Ohtani & Ohtsuka (1985) ¹³⁴
ii) KOH-collagenase treatment	–	±	++	Ushiki (1990) ¹³⁵
Enzyme histochemistry				
5'-Nucleotidase	+	+	+	Kato & Miyauchi (1989) ¹³⁶
Lectin staining	+	++	–	Gnepp (1987) ¹³⁷
Immunohistochemistry	++	++	–	Ezaki et al. (1990) ¹³⁸

* Listed only representative references.

– : negative, ± : weakly positive, +: positive, ++: strongly positive.

(lymph trunks, collecting lymphatics, lymphatic capillaries, lymph sinuses, and lymph sacs)

ii) Supplementary organs for this system include

a) lymphoid tissues (lymph nodes, lymph nodules, and lymph invasions) and b) motile organs (propulsor: lymph heart)

iii) The contents of the system (lymph, chyle)

Depending on the species and its level of phylogenetic differentiation, some of the components listed above may not be present.

1. Structure and functions of the lymphatics

1) Lymphatic capillaries

Lymphatic capillaries are the origins of lymph vessels and begin in blind ends that absorb and drain surrounding interstitial fluid. They are functionally the most important part of the lymphatic system and can absorb almost anything: molecules too large to be taken up by the blood vessels, fats (particularly long-chain fatty acids with 12 or more carbon chain length), cells and foreign bodies. Despite their name, lymphatic capillaries have diameters ranging from few to several times more than those of normal blood capillaries (15-75 and 5-10 μm , respectively). However, the thin walls of the lymphatic capillaries and the transparency of the lymph itself make lymphatic capillaries difficult to distinguish from blood capillaries and tissue spaces by direct observation or under a normal microscope. This is one of the reasons for the delayed research on lymphatic system as compared to vascular system. Moreover, it becomes exceedingly diffi-

cult for an inexperienced individual to identify lymph vessels (**Table 1**). In recent years, however, specific markers and genes expressed in the lymphatic endothelium³ as well as specific lymphatic growth factors have been discovered, and then lymphatic research has undergone great progress, nearly reaching up to the level of vascular research.⁴ Endothelial cells of the lymphatic capillaries are flattened except for their nuclei, which protrude into the lumen with slightly higher abundance of cytoplasm and organelles. Unlike blood capillaries, lymphatic capillaries show extremely poor development of basement membrane, and lack both a continuous basement membrane and adventitial cells. This makes them suitable for the absorption of interstitial fluid, particularly material particulates. When not performing their absorptive function, neighboring endothelial cells shorten the narrow gaps between themselves and overlap with each other. These cells are not bound by tight junctions. Once absorption begins, the spaces between these cells widen to varying degrees. Material particulates such as carbon particles can be taken up, and during periods of intense absorption, these gaps can widen enough to accept cells such as erythrocytes. During intense absorption,⁵ lymphatic endothelial cells change their shape: stretching, shrinking, flattening, thickening, and sometimes even bending. The intense absorption is either caused spontaneously or by such active deformation of the endothelial cells. But here is the mystery. What has brought

about these morphological and functional changes between the absorbing and non-absorbing states? Inside these endothelial cells, superfine cytoplasmic filaments form bundles of various sizes, most of which run parallel to the cells' major axis.⁶ Identifying the contractile ability of these filaments may explain this activity. Baluk et al.,⁷ identified button-like structures unique to the beginnings of lymph vessels at the boundaries of lymphatic capillary endothelial cells. According to their study, interstitial fluid can be freely absorbed in the space inside these structures. Additionally, lymphatic endothelial cells contain numerous pinocytotic vesicles, and interstitial fluid is absorbed via encapsulation into these vesicles. Fat droplets containing chylomicrons (0.1-0.3 μm) are absorbed only by lymph vessels located at the center of intestinal villi.⁸ Again, the process occurs via the separation of endothelial cells and uptake of pinocytotic vesicles.⁹ Uptake by pinocytotic vesicles is a basic form of phagocytosis that has existed since the era of unicellular life. Further, bundles of cellular fibers emerge from the basal sides of lymph capillary endothelial cells, which serve to connect the cells to the surrounding connective tissue and are known as anchoring filaments. These filaments are thought to help prevent the lymphatic lumen from collapsing when tissue pressure increases. Nerve endings contact endothelial cells of the lymph vessels central to the villi, and some studies¹⁰ show that by stimulating smooth muscle aligned with the major axis of the central lymph vessel, neuropeptides from these nerve endings regulate absorption and transport of the lymphatics.

2) Collecting lymphatics

Like blood vessels, collecting lymphatics are thoroughly covered with a complete basement membrane and contain valves in their lumen and smooth muscles in their walls. Special characteristics of these muscle layers include the lack of a clear boundary between the tunica intima and tunica media (muscular layer) because of their frequent connection with the sub-endothelium, an abundance of connective tissue between the fibers, diagonal and spiral arrangements, and a mixture of left- and

right-wrapping elements. Nevertheless, in lymph vessels of the lower limbs, these fibers are clearly separated into three layers: the inner longitudinal layer, middle circular layer, and outer longitudinal layer. Lymph vessels of the upper limbs have only two layers and lack the outer longitudinal layer. Muscle fiber development of lymph vessels of the head and the neck are quite poor, and many either only have weak diagonal longitudinal fibers or completely lack muscle fibers altogether. Lymph vessels from internal organs lack muscle fibers when they run through organs, but away from organs, nearly diagonal longitudinal fibers and occasionally nearly diagonal circular fibers are detected. Most lymph vessels are hence not just simply cylindrical. Instead, areas between valves have better-developed musculature and thicker walls, while areas near the valves are thin-walled, and show either very poor musculature or lack fibers entirely. Thus, the portion of a vessel between two valves has been traditionally regarded as a single unit, called the lymphangion.¹¹ The spontaneous contractions of lymph vessels¹²⁻¹⁴ occur unit by unit in these lymphangia to carry lymph towards the trunk of the body. Increased lymph volume and intralymphatic pressure are thought to cause spontaneous contraction. Additionally, the smooth musculature runs longer than one lymphangion node.¹⁵ Lymph vessels of the mesentery are often used to observe spontaneous lymphatic contraction. In cows, sheep, guinea pigs, rats, and mice, contractions occur at a high frequency, while in cats, dogs, and rabbits, they occur at a much lesser frequency. All animals with low contractile frequency exhibit poor development of lymphatic vessel muscle fibers. Spontaneous lymphatic contraction has also been studied in humans; the vessels in the lower limbs contract approximately 4-5 times per minute, while those of the thoracic duct contract 1-4 times per minute. When collecting lymph from the thoracic duct through cannulation, if either respiration or peristalsis stops, lymph flow will also stop. At such times, a light percussion of the abdomen can help resume lymph flow. Additionally, when cannulating lymph ducts in the limbs, it is nearly impossible to collect lymph if

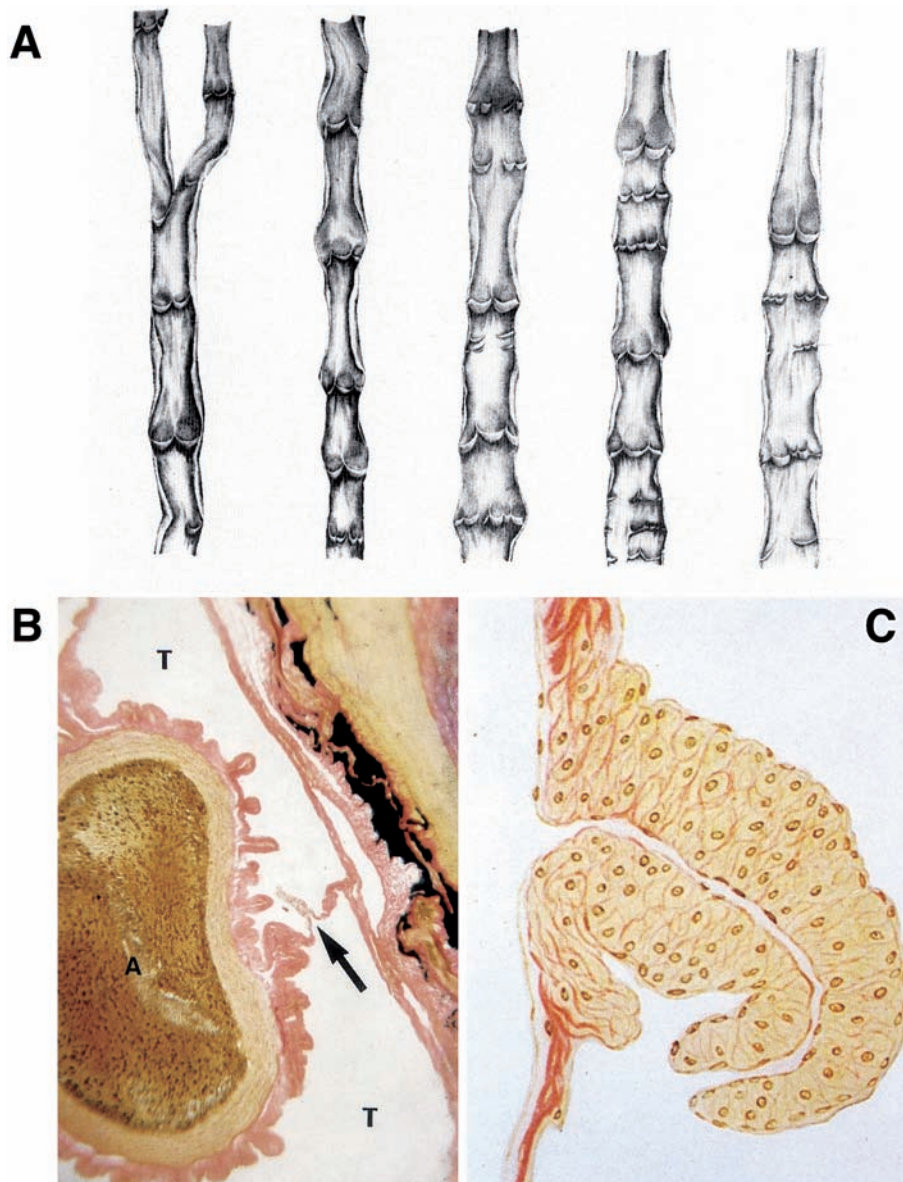


Figure 1 Lymphatic valves in various species.

A: Various types of valves in human lymphatic vessels of the lower extremities. Most of human lymphatic valves are semilunar, each consisting of 2 valves. (from Ogo, 1933)¹²⁹

B: The thoracic duct (T) enveloping the aorta (A) of a snake. A valve equipped with smooth muscle fibers is indicated by an arrow. Van Gieson staining. (from Kotani, 1959)¹⁷

C: A craterform valve with smooth muscles in the septum between subcutaneous lymph sacs of toad. Van Gieson staining. (from Kihara and Nose, 1931)¹³⁰

the patient is under anesthesia, but a light massage of the legs or fingers can resume lymph flow. These observations indicate that lymph circulation is predominantly passive, and massage and muscular contractions in the surrounding area are important for lymph flow.

In the collecting lymphatics, multiple valves are present and occur much more frequently compared to valves in the veins. These valves are particularly

numerous in the subcutaneous vessels of the limbs and trunk, and in some places are present every 1-2 mm apart. These valves are normally bicuspid semilunar valves (**Figure 1A**). In the shallow environment of the lymph sacs, the valves can be crescent-shaped. Unicuspid, tricuspid and tetracuspid valves are the ones occasionally observed. These valves are composed of folds of lining membranes; lymphatic endothelium covers both sides of

a thin flap of connective tissue membrane. Fibers radiate outward from valve attachment points and interlace at the center of the valve cusps. The valves of lymph vessels are well-developed, ensuring that lymph flows uni-directionally without any backflow. As a result, the functional range of lymphatic visualization at the extremities following injection of dye or contrast agent is, by definition, limited. However, if lymph vessels or nodes become obstructed, lymph congestion occurs, causing the lymphatics to swell. This swelling eventually prevents lymphatic valves from closing completely. If the swelling spreads to the peripheral circulation, lymph backflow can occur. Retrograde metastasis is unlikely, but it could occur if lymph vessels or nodes become blocked by cancerous tissues because of incomplete valve closure.

Some aspects of the muscular layer of lymph vessels and valves are a mystery. First, looking at the muscular layer, only birds and mammals have smooth musculature in the walls of their lymphatics, while reptiles, amphibians, and fish do not. Although the lymphatics of snakes, turtles, frogs, and toads are very well-developed, and contain large lymph sacs and sinuses, the walls of these structures contain no musculature. Next, looking at the valves, the valves of birds and mammals are semilunar, while those in the barrier walls of large lymph sacs and wide lymph sinuses of reptiles and anuran amphibians are funnel-shaped. Further, the semilunar valves of birds and mammals are not muscled, but in snakes and toads, their lymphatic funnel valves are the only part of the system in which smooth muscle is found (**Figure 1B & C**). But why is that? Are these differences due to the sudden narrowing of lymph ducts in birds? Or are they due to differences in the strength of lymph flow?

The skin of anuran amphibians like frogs and toads can be grasped and pulled far away from their bodies¹⁶ because the space underneath their skin functions as a large lymph sac. The area of this sac corresponds to the subcutaneous tissues in a mammal. Below this and between their organs, there is a large lymph sinus, through which arteries and veins run. Reptiles like snakes and turtles also

have large lymph sinuses through which arteries and veins run (**Figure 1B**). In fact, the Japanese rat snake, *Elaphe climacophora*, not only has this type of vasculature, but some organs, such as the thyroid, thymus and liver, are also present within the lymph cavities.¹⁷ These animals which cannot produce their own heat are referred to as cold-blooded; not because their blood is cold, but because their heat is derived from external sources. They must use heat from the sun to regulate their body temperature. The lymph sinuses and sacs, filled with lymph, which is a poor conductor of heat, are thought to be necessary for these organisms to maintain their body heat. Lymph is also thought to be useful for water storage. In hot regions of Australia, there is a type of frog that stores a large amount of water in the lymph sac beneath its skin, burrows into the soil, and estivates. This “water-holding frog” is said to utilize this behavior to avoid heat.¹⁸ In birds, however, which can produce their own heat, the lymphatics are very thin, but their heat production is still not sufficient to ensure survival. Thus, their bodies are covered in feathers, and some or all of the blood vessels in many species are surrounded by lymphatics. The lymphatics of mammals are quite thin.

In contrast, caudate amphibians, which belong to the same class as those discussed above, have a completely different configuration. Although they spend almost all their time in the water, caudates such as newts and salamanders have a very well-developed but nevertheless thin, vessel-like lymphatics. Even among frogs, completely aquatic organisms such as tadpoles have thin vessel-like lymphatics. As they begin to emerge onto land, the lymphatics fuse together to form one large lymph sac. Ostariophysi such as carp and crucian carp, also have well-developed vascular lymphatics. In general, the configuration of an organism’s lymphatics changes based on whether it is homeothermic or poikilothermic, and whether it lives in water or on land. Here, too, is another mystery. There is little variation in the blood circulatory systems of these animals compared to that of their lymphatics.

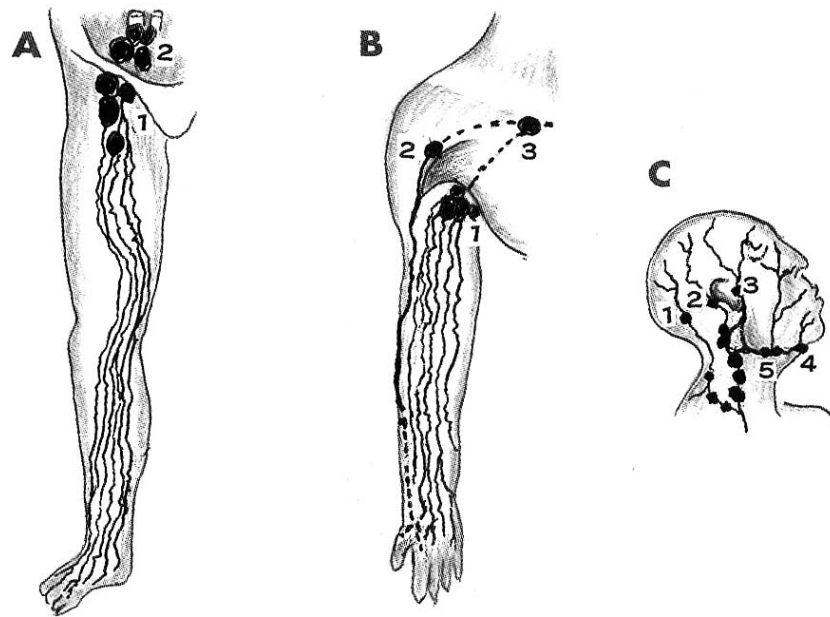


Figure 2 Illustrations of main lymphatic flows in the extremities, head and neck.
A: Lower extremity; superficial inguinal lymph nodes (A1), inferior iliac lymph nodes (A2).
B: Upper extremity; central axillary lymph nodes (B1), interdeltopectoral lymph nodes (B2), subclavian lymph nodes (B3).
C: Head and neck; occipital lymph nodes (C1), postauricular lymph nodes (C2), superficial auricular lymph nodes (C3), submental lymph nodes (C4), submandibular lymph nodes (C5).
 (from Kotani, 2012)¹

3) Lymph trunks: lymph trunk and lymphatic duct

Longitudinal smooth muscle fibers often form in the tunica intima of the thoracic duct, the largest lymph trunk inside the body (on the left side).¹⁶ These fibers become more developed further down the length of the duct. The tunica media is made up of inner longitudinal, middle circular, and outer longitudinal layer, all of which have a near-diagonal orientation. The development of the near-diagonal inner longitudinal layer is most advanced. A unique characteristic of this layer is the abundance of connective tissues between muscle fibers. Elastic fibers run subintimally and outside of the muscular layer to form a fiber network. The right lymphatic duct and lumbar trunks have walls thinner than the tho-

racic duct but have much more muscle fibers, and three clear layers of musculature can also be seen. The bronchomediastinal and the intestinal lymph trunks lack the outer longitudinal musculature. The jugular and the subclavian lymph trunks have even thinner walls, with only diagonal longitudinal musculature. Multiple valves are also present in the thoracic duct.

2. Route and size of the lymphatics

Since ancient times, the distribution of lymphatics throughout the body has been traced by injecting ink, dye or other pigmented liquids into the connective tissue of a specific region.^{19*} Injecting dye between the toes causes up to 10 or so superficial lymphatics to become visible on the dorsum of the foot, enabling clear visualization of these struc-

***Footnote:** Visualization of lymphatics upon dye injection is possible in humans, animals, and cadavers. It may be even easier to inject these dyes several hours after death because, by that time, blood in the vasculature will have clotted and the dye will be injected selectively into the lymphatics. There are no red blood cells or platelets in the lymph, making it virtually incapable of clotting. Another method involves direct injection of dye into the lymph nodes to visualize the lymphatics and nodes downstream of the injection site, closer to the trunk of the body. This method is still widely used today as a clinical diagnosis technique, as lymphangiography.

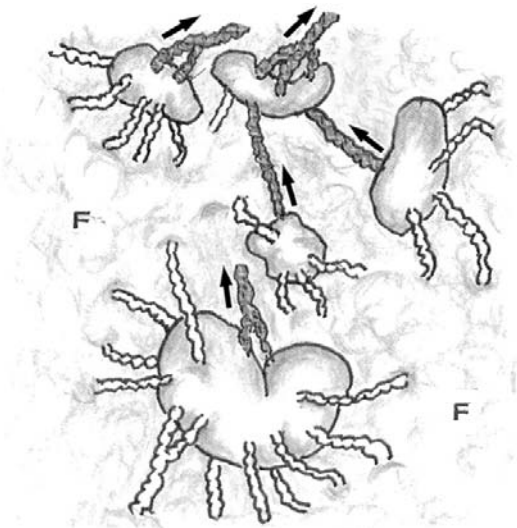


Figure 3 An illustration of human superficial inguinal lymph nodes.

Both afferent and efferent lymphatic system in lymph nodes are present. In general, several afferent lymphatic vessels enter a lymph node; however, efferent lymphatic vessels (gray) from the node, even if two or three efferent vessels initially leave the node, soon converge and leave as only one with unidirectional lymph flow (arrows). Thus, although there may be several afferent vessels, there is eventually never more than one efferent lymphatic vessel from the node. Note all lymph nodes are located in the adipose tissue (F). (with modification from Kotani, 2012)¹

tures as they ascend the lower leg (**Figure 2A**). They pass the knee, rapidly ascend the thigh, and flow into the superficial inguinal nodes.¹⁹ Interestingly, the superficial lymphatics do not follow the same course as the blood vessels in the area (the two or three superficial lymphatics that originate in the heel enter the superficial nodes of the popliteal fossa). Lymphatics that exit the superficial inguinal nodes become deep lymphatics, which then pass through the lower iliac lymph nodes along the external iliac artery, through the upper iliac lymph nodes along the common iliac artery, and through the paraaortic lymph nodes along the abdominal aorta. They form the left and right lumbar lymph trunks and ultimately empty into the cisterna chyli. From here, the thoracic duct begins. The intestinal lymph trunk, from the intestinal lymphatics, also flows into the cisterna chyli. When dye is injected between the fingers, up to 10 or so lymphatics appear on the dorsal and palmar surfaces of the hand

and ascend the forearm (**Figure 2B**). They pass the elbow, rapidly ascend the upper arm, and after passing either through the deltopectoral nodes or central axillary node, they flow into the subclavian lymph node. Here too, they do not follow the course of the blood vessels (the two or three superficial lymphatics that originate on the ulnar side of the palm enter the cubital lymph nodes). After exiting the subclavian nodes, the lymphatics become the subclavian trunk. On the right, they converge with the cervical lymph trunk and then empty into the right angulus venosus, while on the left, they converge with the cervical trunk and thoracic duct and empty into the left angulus venosus. The approximately 10 superficial lymphatics that become visible after injecting the scalp or center of the face with dye trace the following paths. From the head, the lymphatics pass through the occipital nodes, posterior auricular nodes and superficial parotid nodes; from the center of the face, the lymphatics pass through the superficial parotid nodes, submental nodes, and submandibular nodes (**Figure 2C**). Both sets of lymphatics then flow into the superior and inferior deep cervical lymph nodes, which run along the common carotid artery and internal jugular vein. The efferent lymph vessels of the inferior deep cervical nodes form the cervical lymph trunk. On the right, these vessels then converge with the right subclavian lymph trunk, and empty into the right angulus venosus (venous angle), while on the left, they converge with the left subclavian trunk and the thoracic duct, and empty into the left angulus venosus.

Here is another mystery. There is little to no change in the size of the lymphatics at their origins in the periphery compared to those in the trunk of the body.²⁰ Even when superficial lymphatics become deep lymphatics as well as when deep lymphatics become lymph trunks or ducts, there is almost no change in their size. The diameter of even the largest lymph trunks of the body, such as the thoracic duct, does not exceed a few millimeters. This consistency is not found in the blood vasculature. Like a large tree, the thin branches of the veins converge and gradually fuse into one large,

thick vein. In contrast, the arteries become thinner and narrower with each division. According to Kutsuna,¹⁹ the lymphatics not only function to absorb and drain lymph from the body, but also leak lymph partway through their route to outside the vessels. The leaked lymph spreads into the surrounding tissue via the paralymphevascular fluid pathway.²⁰

The arrangement of the afferent and efferent lymphatics of a lymph node also raises some questions (**Figure 3**). Normally, several afferent lymph vessels enter a lymph node; however, if two or three efferent vessels initially leave the node, these lymphatics soon converge, leaving only one efferent lymphatic from the node. Even when several nearby lymph nodes form a group, the same phenomenon occurs. Thus, although there may be several afferent vessels, there is eventually never more than one efferent lymphatic vessel from the node. Additionally, there is essentially no difference in the size of afferent and efferent vessels. It may be possible to explain this mystery to a certain extent. By temporarily slowing and congesting the flow of lymph from afferent lymphatics into the lymph sinus of the node, antigens, and cells carried by the lymph are better able to diffuse into the parenchyma of the node, allowing lymph nodes to function as a lymph flow checkpoint and contribute to biological defense mechanisms.

A further mystery lies in the relationship between lymph vessels, nodes, and adipose tissue (**Figure 3**). A special characteristic of superficial lymphatics is that they do not follow blood vessels but follow individual courses. The superficial lymphatics from the dorsa of the foot and hand and those of the abdominal wall travel, without exception, through subcutaneous adipose tissues above the superficial fascia towards their associated lymph nodes. Nearly all associated lymph nodes are embedded in adipose tissue, and lymph vessels and nodes have a very close relationship with adipose tissue (as explained in **Part 4**). These factors help preserve the functions of lymph vessels and nodes through the flexibility and low heat conductivity of adipose tissue, which not only protect these struc-

tures from external pressures but also maintain their thermostability.

3. Lymphatic distribution and the flow of body fluids

1) Basic configuration of lymphatic distribution

Lymphatics are not distributed throughout the entire body. Epithelial tissues neither have blood nor lymph vessels. However, the cells of these tissues carry out critical functions and must divide rapidly, and thus cannot afford to be starved of oxygen and nutrients. Because of this, blood capillaries are distributed immediately beneath the basement membranes of the epithelia. These capillaries form a dense network in the papilla of the outer surface of the dermis in the skin and outer surface of the lamina propria of the mucosa. The lymph capillary network is situated slightly apart from this blood vascular network and is distributed on a deeper layer. This allows it to perform its original function of absorbing fluids that permeate outside the blood vessels. This is why the lymphatics were traditionally known as absorbing vessels. Lymphatics are distributed in the interlobular connective tissue and capsules of parenchymal organs such as the liver, pancreas, and salivary glands, but not within the lobules themselves. The lobules of the lungs also lack lymphatic capillaries. Here is another mystery. Why do lymphatics not enter the lobules of these parenchymal organs? Blood vessels are abundantly distributed throughout this area. Do lymphatics follow a principle that they must be distributed away from the epithelia and the blood capillaries? Perhaps this arrangement allows for maximal use of limited intra-organ space for bile, pancreatic juice, and saliva secretory ducts or gas-exchanging alveoli.

The exceptions among parenchymal organs are the gonads (ovaries and testes) and thyroid, where lymphatics are present. However, even in these organs the same principle is observed in which blood capillaries are distributed close to the glandular epithelium, whereas lymphatic capillaries are distributed away from both. In the ovaries, blood capillaries are densely distributed in the theca interna, the membrane covering an ovarian follicle, while lym-

phatic capillaries are distributed in the theca externa, the outer layer. In the corpus luteum, larger lymph vessels penetrate alongside blood vessels into the center of the structure, but unlike the blood capillaries, they are not finely distributed all the way up to the luteal cells themselves. In the testes, blood capillaries envelop each seminiferous tubule, while lymphatic capillaries are distributed away from these tubules in the spaces where connective tissue is relatively abundant. Additionally, in the thyroid, blood capillaries form dense networks that envelop follicular cells, while lymphatic capillaries are distributed away from these cells in the spaces between where connective tissue is abundant. As a result, testosterone secreted by the testes and, thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) secreted by the thyroid are released not only into blood vessels but also into the lymphatics.^{21,22} However, a comparison of blood flow volume to lymph flow volume reveals that the blood vasculature is the primary route through which these hormones are released into the body. However, an unexpected result was obtained in a study of thyroid lymph collection from dogs. In thyroid follicular cells, thyroglobulin (650 kDa) is the primary component of the intracellular follicular colloid. Normally, thyroglobulin does not exit the follicle. If this does occur, thyroglobulin is recognized as an antigen, despite being an endogenous protein, and causes autoimmune disease (Hashimoto's disease). However, when cannulating the draining lymphatics of a dog's thyroid, light percutaneous massage of the thyroid easily causes thyroglobulin to appear in the cannulated lymph.²³ Administering thyroid stimulating hormone (TSH) further increases its levels. When a high-molecular weight substance such as thyroglobulin leaves a follicular cell, only lymphatics can absorb it. It is now known that thyroglobulin can easily be released through a lymphatic route into the general circulation. This finding may provide new perspectives on the cause of Hashimoto's disease.

So, what about tissues other than epithelial tissue? If we look at lymphatic distribution in the muscular tissue, blood capillaries tightly encircle each muscle fiber and lymphatic capillaries are absent.

Lymphatic capillaries are distributed in the connective tissue sheaths that bundle together many muscle fibers (perimysium) and in the connective tissue membrane that surrounds the entire muscle (epimysium, also known as fascia). In adipose tissue, blood capillaries tightly encircle each adipocyte, but lymphatic capillaries are absent. Lymphatic capillaries only begin to appear in the thick connective tissue sheaths that separate groups of adipocytes into many-celled lobular structures. In terms of the lymphatic distribution in bone tissue, blood capillaries are rather abundant in Haversian canals, while lymphatic capillaries are absent. Marrow also contains an abundance of blood capillaries but lacks lymphatic capillaries. Lymphatics are instead distributed in the periosteum, the connective tissue membrane that covers bones. This may be because in metabolically active tissues such as muscle, adipose, and bone tissues, in addition to an abundance of blood capillaries, the reticular fiber network that facilitates the circulation of interstitial fluid is thickly distributed. Thus, even without abundant lymphatic distribution, these tissues receive adequate nutrients and the interstitial fluid can ensure proper circulation. Unlike the examples described above, the blood vessels and lymphatics do not penetrate cartilage tissue. Thus, in cartilage tissue, both blood and lymph vessels are distributed only in the perichondrium.

2) Arteries and the heart

There are surprising differences in the distribution of lymphatics in the arteries and heart. Large arteries branch off occasionally to form smaller arteries to supply themselves, whereas large veins receive their nutritional supply from neighboring arteries. Vessels that supply other vessels in this way are collectively known as the "vasa vasorum". The vasa vasorum splits into many small branches in the tunica externa of arteries, some of which move towards the tunica media and form a capillary network between the smooth muscle fibers. The capillary network becomes sparser along the tunica media and ends before reaching the tunica intima. The tunica intima does not contain blood vessels and consequently the tunica intima and part of the tu-

nica media close to the intima can only be supplied by fluids leaked from the arterial endothelium and capillary network of the tunica media. The elastic lamina, located at the border of the tunica intima and tunica media, is fenestrated and therefore aids the permeation of interstitial fluid. Lymphatics are distributed in the deep parts of the tunica externa of large arteries, but do not reach the tunica media or tunica intima. Thus, there is no way to eliminate waste products from the tunica intima and intimal region of the tunica media. Particularly when hypertension damages arterial endothelial cells and when this is accompanied by hyperlipidemia, lipids seep into the tunica intima. Cholesterol deposits form, but they cannot be removed due to the lack of lymphatics in these areas. If lymphatics specialized for the removal of high-molecular weight lipids were distributed in the inner layers of the arteries, arteriosclerosis might never occur or become a critical condition.

However, here is another mystery. Unlike in the arteries, lymphatics are well-developed in the heart.^{24,26} Lymphatic capillaries are distributed immediately beneath the endocardium and at the border with the myocardium. The draining lymphatics that run off the lymphatic network of the endocardium travel through the thick bundles of connective tissue that pass through the myocardium and connect to the lymphatic network of the epicardium. There are no lymphatics inside bundles of cardiac muscle fiber, but lymphatic capillaries do exist inside the connective tissue between bundles and drain to the lymphatic network of the epicardium. In the epicardium, two networks of lymphatics are present: deep and superficial. The deep lymphatic network of the epicardium receives draining lymphatics from the myocardium and then ascends towards the coronary sulcus.¹⁹ The lymph vessels accompanying the right coronary artery ascend the front face of the ascending aorta, front face of the pulmonary artery, or between the two, and, in humans, empty into the aortic arch lymph nodes at the upper anterior aortic arch. The lymph vessels accompanying the left coronary artery ascend along the back of the pulmonary trunk following its

long axis and empty into upper right tracheobronchial lymph nodes. Lymphatic capillaries also form a network in the superficial layer of the epicardium. Experimentally injecting dye into the pericardial space of rabbits and other organisms enables visualization of this network.^{27,28} Lymphatics are also observed in the connective tissue between special myocardial fibers of the impulse conducting system such as the sinus node and atrioventricular node. Both the arteries and the heart were originally one tubular structure. However, the heart twisted and turned upon itself, developed contractility, and was eventually enveloped by a serosal cavity. Then, why are the lymphatics of the heart so well-developed? Even within the same pericardial space, the heart-supplying coronary arteries function as any other artery: their tunica intima do not possess blood or lymphatic capillaries. Thus, this high level of lymphatic development in the heart is very mysterious indeed!

3) Extravascular fluid pathways

Upon injection of dye into subcutaneous tissue or serosal cavities such as the peritoneum or the pleura, before the dye enters the lumens of the various lymphatics, it has been noted that the dyed fluid flows more easily in some areas compared to others. Kihara²⁰ found that these areas have special gaps in the connective tissue that are abundant in reticular fibers, which not only allow bodily fluids to flow continuously, but also contain pathways for cells and other material particulates to pass through. He named these pathways as “**extravascular fluid pathways**” (or, the extravascular fluid-path-system).

There are three pathways as follows. (1) the pre-lymphovascular fluid pathway: the inlet pathway that brings fluid from serosal cavities to lymphatic capillaries; (2) the paralymphovascular fluid pathway: the drainage pathway that accommodates extralymphatic leakage; and (3) the paravenular fluid pathway: the absorbing pathway situated around the venules. Normally, these fluid pathways receive little attention, but in various disease states closely related to the vascular system, such as pleural, peritoneal, or other localized edemas, inflammatory re-

sponses, and even tumor metastasis, these structures may play very critical roles.

4) Lymphatics and serosal cavities (prelymphatic spaces)

Dye injected into the peritoneal cavity is quickly absorbed by lymphatic capillaries of the diaphragm tendon.^{5,16,29} As the mesothelial cells of the peritoneum open underneath, the shape of the lymphatic endothelium changes drastically along the fiber bundles of the peritoneum; forming large canal-like passageways between the two structures. These passageways are characteristic of the prelympho-vascular fluid pathway. They form a connective tissue absorption route from the serosal cavities (pleura and peritoneum) to the lymphatic capillaries, and are known as the macula cribriformis.³⁰ Absorption is carried out not only by the formation of passageways through the separative transformation of lymphatic endothelia, but also through uptake by pinocytotic vesicles composed of lymphatic endothelial cells. Carbon dye (Pelican ink[®]: Günther Wagner, Hanover) injected into the pleural cavity is quickly absorbed by the lymphatic capillaries of the costal pleura. Canal-like passageways are formed between peritoneal mesothelial cells and lymphatic endothelial cells. Carbon dye injected into the pericardial cavity is quickly absorbed by the lymphatic capillaries of the visceral pericardium. It is well-known that in the central nervous system,^{16,31} dye injected into the cerebrospinal meninges follows the olfactory nerve and leaves the cranial cavity into the nasal mucosa, where it is absorbed by lymphatic capillaries. Later, one of Kihara's students¹⁶ demonstrated that carbon dye is absorbed by lymphatic capillaries distributed at all sites at which cranial and spinal nerves exit the cranial cavity or intervertebral foramina. In the peripheral nerves, the carbon dye appears in the lymphatics of the epineurium. The subepineural space continues into the subdural space and the intraneural space continues into the subarachnoid space. Thus, carbon dye travels through the intraneural space to the subepineural space and finally appears in the lymphatics of the epineurium. Here is another mystery. Serosal cavities are sealed spaces covered in their

own mesothelia. Similarly, lymphatics are sealed spaces lined with endothelia. Nevertheless, dye injected into serosal cavities does not appear from the entire serosa, instead it quickly appears in the lymphatic capillaries from specific locations. Thus, all serosal cavities, including the peritoneal cavity, pleural cavity, pericardial cavity, and meningeal cavity could be referred to as prelymphatic spaces or lymphatic pre-cavities.

In frogs and toads, countless small, crater-like holes are present in the barrier wall between the pleuroperitoneal cavity and the structure corresponding to the mammalian thoracic duct, the subvertebral sinus, and dye injected into the pleuroperitoneal cavity passes through these holes before emptying into the lymphatic sinus.¹⁶ Experimental phylogenetic verification of the presence of this or similar structures in fish, caudate amphibians, reptiles, and birds is needed. Phylogenetic research into lymphatic absorption from the pericardial and meningeal spaces should also be conducted.

When carbon dye is injected into the abdominal cavity of a rabbit, the lymphatics of the diaphragm are clearly rendered in black. However, many black spots also appear on the omentum, which are known as milky spots³² and are congregations of a large number of macrophages that phagocytosed the carbon. Endothelial cells of the lymphatic capillaries that begin here join the peritoneal mesothelium and appear to participate in the absorption of dye at the milky spots. Further, these lymphatics pass through the omentum and empty into the nodes along the greater curvature of the stomach. Omental milky spots have been known for a long time as the site of peritoneal macrophage production and macrophages that escape into the peritoneal cavity take up the dye and enter the lymphatics of the diaphragm. However, some macrophages may return to the omental milky spots. Many other questions regarding the relationship between serosal cavities and the lymphatics remain unanswered. Even when focusing on the peritoneal cavity a large number of issues remain a mystery, including retention of peritoneal fluid due to peritonitis or cirrhosis, transperitoneal dialysis, and impeded perito-

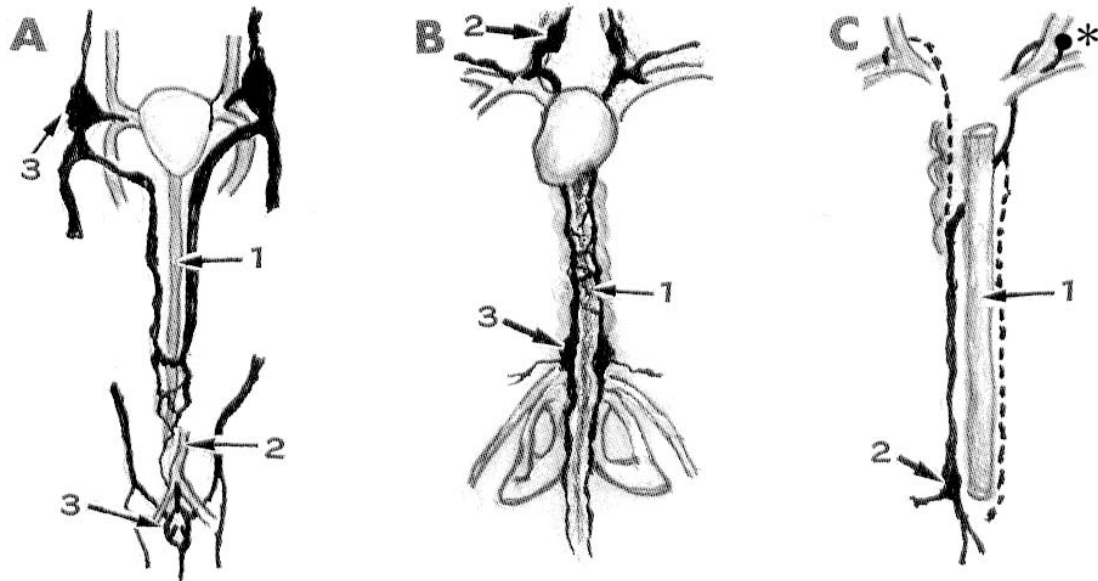


Figure 4 The thoracic ducts in various species.

A: Carp; the aorta (A1), posterior cardinal vein (A2), propulsor (A3).

B: Duck; the aorta (B1), cervico-pectoral lymph nodes (B2), lumbar lymph nodes (B3).

C: Human; the aorta (C1), cisterna chyli (C2). *: The angulus venosus and thoracic duct-associated Virchow's lymph nodes.

(with modification from Kotani, 2012)¹

neal lymphatic absorption due to radiation exposure.

Part 2: Development, Differentiation, Regeneration and Pathologies of the Lymphatic System

1. Lymphatic system development

1) Phylogenetics of the lymphatics

Next, we will describe differentiation of the lymphatic system from a phylogenetic perspective.^{16,33} First, the lamprey, a cyclostome, has a cavity on the ventral side of the aorta and posterior cardinal vein known as the subspinal sinus, which opens into the posterior cardinal vein through a structure with numerous small holes, each with a funnel-shaped valve. Based on its location, this sinus could be expected to correspond to the mammalian thoracic duct, but the intestine of the lamprey lacks the central lacteal present in mammals. Instead, chyle is absorbed by the veins of the intestinal mucosa, and as these veins empty into the subspinal sinus, it would be more apt to refer to this structure as a hemolymph vessel²⁰ or hemocoel. In cartilaginous fishes like sharks, a pair of lymphatic trunks corre-

sponding to the thoracic duct extend down the length of the aorta, with one on either side. At the rostral end of the shark, each trunk meets a cervical trunk and empties into either the left or right angulus venosus, while at the caudal end, they empty into the posterior cardinal vein. These structures are not independent lacteals and are comparable to hemolymph vessels. The lymphatic system is completely independent of the blood vascular system only in carp and crucian carp (osteichthyes). These animals have a pair of thoracic ducts (**Figure 4A**) that ascends along both sides of the aorta. Each trunk converges with the lateral lymphatic trunks (*Truncus lymphaticus lateralis*) that travel along the center of the lateral side of the body wall and opens into the left and right angulus venosus.³³ This pair of trunks becomes a single vessel after passing through the anus of the fish, and follows the dorsal side of the aorta, descending as far as the root of the caudal fin, where it converges with the lateral lymphatic trunks (which descend along the body wall) and empties into the posterior cardinal vein. Caudate amphibians like newts and salamanders also have a pair of thoracic trunks; they ascend

both sides of the aorta and empty into the left and right angulus venosus; past the anus, they become a single vessel that empties into the posterior cardinal vein. Beneath the vertebrae of anuran amphibians like frogs and toads, the thoracic duct forms a large lymph sinus (subvertebral sinus, Sinus subvertebralis). However, this is a fused version of the pair of thoracic ducts that travels along the aorta of these animals during their tadpole stage. The thoracic ducts of birds like ducks, geese, and chickens begin at the base of the celiac artery and appear to surround the aorta, which then follows up the body (**Figure 4B**). Near the third or fourth thoracic vertebrae, the duct splits, with each half emptying into either the left or right angulus venosus.³³

In humans, the intestinal lymphatic trunk, and left and right lumbar lymphatic trunks converge, typically in front of the second lumbar vertebra, and on the right dorsal side of the celiac artery, they form the cisterna chyli, which can vary in size. The thoracic duct begins at the cisterna chyli, follows the right dorsal surface of the celiac artery up the body, passes through the aortic hiatus of the diaphragm, enters the thoracic cavity, and continues ascending the body between the aorta and azygos vein. However, around the fifth thoracic vertebra, this duct gradually begins to bend to the left, passes behind and emerges on the left side of the esophagus at the third thoracic vertebra, continues to ascend, bends forward in an arch at the seventh cervical vertebra, receives the left cervical lymphatic trunk and left subclavian lymphatic trunk between the left common carotid artery and left subclavian artery, and then empties into the left angulus venosus.

Here is another mystery. Phylogenetically, all animals that lack completely independent lymphatic and vascular systems, such as cartilaginous fishes, and all animals with independent systems, such as osteichthyes, amphibians, reptiles and birds, have a pair of thoracic ducts with one on either side of the aorta, which together ascend rostrally and empty into the left and right angulus venosus. This principle, however, breaks down in humans and many other mammals. In effect, the venous opening of the

right thoracic duct and most of the left thoracic duct disappear (**Figure 4C**), while most of the right thoracic duct and venous opening of the left duct remain, as does one of the anastomotic branches that once connected the left and right ducts, linking these structures. The right thoracic duct uses the remaining venous opening of the left thoracic duct to empty into the left angulus venosus. Why does the thoracic duct follow this route in mammals? This raises the question of whether taking this route provides some sort of benefit. The degeneration or disappearance of the right venous opening of the right thoracic duct may already be occurring in certain birds.³³ Further, in the very early stages of the embryo, humans have both left and right thoracic ducts, each of which empties into the left or right angulus venosus.^{33,34} In the venous system, a similar pattern is observed. The venous system first develops as a pair of vessels that is bilaterally symmetrical; however, midway through the process, regression of a part of the system occurs asymmetrically on one side, and thus the final system takes a bilaterally asymmetric course (the inferior vena cava and its branches, such as the azygos vein, hemiazygos and accessory hemiazygos vein). Perhaps a very similar or even related process can be observed in the lymphatic system.

2) Venous openings and lymph heart

Osteichthyes or bony fishes such as carps and crucian carps have structures at the left and right venous openings of their thoracic ducts called propulsors.³³ A similar propulsor is also on the ventral surface of their final vertebra, near the root of the caudal fin, where the movement of this fin sends lymph into the posterior cardinal vein. The propulsor contains valves. In zebrafish, each body segment contains the intersection of intersegmental lymphatics and intersegmental veins.^{35,36} In amphibians and reptiles, lymphatic venous openings have lymph hearts.^{16,33} Caudate amphibians such as newts and salamanders have one pair of lymph hearts per body segment, totaling to approximately 10 pairs of lymph hearts throughout their entire body. In anuran amphibians such as frogs and toads, the number of lymph hearts is reduced to merely one ante-

Table 2 Molecular markers of lymphatic and blood vessel endothelial cells.

Marker	Species*	Location	Molecular size (kDa)	Function	Representative references [#]
Lymphatic vessel					
LYVE-1	H, M, R	cell surface	60	hyaluronan receptor	Banerji et al. (1999) ¹³⁹ Prevo et al. (2001) ¹⁴⁰
Podoplanin D2-40	H, M, R	cell surface	43 40	adhesion?	Breiteneder-Geleff et al. (1999) ¹⁴¹ Kahn et al. (2002) ¹⁴² Schacht et al. (2005) ¹⁴³
VEGFR-3 (Flt4)	H, M, R	cell surface	170	VEGF-C receptor	Kaipainen et al. (1995) ⁴⁰
Prox-1	H, M, R	nuclear	85-95	transcription factor	Wigle and Oliver (1999) ¹⁴⁴
Foxc-2	H, M, R	nuclear	54-63	transcription factor	Petrova et al. (2004) ⁵⁴
D6	H, M, R	cell surface	43	chemokine receptor	Nibbs et al. (2001) ¹⁴⁵
CD73	H, M, R	cell surface	69	adhesion, 5'-Nucleotidase	Thompson et al. (1989) ¹⁴⁶
B27	R	cytoplasm	?	?	Ezaki et al. (1990) ¹³⁸
LA102	M	cell surface	25-27	mouse-Thy1 ?	Ezaki et al. (2006) ¹¹⁰
Blood vessel					
CD31	H, M, R	cell surface	110-120, 130-140	PECAM-1	Albelda et al. (1991) ¹⁴⁷ DeLisser et al. (1993) ¹⁴⁸
CD34	H, M, R	cell surface	90, 105-120	GlyCAM-2, mucosialin	Baumhueter et al. (1994) ¹⁴⁹ Pusztaszeri et al. (2006) ¹⁵⁰
CD105	H, M, R	cell surface	90, 180	TGF- β receptor, endoglin	Gougos and Letarte (1990) ¹⁵¹ Duff et al. (2003) ¹⁵²
MECA-32	M	cell surface	50-55, 100-120	diaphragm protein (mouse PV-1)	Hallmann et al. (1995) ¹⁵³ Stan (2005) ¹⁵⁴
PAL-E	H	cell surface	60-120	diaphragm protein (human PV-1)	Schlingemann et al. (1985) ¹⁵⁵
OX-43	R	cell surface	90	?	Robinson et al. (1986) ¹⁵⁶
LA5	M	cell surface	12-13	?	Ezaki et al. (2006) ¹¹⁰

* H, human; M, mouse; R, rat.

[#] Only original or representative papers are listed.

rior and one posterior pair. In reptiles such as snakes and lizards, the number is reduced yet again: they have one posterior pair of lymph hearts. Anterior lymph hearts have disappeared in snakes, instead these animals have one large lymphatic lumen located above the heart, which uses the beating motion of the heart to propel lymph into the veins.^{16,17} The walls of lymph hearts are composed of striated muscles and are capable of spontaneous contraction (**Supplemental Figure: Attached Images.** https://doi.org/10.24488/jtwmu.89.Extra1_E4). The rice grain-sized lymph heart at the root of a lizard's hind leg contracts approximately 40 times per minute. The posterior lymph heart of a frog contracts approximately 60-80 times per minute in summer; this rate is reduced to 20-30 times per minute in winter.³³ The inlets and outlets of amphibian and reptile lymph hearts are equipped with smooth muscled valves. Birds temporarily have one pair of posterior lymph hearts, which disappears within one month of hatching.³⁷

To sum up the characteristics of lymphatic venous openings across multiple species, fewer and fewer lymphatic venous openings are observed as we move from fish towards mammals. Ultimately, in humans, there is only one venous opening of the thoracic duct into the left angulus venosus. Why is that? Does this show that lymphatic systems might have gradually differentiated themselves away from vascular systems during evolution?

2. Morphogenesis (ontogeny) of the lymphatics

The lymphatic system is first visible in the human fetus two months after conception.¹⁹ Lymphatic ontogeny has been widely debated for many years. There are two competing theories: "the centrifugal theory"³⁸ which states that the lymphatics elongate towards the periphery through budding of the venous endothelium, and "the centripetal theory"³⁹ which states that cells in the mesenchymal interstitium around veins flatten to form small lumens which then connect towards the center of the body, first forming primitive lymphatic sacs and

eventually lymphatic vessels. Linking of the lymphatics and veins occurs secondarily. There is also a “compromise theory”, in which the thoracic duct is thought to arise from fetal veins and the rest from the interstitium, or that the cervical lymph sac is venous in origin, while the rest arises from the interstitium.

The primary reason that debates surrounding lymphangiogenesis have continued for more than 100 years is that for much of that time, there was no method for rigorously identifying tissues as part of either the lymphatic system or blood vascular system. Blood vascular biology has progressed greatly since the discovery of specific markers of vascular endothelia. In contrast, it has been more than 20 years since markers specific to lymphatic endothelia were discovered, but lymphatic research has still been significantly delayed. Despite VEGFR3 (FLT4) being present specifically in lymphatic endothelia was discovered in 1995,⁴⁰ other molecular markers are only recently being reported (**Table 2**). These specific lymphatic markers enable identification of lymphatic vessels, revealing the relatedness of the lymphatics and the blood vessels. In recent years, there have been an increasing number of molecular biology findings⁴¹ that provide further support to the centrifugal theory. However, very recently, live imaging analysis of zebrafish revealed evidences^{42,43} supporting the centripetal theory and provided insight into the origin of lymphatic endothelial cells and that the mechanisms controlling their differentiation differ in the head and trunk of the organism. However, these theories require further investigation.

With regards to the ontogeny of the lymphatic system, if we consider the development of the lymphatics in a human embryo from the perspective of the centrifugal theory, we can broadly categorize this process into two subprocesses: lymphvasculogenesis; the creation of lymph vessels from the budding of veins, and lymphangiogenesis; the elongation of new lymph vessels from existing vessels. Buttler et al.⁴⁴ reported venous budding lymphvasculogenesis and simultaneous peripheral lymphatic formation which recruits macrophage-like cells de-

scended from mesenchymal tissues in the embryonic stage. Further, Kato and his colleagues^{45,46} used enzyme histochemistry to detect a process in which primitive lymphatic sac-like structures (lymphatic islands) often appear in the interstitium of various organs and grow small protuberances which then link and fuse together, gradually forming a valvular lymphatic network. Either way, during formation of new lymphatic vessels in adults, lymphangiogenesis is thought to be the primary process involved. Evidence of a formative process similar to vasculogenesis observed in the vasculature, such as the presence of lymphatic endothelial progenitor cells in peripheral blood, is not well understood at the present time.

3. Lymphatic regeneration

Lymph vessels regenerate while lymph nodes do not, but the reason for this is unclear. Lymphatics are structures suited for the absorption of high-molecular weight substances and cells. Consequently, when foreign bodies, including bacteria and antigens invade the body’s tissues, they are taken up by the lymphatics. Lymph nodes provide a biological defense mechanism against these invaders. Primitive development of lymph nodes followed that of the lymphatics, occurring only after the lymphatics achieved a certain level of complexity, and only then in specific locations. In the age of primitive lymph nodes, two patterns of development occurred: nodes of vascular origin developed from the mesenchyme of lymph vessel walls and nodes of sac origin developed from the mesenchyme of lymphatic sacs, derived from immature lymphatic plexuses. The deep cervical nodes, aortic nodes, and iliac nodes, among others are the latter sort of sac-derived nodes, whereas the rest of the nodes, such as superficial cervical nodes, submandibular nodes, axillary nodes, popliteal nodes, and inguinal nodes are of the former sort, i.e. vascular-derived nodes¹⁹. In humans, primitive lymph nodes begin to appear in the fetus from two (axillary, inguinal nodes, etc.) to three months (mesenteric lymph nodes, etc.). At the latest, they begin to appear by the end of the third month (popliteal nodes, etc.) and the beginning of the fourth month.⁴⁷ In all organisms, the locations

at which lymph nodes appear and the number in each location is virtually predetermined. Each lymph node or lymph node group is an organ that has been predetermined both in number and location for biological defense over the long course of mammalian evolution, in a similar way as the spleen. Like the spleen, lymph nodes do not regenerate when removed, and this is due to the same mechanism.

However, the lymphatics can regenerate. If an entire lymph node or a group of nodes are removed, new lymphatics eventually begin to grow and join the severed ends of the existing afferent and efferent lymphatics. It is thought that increased intralymphatic pressure caused by ligation-induced lymph congestion triggers lymphatic regeneration. It is also possible that the tissue gaps at the excised portions link and form a coupled passageway. This line of thinking is quite similar to that of the centripetal theory^{16,33} of lymphatic ontogeny. Experimentally ligating the lymphatics causes acute edema in areas drained by these vessels, affecting tissue and organ function. If the cervical lymph trunk which drains from the lymph vessels of the thymus, is ligated in guinea pigs, the cell division of cortical thymocytes is reduced by 50% within one day and medullary thymocyte division is reduced by 50% within five days.⁴⁸ Following lymphatic regeneration, the cell division recovers after approximately 10 days. Ligating the draining lymphatics of the testes in rabbits causes edema in the interstitial tissue of the testes, severely affecting sperm production in the convoluted seminiferous tubules.²² Secretion of androgens is also completely halted. The lymphatics regenerate within 12-15 days after ligation, and organ function returns to normal after 30-60 days. However, a point that requires clarification here, is that out of the 10 cases studied, lymphatic regeneration failed completely in 2-3 cases. In these rabbits, sperm production did not recover even after 90 days, resulting in widening of the basement membrane of the convoluted seminiferous tubules, and residual edema and fibrosis in the interstitium. Next, when the thoracic ducts of these rabbits were ligated, their extremities became extremely swollen

and their lymph was completely congested. After 10-14 days, a very thin lymph vessel had formed extending from the extremities towards the animals' core. The regeneration of this single thin lymph vessel prolonged the life span of these rabbits. Clinically, when performing surgery on esophageal cancer, etc., if the surgeon accidentally injures the thoracic duct or performs some other action capable of causing chylothorax, it is essential that the thoracic duct be ligated immediately. However, it must be reiterated, that in this experiment, 1 to 2 of the 10 rabbits where the thoracic ducts were ligated failed to show any regeneration. This is also a mystery. Why did a small number of rabbits fail to show lymphatic regeneration in both experiments, involving ligation of the draining lymphatics of the testes and the thoracic duct? This does not appear to have been caused by errors in experimental technique.

Even if the surgical intervention or external injury result in severance of lymphatics, the resulting condition is never fatal, and because the lymphatics are transparent, the severance is often not even noticed. The exudate is absorbed by the surrounding lymphatics to some degree, albeit at low levels, subsequently causing it to accumulate in the area surrounding the injury, giving the injured site the fluid-filled appearance. This encourages fiber proliferation and granulation tissue formation. Eventually, when new lymphatics are regenerated at the site of the injury, the local edema abates and fibrosis ceases. When pleurisy causes adhesion of the visceral and the parietal pleura, lymphatics are newly generated at the site of adhesion. Although the lymphatics on the lungs' surface flow towards the hilum, those generated at the site of adhesion carry lymph down the chest wall and towards the diaphragm.⁴⁹ As a result, the intercostal and paraaortic lymph nodes of the chest cavity can become stained with black by the dust they absorb from the lungs. Whether lymphatics can link graft and host tissue together is a very important question related to the graft rejection response. In both autografts and homografts, the graft and the host are linked by lymphatics 10-14 days post-operation. Antigen information for the graft tissue is carried

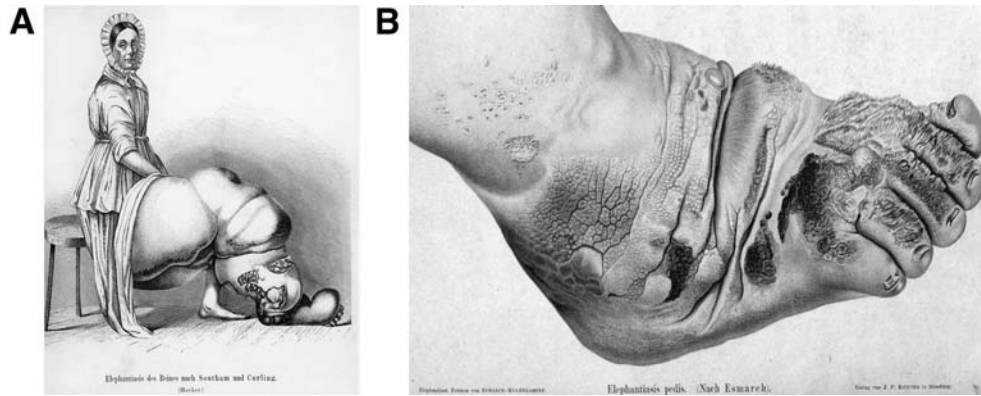


Figure 5 Illustrations of typical patients of elephantiasis.
A: A woman suffering from elephantiasis in her right leg.
B: A typical foot skin lesion caused due to chronic elephantiasis.
 (from Esmarch and Kulenkampff, 1885)⁵¹

even more quickly than that by host lymphatics to associated lymph nodes. If a rejection response occurs, 3-4 days before the grafted tissue succumbs to necrosis, the lymphatics between the graft and the host are destroyed and the two are no longer linked.

If lymph flow is obstructed, lymphatic neogenesis not only enables resumption of flow but also promote the formation of alternate collateral routes. The diseased state most characteristic of this process is chyluria.⁵⁰ Infection by the parasite *Wuchereria bancrofti* can occlude the thoracic duct. In an attempt to return the chyle-containing thoracic duct lymph to general circulation, many lymphatic vessels extending from the origin of the duct begin to grow retroperitoneally towards the abdominal wall. The urinary tracts, including the kidneys, are along this route, and occasionally certain lymph vessels will terminate in one of these tracts. The mechanism for how this occurs is unknown, but the existence of this process demonstrates the amazing tendency for formation of lymphatic drainage routes.

4. Lymphatic pathologies and their management

When comparing the pathologies of the lymphatics to those of the cardiovascularities, there are generally no severe conditions that are directly life-threatening. For this reason, it is inevitable that clinical awareness of the lymphatics is comparatively lacking. However, certain severe problems

can be surprisingly frequent if the diseased states progress unchecked.

1) Edema

Lymphedema (swelling) is a disease caused by dysfunction due to insufficient formation of lymphatics or valve failure/blockage in which the tissue fluid congests or accumulates in the interstitium of the periphery. Acute and chronic types of lymphedema exist.

Acute lymphedema occurs when the axillary or the pelvic nodes are completely excised from a patient such as when a radical surgical operation is performed for cancer. However, this eventually resolves through lymphatic regeneration or formation of collateral pathways. Why removal of the axillary nodes causes edema of the upper limbs, but removal of the pelvic nodes causes less edema of the lower limbs, was unclear for many years. One reason suggested is that the pelvic nodes are located in the loose connective tissue of the retroperitoneum, where lymphatic regeneration and formation of collateral pathways are quite easily accomplished. If the surgical areas are expanded in the pelvis by such as total hysterectomy, however, serious edema of the lower limb may occur. Anatomically, the pelvic nodes are located along large arteries and veins, therefore the surgery rarely results in vascular invasion. It is presumed that lateral chest and upper limb edema caused by axillary node excision often involves venous edema. Further

anatomic examination reveals that the superficial lymphatics originating from the cephalic vein ascend the upper arm, enter the deltopectoral groove, and empty into the subclavian lymph nodes via the deltopectoral lymph nodes (**Figure 2B**). This route has no direct connection with the lymphatics of the breast, and therefore it is speculated that if these lymphatics are not damaged during excision of the axillary nodes, it may be possible to minimize upper limb edema. Even if the subclavian nodes are removed, postoperative edema is unlikely to develop if a collateral lymph route is newly generated.

Chronic lymphedema can either be primary or secondary. The causes of secondary edema are well-understood and include infections that cause inflammation of the lymphatics, particularly trichophyton (tinea) or filaria infections that cause lymph vessel or node obstruction. Although this condition is now uncommon, filariasis is an endemic disease of the tropics, and is known as elephantiasis in its final stages⁵¹ (**Figure 5**). Problems arise with primary chronic lymphedema of unknown etiology. Up to 10% of these cases are congenital. Most of the remaining 90% of cases begin in puberty and are known as lymphedema praecox.^{12,13} Seventy to ninety percent of these cases occur in women. Normally, one lower limb is affected, but in some cases only one forearm or one upper limb may be affected. This disease does not involve obstruction of the lymphatics but rather cause convolution or twisting of the lymphatics, and swelling or narrowing of draining lymphatics.^{12,13} Here is a mystery. Autoimmune diseases⁵² such as systemic lupus erythematosus (SLE), Hashimoto's disease, Sjögren's syndrome and myasthenia gravis are more common in women and often begin in puberty. The patient profiles of these diseases are quite similar (explained further in **Part 4**) and many patients experience changes in their symptoms during their menstrual cycles. However, this does not imply that primary lymphedema is an autoimmune disease. Although sex hormones appear to be involved in the pathology of this condition, the symptoms are often far too localized to suggest hormonal involvement. Recently, *VEGFR3* and

FOXC2^{53,54} were reported to be the causative genes of certain congenital lymphedemas such as Milroy's disease and lymphedema-distichiasis (LD) syndrome.

2) Malignant tumors and lymphogenous metastasis

Clinically, it has often been said that carcinomas are lymphogenous and sarcomas are hematogenous. The mystery here is, why do the metastatic routes for carcinomas and sarcomas differ? Carcinomas are malignant tumors of epithelial origin, whereas sarcomas are non-epithelial malignant tumors. Various mechanisms involving these pathologies are poorly understood, including the mechanism where tumor cells break off the main site and permeate the surrounding tissues and also the mechanism involving formation of tumor blood vessels and lymphatics. Here, we will focus on re-examining and comparing the differences in the distribution of blood and lymph vessels in normal epithelial and non-epithelial tissues.

If the lymphatics are distributed in the same way as blood vessels, tumor cells that invade surrounding tissues should enter the lymphatics. This is because structurally, lymphatic capillaries lack adventitia, almost completely lack a basement membrane, and the endothelial cell gaps open very easily. In epithelial tissue, the connective tissue is present between the lymphatics and the blood capillary network, and outside of this the lymphatic capillaries form a dense network, regardless of whether the tissue in question is stratified squamous epithelium, monolayer columnar epithelium or glandular tissue. Furthermore, the lymphatic capillaries extend several times wider than blood capillaries. In contrast, in non-epithelial muscle tissue, lymphatics are only distributed in the connective tissue sheaths that bundle together many muscle fibers or the perimysium that envelops the entire muscle. In adipose tissue, lymphatic distribution begins only in the thick connective tissues that separate many adipocytes into lobule-like structures. Thus, in epithelial tissues, lymphatic capillaries are located far closer to epithelial cells and are far more densely distributed than in non-epithelial tissues. Logically,

organs prone to lymphogenous metastasis such as the thyroid and the ovaries have lymphatics distributed abundantly throughout their parenchyma, as previously explained.

In contrast, when comparing the distribution of blood capillaries in epithelial and non-epithelial tissues, epithelial tissues do not contain blood capillaries, while in non-epithelial tissues each muscle fiber and each adipocyte is enveloped in an extremely rich supply of blood capillaries. Even in bone tissue where the lymphatics are confined exclusively to the periosteum, blood capillaries are relatively abundantly distributed. While osteosarcomas, which are derived from osteoblasts, have a long path to travel before reaching the lymphatic-containing periosteum, they have an abundance of blood capillaries distributed very close nearby. As compared to older men and women, osteosarcomas occur preferentially in younger individuals, who have blood capillaries more abundantly distributed. Nevertheless, if osteosarcomas develop for long enough, they reach the periosteum and then undergo lymphogenous metastasis. Regardless of the tissue in which the tumor occurs, to affect hematogenous metastasis, the blood vessels must be destroyed. This, however, is not true for lymphogenous metastasis.

Whether the metastasis is lymphogenous or hematogenous, each tumor cell type has a different preference for the organ into which they prefer to metastasize, and metastasis therefore occurs in a variety of different organs. Surprisingly, the spleen is almost never the site for metastasized cancer. The spleen functions primarily as a filtration device for the blood. Tumor cells that enter the spleen via the splenic artery may not be permitted to attach themselves and are either passed out of the spleen via the splenic vein or killed by macrophages in the splenic tissue.

In tumor lymph node metastasis, the general consensus until recently was that proliferating tumor cells coincidentally enter a nearby, existing lymph vessel and eventually arrive at a lymph node. Additionally, tumor tissues were thought to be very rich in blood vessels but lacked lymphatics⁵⁵. However,

there have been reports of cases where tumors spread lymphogenously by expressing and secreting VEGF-C⁵⁶ and VEGF-D⁵⁷, thereby inducing lymphangiogenesis. Further, the correlation between VEGF-C expression and lymphogenous metastasis has been demonstrated in stomach, colon, lung, prostate, thyroid and melanocyte cancers. The lymphatics generated in and around the tumor have been called "tumor lymphatics". Trials with anti-lymphangiogenetic therapies, including administering VEGFR3 antibodies have begun to combat this phenomenon.⁵⁸

3) Obesity

As we explained previously, fat and lymph vessels are inextricably related. However, many details of this relationship remain unknown.² Many studies⁵⁹ have reported about the relationship between the blood vessels and the adipocytes, including those detailing the existence of adipokines. Harvey et al.⁶⁰ was the first to specifically report that obesity can be caused by lymphatic dysfunction. In summary, in *Prox1*^{+/-} mice, lymph leakage from lymph vessels was found to promote adipocyte enlargement, thus causing obesity. Additionally, Nurmi et al.⁶¹ showed that even with consumption of a high-fat diet in VEGF-C knockdown mice, the lacteals of the small intestine retract and smooth muscle function in the villi decreases, causing fat absorption to decrease and preventing obesity from developing.

In contrast, if lymphedema becomes chronic, the fat can be irreversibly and locally stored alongside tissue fluids, leading to adipocyte increase and progressive "lipedema". If allowed to progress for a long period of time, this can cause fibrosis, tissue hardening, and in its final stages, elephantiasis (**Figure 5**). Consequently, controlling fat metabolism will not only prevent obesity but also preserve sound lymphatic function. Lymphatic exercise⁶² has been proposed as a method for preventing and improving edema as well as preventing lifestyle illnesses such as obesity.

While obesity itself is not a life-threatening condition, as a lifestyle disease it is a serious condition that progresses steadily, escaping early diagnosis.

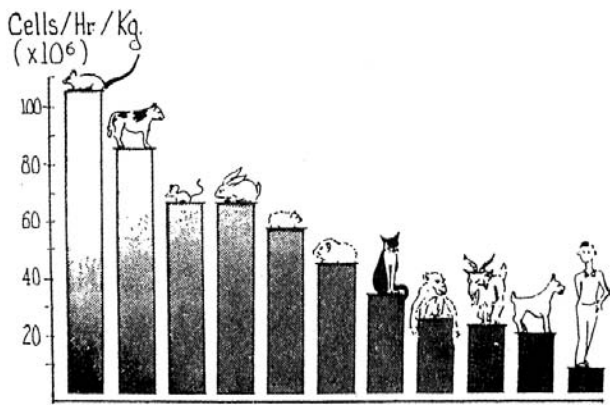


Figure 6 Diagram to illustrate the output of the thoracic duct of various animals.

The number of lymphocytes is measured as the output of thoracic duct per hour and kilogram body weight, and expressed on the Y-axis. (from Reinhardt, 1964)⁶⁷

Furthermore, attention should be focused not only on the vascular pathologies associated with the illness, but also on lymphatic function, which is the key to improving the diseased state. We are expecting additional developments in research into the relationship between fats and lymphatics.

Part 3: Cell Groups of the Lymph and Lymphoid tissues

In this chapter, we discuss the profiles, development and differentiation of the cell groups in lymph and lymphoid tissues.

1. Profile of cell groups in lymph

1) Lymphocytes

Lymphocytes comprise of nearly all cells found in the lymph of mammals, and they were named as such in the 18th century by William Hewson.⁶³ However, their function was essentially unknown until the 1960s hence receiving little attention. Two young clinicians were the first to reveal their functions. The first was an Australian researcher Jacques F Miller⁶⁴ who discovered upon removing the thymus of a newborn mouse to investigate the cause of leukemia that the lymphocyte count decreased and the mouse's cellular immunity disappeared. The mouse also became immunologically compromised and tolerant of transplants. This was the first description of the function of the thymus and thymus-dependent lymphocytes (T cells, from

the first letter of "thymus"). The other clinician was an American pediatrician Max D Cooper. He carried out experiments by excising the thymus and the bursa of Fabricius in newborn chicks to find a way to save young children suffering from severe immune failure. He discovered the function of the bursa of Fabricius and that the lymphocytes (B cells, after the first letter of "bursa") differentiated there to carry out humoral immunity (antibody production).^{65,66}

In mammals (including humans), 85-95% of cells inside the thoracic duct lymph are lymphocytes, and this population is a major source of blood lymphocytes. The number of lymphocytes released from the thoracic duct into the blood is almost predetermined for every animal, and is typically 2-5 times^{13,67} the number of lymphocytes in the blood. This ratio is known as the "daily replacement factor (D.R.F.)".⁶⁸ This means that blood lymphocytes are replaced 2-5 times daily. Interestingly smaller animals with shorter lifespans have more rapid replacement of blood lymphocytes (**Figure 6**).⁶⁷ Cows appear to be an exception, but this is mainly because the data is from small calves. Even within the same species of animal, younger organisms have higher rates of cell replacement. Blood lymphocyte counts in healthy animals remain stable because the number of lymphocytes released into the blood system from the thoracic duct is maintained at a constant value. Injections and drips, particularly of hypertonic glucose, administered intravenously cause an immediate increase in lymph throughput of the thoracic duct, but the thoracic duct lymphocyte count decreases inversely. Thoracic duct lymphocyte release is controlled by a variety of factors, but those most directly and strongly modulating the process are the adrenal and the pituitary glands.^{69,70} Adrenalectomy causes an unregulated increase in thoracic duct lymphocytes. It is well-known that adrenocortical hormones control lymphocyte growth. However, the increase in thoracic duct lymphocytes observed after adrenalectomy occurs in far less time than that required for cell division. It is therefore likely that adrenal excision removes the barriers preventing lymphocyte release from lymph

phoid tissues such as lymph nodes. The daily changes in blood lymphocyte count may be explained by a similar mechanism. Stressing an anesthetized rat (through intravenous administration of potassium chloride) not only causes a decrease in the number of lymphocytes in thoracic duct, but also markedly reduces the cloudiness of the chyle (that is, the fat absorption rate). However, stressing a rat in the same manner after the rat has undergone adrenal (or pituitary) gland excision does not result in a decrease in chyle cloudiness, but rather result in an increase.⁷¹⁻⁷³ These findings indicate that adrenocortical hormones may be deeply involved in fat absorption.

The following are thought to be the main sources of lymphocytes in the thoracic duct:

(1) Cells recirculated from blood to tissue to lymph in lymphoid tissues such as lymph nodes and Peyer's patches;

(2) Cells produced in lymphoid tissues such as the lymph nodes, spleen, and thymus;

(3) Cells that leak into tissues from the unique microvasculatures of all organs.

The recirculated lymphocytes of (1) comprise 60-70% of lymphocytes in thoracic duct. The places where recirculation occurs are high endothelial venules (HEV) in lymph nodes and Peyer's patches.⁷⁴ Eighty to eighty-five percent of the lymphocytes in thoracic duct are T lymphocytes and the rest are B lymphocytes. This ratio is similar to that found in the blood. T and B lymphocytes⁷⁵ pass through the HEV to return to circulation. Various different cell adhesion factors and other molecules are currently being studied to determine the mechanism by which lymphocytes pass selectively through the HEV.⁷⁶ Nearly all cells recirculated through the HEV are naive cells that have not encountered any antigen.⁷⁷ In rats, approximately 80% of lymphocytes in thoracic duct are T cells, and 90% of these are naive T cells. Why are the endothelial cells of the recirculating venules so tall? This is a simple question, but an important one. This feature has not been fully explained. However, in these HEVs, cells can move only from the blood to the parenchyma of the peripheral lymphoid tissues. Cells do not move

in the opposite direction. In contrast, the venules of the thymus, which is a central lymphoid organ, are often lined with shorter endothelial cells like the normal ones. Here, however, thymocytes that have differentiated and matured in the thymus move in the opposite direction, from the thymic parenchyma to the peripheral blood. Thus, the venules of the thymus are the only bidirectional vessels in the entire body that allow cellular movement in both directions. Is there a relationship between the directionality of cellular movement and the height of endothelial cells? During graft-versus-host (GVH) response, when vascular permeability increases, the endothelial cells become flat and a carbon dye can pass through them⁷⁸. After radiation exposure, as the thymic tissue repairs itself, venous epithelial cells become taller and cuboidal, allowing lymphocytes to pass through, into the thymus. But why?

The newly created lymphocytes of (2) produced in the lymph nodes, spleen, and thymus are another important source of thoracic duct lymphocytes. Continuously cannulating the thoracic duct lymph of a rat causes rapid decline in the lymphocyte count to approximately 1/10th of baseline levels after 4-5 days. Continuing cannulation causes no further reduction in the cell count. This base count is known as the "thoracic duct baseline". Medium and large lymphocyte counts increase at this point (20-30%). The weight of the mesenteric lymph nodes, popliteal nodes, thymus (particularly its cortex), and spleen are reduced to 1/4-1/5th of their normal values. At this time, if only the cells are removed and the lymph plasma is returned to circulation, lymphoid tissues shrink to only to 3/4th to 1/2th of their normal size.⁷⁹ This means that there must be some factor that stimulates lymphoid tissues and increases lymphocyte production in lymph plasma.

The thymus which plays a very important role in the body, is the central lymphoid organ, and the source of lymphocytes in thoracic duct. Excising the thymus of a mouse causes thoracic duct lymphocyte counts to decrease by more than 50% in 7 days. Excising the thymus of a guinea pig causes thoracic duct lymphocyte counts to decrease by more than 40% in 14 days. The thymus is well-

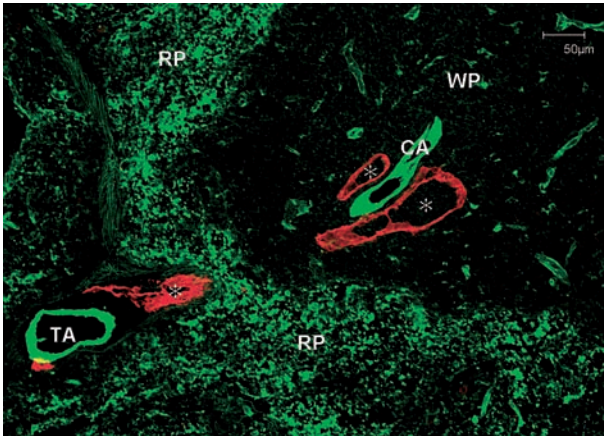


Figure 7 Lymphatic vessels in the mouse spleen. Confocal double-immunofluorescent image of microvascular segments with FITC-conjugated LEL tomato-lectin (green) and LYVE-1 (red). Initial lymphatic vessels (*) adjacent to a central artery (CA) in the white pulp (WP) are seen. RP, ret pulp; TA, trabecular artery. Bar: 50 µm. (from Shimizu et al., 2009)⁸³

known as the site of T lymphocyte production. Lymphocytes produced in the thymus can directly enter venous circulation. However, since the discovery of lymphatic distribution in the thymus, researchers have determined the significance of it in lymphogenous release as well.^{80,81} Approximately 16% of the total blood lymphocytes of a guinea pig are released daily from the thymus lymphogenously. In birds, unlike in mammals, T and B lymphocyte production is compartmentalized into the thymus and the bursa of Fabricius, respectively. However, well-developed lymphatics were found to be distributed in the bursa of Fabricius, and the B lymphocytes produced there were also found to be released lymphogenously.⁸² The spleen, a peripheral lymphoid tissue, is also an important source of thoracic duct lymphocytes. Recently, lymphatics were detected in the white pulp of a mouse spleen,⁸³ demonstrating the possibility that lymphocytes produced in the spleen are also lymphogenously released into circulation (**Figure 7**).

(3) Unlike granulocytes, lymphocytes do leak from the specific microvasculature in each organ even without inflammation, patrol the tissues, and enter the peripheral lymphatic capillaries. This is clear because the afferent lymphatics of primary lymph nodes always contain a certain number of

lymphocytes and macrophage-like cells.⁸⁴ However, determining specifically the exact region of vessels from which the cells leak remains difficult. In contrast, in a pathological state, lymphocytes that have gained antigen information in tissues induce immune responses in their associated lymph nodes. The blood-tissue-lymph pathway used by these cells follows a similar recirculatory process to that of ①, and HEV may also be involved.

Lymphocytes leaked from the vasculature of the intestinal villi move through the epithelial cells of the mucosa, gain antigen information, return to the lymphatics of the villi, travel to associated lymph nodes, and induce immune responses. This is the generally accepted view. However, all the countless lymphocytes which move through the mucosal epithelium cannot return, and some burst into the digestive tract. Here is a mystery. For lymphocytes, the digestive tract acts as their graveyard. The doomed lymphocyte that has burst into the digestive tract will be immediately destroyed, its nuclear elements absorbed from the intestine, and then re-used as components to construct new cells in the lymph nodes, thymus, spleen, and marrow.⁸⁵ Further, the nuclear components absorbed from the digestive tract of a pregnant woman are utilized to create new hematopoietic stem cells and other cells in the lymph nodes, thymus, and spleen of her fetus.⁸⁶ These nuclear components are not only absorbed into the blood and lymph as nucleotides and nucleosides, but also as intact DNA molecules.⁸⁷ This fact may explain the inheritance of immunological memory in lymphocytes.

The blood and the spleen also contain natural killer (NK) cells.⁸⁸ These cells are capable of causing nonspecific damage to tumor cells, and cells transformed by viruses. NK cells are large lymphocytes containing azure granules (large granular lymphocytes: LGL, which make up 5-10% of the lymphocytes in the peripheral blood) and are considered as one type of lymphocyte. However, NK cells do not appear in the thoracic duct lymph or in the lymph nodes. Here is another mystery. First, lymphocytes are so named because they appear primarily in lymph and lymphoid tissues, and not because they

Table 3 Percent populations of lymphocytes in various species.

Species	in lymph (%)	in blood (%)
Eel	62.1	20.6
Catfish	43.5	22.0
Toad	52.1	32.3
(Japanese) rat snake	80.0	56.0
(Japanese) pond turtle	86.1	47.0
Duck	96.7	26.9
Human	97.0	23.0

(from Kotani, 2012)¹

have a specific shape or function like the names given to other cells.⁶³ Further, nude mice, which lack the thymus from birth, do not contain T cells, which are thymus-dependent lymphocytes, but instead have many NK cells, and the activity of these cells is more pronounced. As a result, these cells can also be referred to as “extrathymically differentiated T cells”.⁸⁹

2) Non-lymphocytic cells (monocytes, dendritic cells)

In humans, monocytes comprise approximately 5% of the white blood cells of the peripheral blood and 3% of cells in thoracic duct lymph. However, in the peripheral lymph, this fraction increases to 5-22%.⁸⁴ Unlike granular leukocytes, monocytes circulate from the blood to tissue to lymph even under non-inflammatory conditions in the same way as lymphocytes. Monocytes are the cornerstone of our biological defense mechanisms. They have a strong phagocytotic function and consume and process foreign bodies and antigens that enter the tissues. They also release intracellular lysosomes from the cell, promoting tissue repair and rebuilding. Monocytes that migrate to the thymus can release lysosomes that destroy Hassal’s corpuscles,^{90,91} assisting in the differentiation and maturation of thymocytes. Furthermore, an important function of monocytes is antigen presentation via uptake and degradation of antigens, and the induction of immune responses in associated lymph nodes via peripheral lymphatic vessels.^{92,94} Monocytes that have taken up antigens were detected in the thymi of autoimmune-developing NZB/w F1 mice.⁹⁵

One cell type has a count (1-3%) far lower than

that of monocytes but carries antigen information from the tissues through the peripheral lymphatics to lymph nodes. These cells have tree-like processes, hence named dendritic cells (DCs).⁷⁷ The cell most representative of this cell type is the Langerhans cell, which extends long dendritic processes between the epidermal cells of the skin. These cells are also present in mucosal stratified squamous epithelium such as in the oral cavity, pharynx, and esophagus. When Langerhans cells in the epidermis leave and enter the lymphatic vessels of the dermis, they must shrink their long processes and swim about freely in the lymph as they move towards their associated lymph nodes. As a result, they are also sometimes called veiled cells. Veiled cells are one type of antigen-presenting cells (APC), but to switch places for renewal with new Langerhans cells, they may leave the epidermis. DCs are also present in the peripheral lymphatics like in the intestinal and the bronchial mucosa, as well as in the lymph of the liver.⁹⁶ DC progenitors from the bone marrow exit the sinusoids of the liver, flow through the space of Disse, and appear as DCs in the hepatic lymphatic vessels that originate in the interlobular tissues, eventually reaching the hepatic lymph nodes to induce an immune response. Here, is a mystery. DCs are present in the afferent lymphatics of a lymph node, but not in the efferent lymphatics! Do DCs enter the paracortex of the lymph node (T cell area) and perish after presenting the antigens or their information to the interdigitating cells (IDCs) distributed here, or do they settle as IDCs and continue to stimulate lymphocyte activity? One principle states that peripheral lymph must pass through at least one lymph node before entering the thoracic duct (the law of intervention),¹⁹ which may explain why DCs are not observed in the lymph of the thoracic duct.

2. Phylogeny of cell groups in lymph

1) Lymphocytes

Jawless cyclostomes like lampreys do not contain lymphocytes; these cells first appeared in cartilaginous fishes like sharks. The lymph vessels of these animals are not independent from their blood vessels, and should therefore be referred to as hemo-

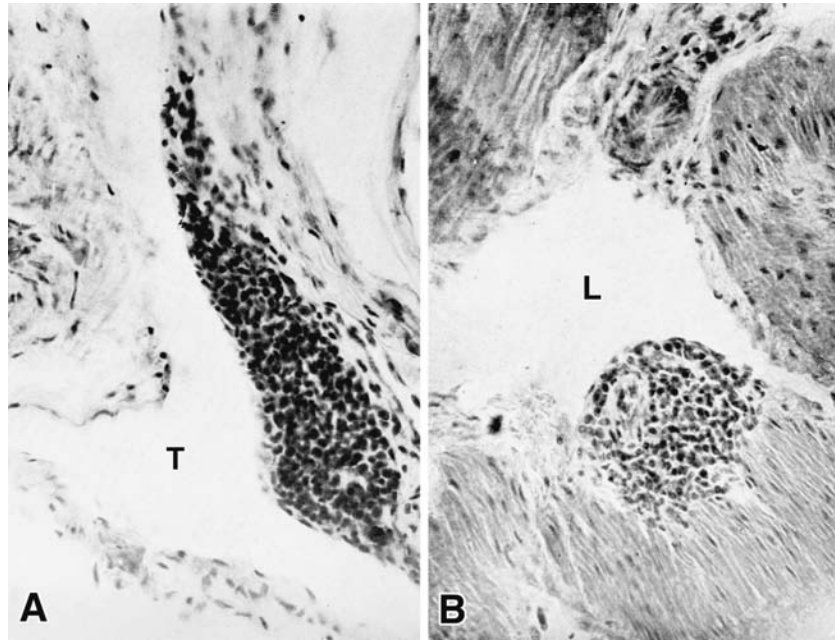


Figure 8 Subendothelial lymphoid tissues in the lizard.

A: A triangular lymph nodule projects into the lumen of the wall of the thoracic duct (T).

B: A spherical lymph nodule projects into the lumen of a lymphatic vessel (L) between the internal circular muscular layers in the small intestine.

(from Kotani, 1961)⁹⁸

Table 4 Cell populations in lymph of various species.

Species	Lymphocytes (%)	Non-lymphocytes (%)
Eel	62	38
Catfish	51	49
Toad	36	64
(Japanese) rat snake	80	20
(Japanese) pond turtle	86	14
Duck	98	2
Human	97	3

(from Kotani, 2012)¹

lymph vessels.¹⁶ As a result, all cells in the blood also appear in the lymph. All animals with independent lymphatic and vascular systems, from osteichthyes to mammals, have far higher lymphocyte counts in the lymph than in the blood^{97,98} (**Table 3**). In toads (anuran amphibians), lymphocytes make up 52% of lymph cells. In the Japanese rat snake and Japanese pond turtle (reptiles), this ratio is even higher, and lymphocytes comprise nearly all cells in the lymph of ducks (birds) and humans (mammals). The lymph nodes of mammals are quite well-developed and these animals can use their lymph nodes as a source of lymphocytes, while birds (like ducks and geese)

only have small primitive lymph nodes: one pair in the neck that intervenes with the thoracic duct (cervicothoracic nodes) and one pair at the pelvis (pelvic nodes) (**Figure 4B**). Reptiles and anuran amphibians do not, of course, have lymph nodes. What do these animals use as the source of intralymphatic lymphocytes? In these animals, numerous simple lymphatic structures appear not only in the thoracic wall, but also in peripheral lymphatic vessel walls as subendothelial lymph nodules and subendothelial lymphatic infiltrates.^{20,98} Their outer surface is covered in lymphatic endothelium, and many structures protrude into the lymphatic lumen (**Figure 8**). Similar lymphatic nodules and lymph infiltrates are widely distributed as endothelial lymphatic structures in humans and other mammals, all of which have well-developed lymphatic systems.

2) Non-lymphocytic cells (granulocytes, monocytes)

Fish, amphibians, and reptiles have much greater number of non-lymphocytic cells appearing in their lymph compared to birds and mammals^{97,98} (**Table 4**). The number of different types of non-lymphocytic cells is also increased⁹⁷ (**Table 5**). Cells

Table 5 Cell populations of non-lymphocyte in lymph of various species.

Species	Neutrophils (%)	Eosinophils (%)	Basophils (%)	Mononuclear cells (%)
Eel	9.2	0	0	25.8 [#]
Catfish	12.9	0	0.1	43.3 [#]
Toad	42.0	19.0	0.3	4.6 [#]
(Japanese) rat snake	3.8 [*]	0	0	16.2 [#]
(Japanese) pond turtle	8.2 [*]	0	0	5.7 [#]
Duck	0	0	0	0.6
Human	0	0	0	3.0

* These cells correspond to neutrophils in mammals, but their specific granules are eosinophilic due to the metachromasia.

[#] Including monocytes and histiocytes.
(from Kotani, 2012)¹

found in the blood are also present in the lymph of toads, from granulocytes such as neutrophils, eosinophils, and basophils, through to monocytes and pigment cells [excluding red blood cells and spindle cells (nucleated cells that function similarly to mammalian platelets, also known as thrombocytes)]. This is also true for osteichthyes and reptiles. Then, why are granulocytes always present in the blood of reptiles, amphibians, and osteichthyes when they appear only in the blood of mammals during inflammation? What are the sources of these cells? In mammals and birds, granulocytes are produced in the bone marrow and released into the vasculature. However, the marrow of osteichthyes is still quite primitive, and myelopoiesis is first observed in anuran amphibians, which also only occurs in the short period of time immediately following hibernation. Myelopoiesis is slightly more active in reptiles, but the marrow is not the hematopoietic center as it is in mammals and in birds. Even if granulocyte production is high in the marrow, this tissue does not contain lymphatics; therefore, it could not be a direct source of intralymphatic cells. Thus, extramedullary hematopoiesis occurs in various organs and tissues of fishes, amphibians, and reptiles. Majority of granulocyte production occurs in intestinal folds (primitive spleen) in cyclostomes, in the gonad mesenchyme (ovaries/testes) in cartilaginous fishes, in the mesonephric mesenchyme in osteichthyes, and in the hepatic mesenchyme (particularly subcapsular areas) in caudate amphibians. In frogs (anuran amphibians) and turtles (reptiles), the subepithelial intestinal mucosae are the foci of

granulocyte hematopoiesis, which is where all immature cells reside. As granulocytes that mature in these extramedullary hematopoietic foci, enter the blood vessels, it is assumed they also enter lymphatic vessels distributed in the same area. Either way, in osteichthyes, amphibians, and reptiles, granulocytes may migrate from blood vessels to tissues and into the lymphatics regardless of the presence or absence of inflammation, unlike in mammals.

The next topic of focus is the high proportion of monocytes contained in the lymph of eel and catfish (**Table 5**). The proportion is much higher than that in the blood (8.7-10.1%). This is because of the presence of numerous histiocytes (macrophages residing in tissues) in addition to monocytes. In osteichthyes, the monocytic and histiocytic systems are distinguished from each other, and histiocytes are 2-3 times larger than large lymphocytes. The proportion of mononuclear cells in the lymph of a toad is low, but half of these are monocytes, and the other half are histiocytes. These proportions are somewhat lower than those in the blood (4.8-3.7%). Histiocytes contain brown pigment cells, which are macrophages that have taken up melanin pigment. The mononuclear cell content of the lymph of the Japanese rat snake is somewhat lower than that of the blood (26.6%), but it contains both monocytes and histiocytes. Histiocytes, like monocytes, are capable of phagocytosis, and foreign bodies and bacteria that have invaded the body are destroyed by their lysosomes. Histiocytes are also known as antigen-presenting cells. Except for toads, the histi-

ocyte fraction in the lymph becomes higher in phylogenetically more ancient organisms, moving backwards from reptiles to fish, and the fraction is particularly high in fish. This indicates a high degree of dependence on the macrophage system as a biological defense mechanism. In general, histiocytes are not present in mammalian lymph. However, if Langerhans cells, which migrate from the dermis to the basal cell layer of the stratified squamous epithelium, are considered as histiocytic macrophages,⁹⁹ then histiocytes are present in the peripheral lymph of all animals (except for birds, which have not been examined in this field).

Part 4: Relationship Between the Lymphatic System and Fat

In recent years, with growing interest in the modern illnesses of obesity and metabolic disorders, there has also been increased molecular and genetic research into the relationship between lymph and fat.^{60,100} While some of these points may overlap with those already covered, there are numerous aspects that are not well-understood, involving the relationship between the lymphatic system and fat. Thus, in this section, we will present topics and points of interest at a more detailed, phenomenological level, and we would invite younger researchers and clinicians to join us in this journey.

1. Lymphatics as absorbers of fat

Broadly speaking, fat absorption from the digestive tract is not carried out by subepithelial blood capillaries, but by the lymph vessels central to each intestinal villus. In body tissues, the lymphatic system functions to collect substances that cannot be collected by the blood vessel system, such as large molecules above a certain size (hyaluronic acid, high-molecular weight proteins, etc.), long-chain fatty acids with more than 12 carbon chain length, and cells.¹⁰¹⁻¹⁰³ Normally, fat components such as long-chain fatty acids are taken up by the lymphatics in the form of chylomicrons (0.1-0.3 μm). As a result, after eating, intestinal lymph becomes a milky white color and this is the reason it is called "chyle". Consequently, short- to medium-chain fatty acids with 12 or fewer carbon chain length, can be ab-

sorbed into the blood capillaries of the intestine by natural diffusion. Whether a fat is absorbed via the blood capillaries or only via the lymphatic capillaries mostly depends on its molecular size, but there are some differences depending on the type of animal and of fat. However, whether all lymphatic capillaries throughout the body have the same absorbent function or whether they have site specificity¹⁰⁴ with differing functions depending on their location, as is the case with blood microvascular groups, remain unclear. However, in recent years, the existence of organ-specific lymphatics has become a topic of discussion.^{105,106}

An early method for imaging the lymphatics involved the use of a compound used for oil painting: a mixture of Prussian blue and turpentine (Gerota's suspension), taking advantage of the lymphatics' preferential absorbance for oily liquids. Further, a study in Japan was the first in the world¹⁰⁷ to use an oil-based iodine formulation to achieve contrast visualization of the lymphatics as a clinical diagnostic tool, followed by the widespread use of low-leaking lipiodol and other lipid-soluble contrast agents, which have a smaller degree of "extravasation", a disadvantage of subsequent water-soluble contrast agents.

2. The reason mineral oil causes lymphangiomas

Interestingly enough, lymphatics are not the only structures in the body capable of absorbing fats. Mesothelial cells covering serosal cavities such as the abdominal cavity also react uniquely to fats.

In the 1970s, it was discovered that the administration of mineral oil or pristane (used to induce ascites) into the abdominal cavity caused the formation of tumors composed of various cells (myelomas, B cell lymphomas, etc.).¹⁰⁸ Simultaneously, a different type of tumor was discovered on the surface of the abdominal cavity. At the time, this finding did not receive much attention, but after 10 years or more, Mancardi et al.¹⁰⁹ reported the use of a very similar adjuvant (Freund's incomplete adjuvant; FIA) to induce the development of a benign lymphangioma. They pathologically examined the lymphangioma and found that it comprised of peritoneal mesothe-

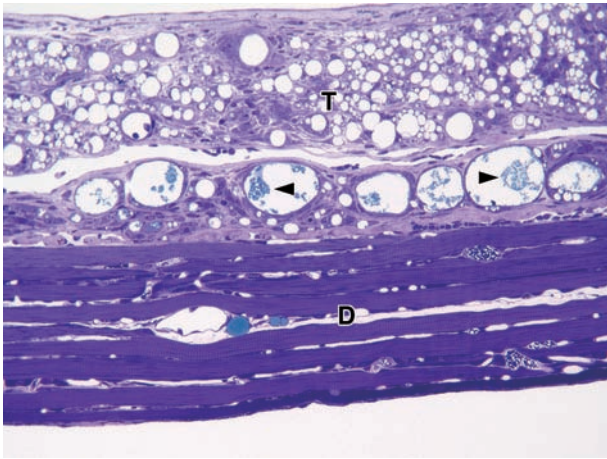


Figure 9 Adjuvant-induced lymphangioma in mice. Typical honey-comb like benign tumors (T) develop on the surface of diaphragm wall (D) after an intraperitoneal injection of Freund's incomplete adjuvant (FIA). Note that EM-blue dyes (arrowheads) mixed with FIA are up-taken and contained together in larger tubular structures in the tumor.

lial cells that had taken up various cells such as intraperitoneal macrophages derived from bone marrow, and progressed to form a type of mesothelioma (**Figure 9**). Thus, after stimulation by the oil, the normally single-layered, flat cells of the mesothelium began to form a three-dimensional structure, loosen their intercellular junctions, and temporarily lose their polarity while ingesting the oil. Further, podoplanin (PDPN), a mesothelial marker, was forcibly expressed and substances like chemokine CCL 2 were secreted, which attracted bone-marrow derived peritoneal cells, forming various types of tumors on the whole surface of the abdominal cavity. During tumor development, ingested lipid droplets of various sizes fused together within the cell and became very large. The droplets further fused with the neighboring cells to join together and form either a tubular structure or a very large cystic structure. As part of this process, other non-mesothelial cells, such as bone-marrow derived macrophages, also rapidly took up FIA, invaded the mesothelium, and participated in tumor formation. Eventually, a tubular structure gradually began to link together, ultimately forming a structure functionally similar to that of a lymphatic vessel. Additionally, we induced this type of tumor in a mouse,

collected tumor cells as a source of immunogen for lymphatic markers¹¹⁰ to immunize rats, and succeeded in developing a monoclonal antibody for the mouse lymphatic endothelium.¹¹⁰ This was because accumulation of a sufficient amount of lymphatic endothelium from a healthy mouse for antigen production was very difficult. In specific areas of the abdominal cavity, particularly the macula cribiformis on the surface of the diaphragm, mesothelial cells of the peritoneum, and endothelial cells of the lymphatics come into direct contact with each other.¹¹¹ As a result, these two cell types are tightly linked and each type can move the other. In this process, the aforementioned adjuvant-induced lymphangioma may have formed through uptake of the foreign oil adjuvant by mesothelial cells and peritoneal macrophages, and after some time, several tumors merged together to form a tubular shape and eventually form a long lymphatic-like drainage pathway to drain these substances outside of the peritoneal cavity. Here is a mystery. Fat (mineral oil) is involved in high degree of interrelation between the mesothelium and the endothelium and is one of the factors that brings these two structures closer together. Thus, we propose¹¹² that a mesothelium-fat incorporating cell-lymphatic endothelium transformation process (meso-endothelial transformation) may be occurring. This process has recently gained much attention, and studies to understand this process are a key step for explaining the mechanism of lymphangiogenesis.^{113,114} If we can control the shift between mesothelial cells and lymphatic endothelial cells, it may be possible to develop treatment for chronic lymphedema and even peritoneal sclerosis¹¹⁵ suffered by peritoneal dialysis patients.

In our experience, multiple tumors can form from the various mesothelial cells on the surface of the peritoneum even one week after administration of this adjuvant to the abdominal cavity. Here is another mystery. The one exception to this process occurs in the mesothelial layer covering the ovaries, the surface epithelium (also known as the germinal epithelium). We observed almost no adjuvant-induced changes in this layer. Cells in this layer nor-

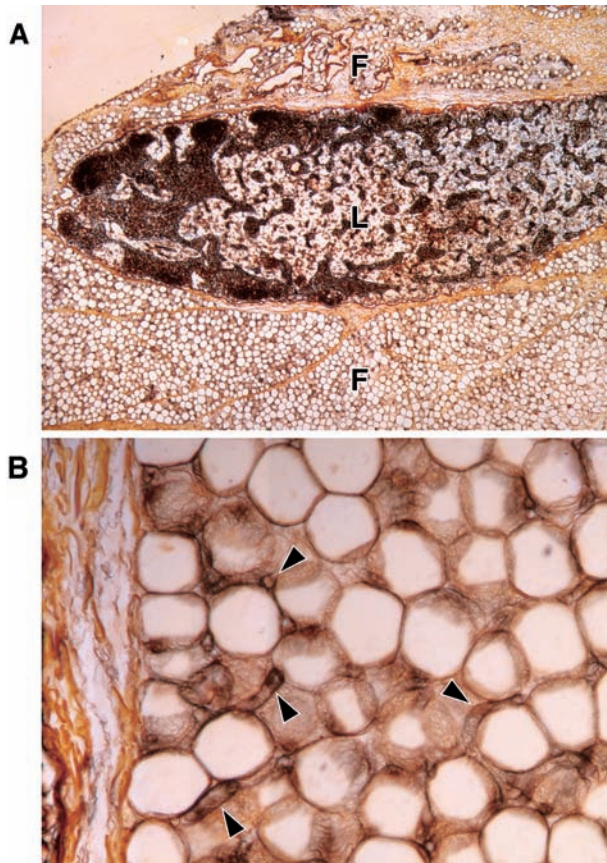


Figure 10 Reticular tissues as the primary construct of lymph nodes and adipose tissue.

A: An intimate relationship between lymph node and adipose tissue. Both consist of argentaffin reticular fibers which are strongly stained by silver staining.

B: A higher magnification image of the adipose tissue. The individual fat cells and many capillaries (arrowheads) are covered with very fine reticular meshworks. A&B: Silver staining is done to visualize reticular fibers.

(from Ezaki, 2014)²

mally form a squamous-to-cuboidal layer. Perhaps because they are preparing for the periodic release of an ovum, these cells do not form a simple squamous layer like the mesothelial cells of other sites. Alternatively, the predisposition of these cells to ovarian cancer may be inversely correlated with adjuvant-induced mesotheliomas.

3. Reticular tissue: A fundamental structure of the lymphatic system and adipose tissues

Normally, the lymphatics and lymphoid tissues are inextricably related to adipose tissue. Another mystery appears here. Both tissues have an abundance of so-called reticular fibers (primarily made of type III collagen fiber) and are therefore examples

of reticular tissue. Reticular tissue is composed of mesenchymal reticular cells (a special type of fibroblast and also part of the histiocyte group) and the reticular fibers produced by these cells. This special connective tissue provides a space for the smooth movement of interstitial fluid, cells, and substances. Reticular fibers are particularly well-developed in hematopoietic, lymphoid, and adipose tissues (**Figure 10**). In other words, all lymphoid and hematopoietic tissues contain these reticular tissues as their basic structure, and freeloader blood-type cells also migrate to these sites. In adipose tissue, adipocytes are surrounded by reticular fibers, where active metabolism takes place, also making it a type of reticular tissue. Lymph nodes are normally buried in adipose tissue in bends of the body (below the jaw: submaxilla, armpit: axilla, groin: inguen, and back of the knee: poples). Consequently, it is normally difficult to palpate the lymph nodes, and they can only be palpated after they become inflamed because of infection or some other process. At these times, the lymph nodes may swell anywhere from 2-3 times the normal size to 20-30 times, depending on the extent of inflammation. As mentioned earlier, the lymph nodes are normally buried in adipose tissue, allowing them the freedom they require to carry out immune responses and to maintain thermostability. Further, extravascular fluid pathways²⁰ exist between the serosal cavities and the vascular system, and reticular fibers are distributed in abundance particularly in these areas. These pathways serve as an important route for the drainage of extracellular fluid into the lymphatic system. Consequently, when lymphatic or adipose congestion occurs, these areas are often prone to lymphedema or lipedema. Thus, further studies to investigate the components that form reticular tissue are important to provide insight into the mysterious relationship between the lymphatic system and the adipose tissue.

4. Age-dependent involution and fat replacement (infiltration of adipose cells)

Generally, hematopoietic and lymphatic tissue degenerate with age, eventually being replaced with adipose tissue. For example, the bone marrow of

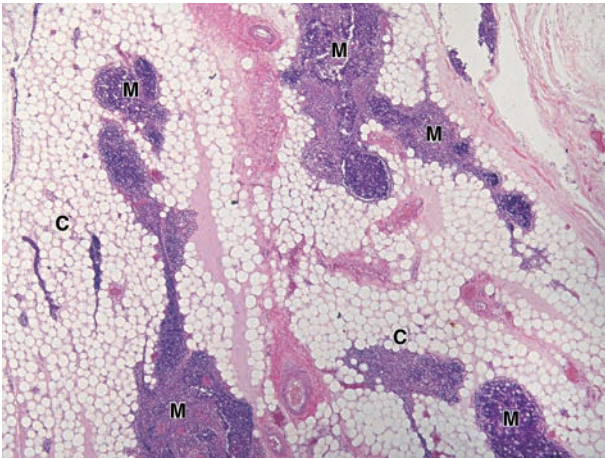


Figure 11 Normal thymus of a woman of around 20 years old.

Only the medulla (M) remain, whereas the cortex (C) is almost completely involuted and replaced with adipose tissues. (from Ezaki, 2014)²

humans changes from red to yellow with age. The thymus has the most severe age-dependent involution. Here is a mystery. As explained previously, it is not an exaggeration to state that lymphatic tissue and adipose tissue are of the same origin. Developmentally, both descended from mesenchymal cells and are regarded as differentiated reticular cells that produce reticular fibers. Consequently, although lymphatic tissue (hematopoietic tissue) is a microenvironment formed by reticular cells for the movement of particles and vigorous metabolism, where the blood cell system resides, as the hematopoiesis of this tissue decreases with age, the residing blood cells disappear, while the remaining cells accumulate excess nutrients and waste products and may eventually turn into adipocytes. This may be another form of transformation. Nagasawa et al.¹¹⁶ reported that bone marrow reticular cells act as a microenvironment (niche) for hematopoietic stem cells, while simultaneously differentiating into adipocytes or osteoblasts. However, the mechanism that promotes mutual differentiation among these cells remains unclear. Further, it is still unclear whether the age-dependent involution and fat replacement observed in lymphoid tissues occur because the reticular cells directly transform into adipocytes or because other cell types transform. However, it is very important to determine the mecha-

nism behind this progress, as such findings would reveal the nature of diseases and pathologies such as myelofibrosis, which involves characteristic fat replacement and fibrosis of bone marrow tissue. The fat replacement and fibrotic changes in the bone marrow observed in chronic lymphedema, in a sense, greatly resemble the age-induced regression of lymphatic tissue. Thus we hope for future advancement in this area of research.

5. Lymphoid tissues and steroid hormones

To the clinician, steroid hormones are truly a double-edged sword, confirming the very close relationship between the lymphatic system and steroid hormones.⁷⁰ Previously, it was common to measure the medicinal efficacy of steroid hormones by monitoring the degree of regression of the thymus. Traditionally, corticosteroids have been used as powerful immunosuppressants, and lymphocytes possess glucocorticoid receptors.¹¹⁷ Similarly, the age-dependent involution of lymphoid tissues is strongly influenced by the puberty-induced release of sex hormones that cause development of secondary sex characteristics. The mystery here is that, despite both being steroid hormones, corticosteroids and sex hormones have completely different targets and effects. Sex hormones in particular are far more effective at inducing aging effects and, are responsible for causing the dramatic changes seen during puberty and menopause. Sex hormones are a type of lipid steroid hormones, demonstrating the connection between the lymphoid and adipose tissue. As we enter puberty and the production of sex hormones increases, almost all lymphoid tissues, beginning with the thymus, are affected by this change, and this triggers age-dependent regression. After passing through puberty, the thymus ceases nearly all of its immunological functions, undergoing involution, and most of the remaining reticular tissues undergo fat replacement (**Figure 11**). An interesting question is whether the remaining reticular cells,¹¹⁸ including the stroma cells, have receptors for steroid hormones. According to Haruki et al.,¹¹⁹ the main structures with estrogen receptors in the thymus are not thymic lymphocytes, but are rather reticular epithelial cells. This suggests that the in-

Table 6 Autoimmune diseases common in women.

Major disorder	Incidence ratio in female (compared with male)*
Systemic lupus erythematosus (SLE)	9 ~ 10
Takayasu arteritis	10
Sjögren syndrome	14
Fibromyalgia syndrome	7
Systemic sclerosis	3 ~ 9
Rheumatoid arthritis	5
Polymyositis/Dermatomyositis	2.5
Basedow disease	4 ~ 7
Hashimoto's thyroiditis	10 ~ 20
Myasthenia gravis	2

* References: Internal Medicine, 8th edition (Sugimoto T, Omata M, Mizuno Y eds), Asakura Shoten, Tokyo (2003) etc. (from Ezaki, 2014)²

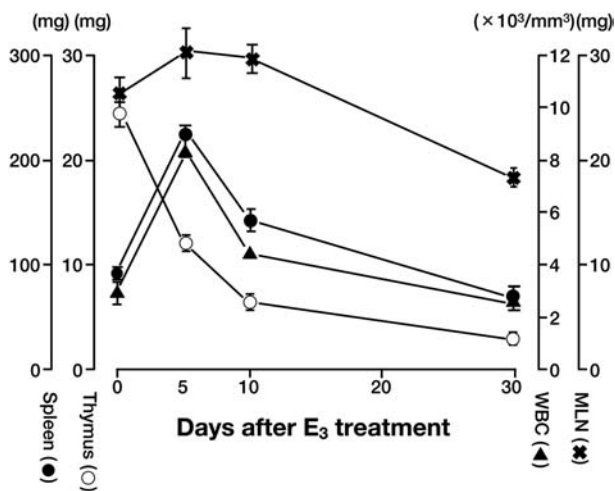


Figure 12 Effects of estradiol (E₃) on immune system. Weights of the thymus, spleen, mesenteric lymph nodes (MLN), and the number of white blood cells (WBCs) in the peripheral blood in adult male mice were measured at various times after having received 10 mg of E₃ by the intraperitoneal injection. On day 5 after E₃ treatment, the thymus quickly involuted, whereas both weights of the spleen and MLN and the number of WBCs in the peripheral blood reversely increased. (from Ezaki, 2014)²

volution and fat replacement of the thymus does not occur in a unified manner, but that the effect of sex hormones may occur in the lymphocytes of the thymus and in the microenvironment in a pluralistic manner.

6. Diseases with gender differences: High prevalence of autoimmune diseases and primary chronic lymphedema in women

Generally, it remains a complete mystery as to why many autoimmune diseases exhibit gender differences (Table 6). Fundamentally, women have

stronger autoimmune responses than men, but, according to Ahmed et al.,¹²⁰ the effect of these sex hormones are almost completely mediated by the thymus, namely T cells. Moreover, immunomodulatory T cells are the most sensitive to sex hormones during peripheral immune responses.

Based on the effects of thymus weight in our experiments using mice, corticosteroid hormones have the strongest regressive effects, followed by female hormones (estrogen), while the hormones showing the weakest effect were androgens (testosterone). However, the actual targets of these hormones may differ. First, corticosteroid hormones not only kill peripheral mature lymphocytes directly, but also deliver a lethal blow to thymocytes. However, estrogen does not directly damage thymocytes, but appears to force them to emigrate from the thymus (Figure 12).

A particularly interesting aspect is that the estrogen estradiol (E₂) has the lowest physiological activity among the female hormones. Compared to estradiol (E₂) and estrone (E₁), E₃ has an extremely weak activity (1/10-1/100) towards its original target as a female hormone (namely against the reproductive system). However, it has a similar level of potency as other estrogens have on lymphoid tissue or any tissues other than its original target, and it may even have a unique effect not found in E₁ or E₂.^{16,121-123} Therefore, during the fetomaternal relationship, E₃ levels rapidly increase in the maternal body at the end of pregnancy not only to maintain maternal immune function and continuation of

Table 7 Possible effects of estrogen (E3) on various targets in vivo.

Target	Action · Effect *
Reproductive organs (original targets)	↑ : growth and maturation (promote function)
Lymphoid tissues	
· thymus	involution (driving thymocytes out of thymus)
· hematopoietic tissues (e.g. bone marrow)	↑ : hematopoiesis (production of EPO, GM-CSF) ↑ : production of platelet-derived factors
Connective tissues	
· fibroblast	↑ : synthesis of extracellular matrix (hyaluronic acid etc) ↓ : synthesis of fiber
· vascular endothelial cell	↑ : vascular growth and permeability
· macrophage	↑ : phagocytic activity of RES cells ↑ : tissue MMP-9
· natural killer cell	↑ : killer function
· mast cell	↑ : degranulation (histamine · serotonin release)
Metabolic system	
· bone metabolism	↓ : osteoclasts (→ prevent osteoporosis) ↑ : osteoblasts
· lipid metabolism	↑ : blood cholesterol and triglyceride ↓ : oxidation of LDL (→ prevent arteriosclerosis)
· hepatocyte	↑ : proliferation ↑ : synthesis of alpha-fetoprotein (→ blastogenesis of hepatocyte?) ↓ : synthesis of albumin
· submandibular gland	↓ : production of EGF by duct cells
Central nervous system	↑ : sexual differentiation of the brain ↓ : synthesis of amyloid (→ prevent Alzheimer disease)

* According to our data and general textbooks. (from Ezaki, 2014)²

pregnancy, but also to promote differentiation and development of organs and tissues of the fetus (**Table 7**). Like the fat-soluble vitamins Vitamin A and Vitamin D, thyroid or other steroid hormones, estrogen is thought to exert an extremely powerful effect on the body through its ability to regulate the transcription of a large number of genes by binding to and activating the nuclear receptor. These lipids have a basic chemical structure in common, known as the steroid ring. However, they are mysterious substances, as they can also exert the exact opposite action with only slight differences in their respective terminal residues. This indicates that gender differences in autoimmune diseases may originate from the wide range of the effects of estrogen. In contrast, androgens affect only immature B cells.¹²⁴ An animal model¹²⁵ in which B cell defects (chemical bursectomy) were produced by soaking chicken eggs in a testosterone solution has been widely cited.

We do hope that in the future, the direct relation-

ship between sex hormones and age-related changes, and sex hormones and lymphatic systems is clarified.

Appendix: Four Principles of the Course and Distribution of the Lymphatics and the Lymph Nodes

As described above, tissues or organs in which blood vessels are not distributed (epithelial tissue, cornea, cartilage tissue, hard tissues of the teeth, etc.) naturally lack lymphatics. However, there are organs in which blood vessels are distributed while lymph vessels are not. For example, in parenchymal organs such as the liver, kidney, mammary gland, and pancreas, lymphatic vessels are distributed in the interlobular connective tissue and in the capsule that covers the organ, while no lymphatic vessels are present in the parenchyma. Furthermore, the lymph capillary network exists only at a certain distance from the capillary network and runs alongside blood vessels only after becoming a slightly larger collecting lymphatic vessel and is at

some distance from the tissues and organs.

Additionally, there are principles concerning the lymphatic vessel system which are extremely important in clinical practice, particularly in the surgical treatment of malignant tumors. These were described more than half a century ago by Kutsuna¹⁹ as the “Three Principles of the Course and Distribution of the Lymphatics.”

Principle 1: In the human body, all lymphatics must pass through at least one or more lymph nodes before merging with a vein. (**Law of Intervention**)

Principle 2: Lymph flows only in one direction: from the periphery towards the core of the body. (**Law of Conduction**)

Thus, because valves are present in the lymphatics after the collecting lymphatic vessels, under normal conditions, a specific lymphatic will not empty into a non-associated node, nor will backflow occur.

Principle 3: Near the midline of the human body, all lymphatic vessels, whether superficial or deep, will form left-right anastomoses. (**Midline Cross-over Phenomenon**)

In addition to these, we propose another important point, and thus would like to retitle this list to “Four Principles of the Course and Distribution of the Lymphatics and Lymph Nodes.”

Principle 4: Lymph vessels regenerate, but once excised, lymph nodes do not, because the number of lymph node primordium is constant in one’s whole life. (**Non-regeneracy of Lymph Nodes**)

As described above, according to Kotani, the number of lymph nodes, like the spleen, is determined during development. At present, research into regeneration of lymph nodes has received attention as a putative countermeasure against infection and cancer metastasis. However, once the lymph node itself is removed, it will not regenerate. This is an extremely serious concern for clinicians who remove lymph nodes alongside malignant tumors. Recently, there have been attempts to produce artificial lymph nodes,¹²⁶ but so far, there has been no reliable successful cases of producing one similar to that of a natural lymph node.

We would therefore like to reaffirm the deeply

clinically relevant “**Four Principles of the Course and Distribution of the Lymphatics and Lymph Nodes**” and hope that they will be a point of reference for future clinical activities and research development.

Afterword

Lymphatic research is now in a completely new era in terms of both basic and clinical medicine. This is demonstrated by the great progress made in the imaging of lymphatics.^{127,128} Elucidating the processes and mechanisms of lymphatic development will continue to gradually provide insight into lymphatic function and its physiological, immunological, and oncological significance. If comparing the blood vessels in the body to a plumbing system, the lymphatics would function as the sewer. Although the lymphatic system is not as immediately and direly linked to life or death as the cardiovascular system, we must not forget that when these sewers are clogged and they stop functioning, life activities become quite arduous. Therefore, it is no exaggeration to claim that “the emergence and recovery of all diseases depend on the microvasculature, including the lymphatics”. We hope that these words and this article are useful in the future development of basic and clinical medicine.

Mystery is everywhere. The topics presented here have been examined since the beginning of our studies of the lymphatic system. Many months and years have passed since then. There may be some who question why the issues presented here are even considered mysteries. However, it would be ideal if even a single person finds one small aspect of these issues interesting. We would also very much appreciate any objections and counter-arguments you may be inclined to give us.

Acknowledgements

The author (Taichi Ezaki) received cooperation and support from a large number of people over several years while compiling this study. In particular, I would like to express my sincere gratitude to the colleagues in this department; the late Dr. Shunichi Morikawa, Dr. Kazuhiko Shimizu, Dr. Shuji Kitahara, Dr. Sachiko Kikuta, Dr. Masae Morishima, the late Mrs. Yasuko

Yamazaki, Mrs. Hiromi Sagawa, Mrs. Kae Motomaru, Ms. Kazuko Nakada, and Ms. Iori Sato.

Conflicts of Interest: There are no conflicts of interest to declare.

References

1. Kotani M: Seven mysteries of the lymphatics. *Japanese Journal of Lymphology* 35: 66–80, 2012 (in Japanese)
2. Ezaki T: Some remaining mysteries in lymphology: Relationships between lymph and fat. *Japanese Journal of Lymphology* 37: 4–9, 2014 (in Japanese)
3. Baluk P, McDonald DM: Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1131: 1–12, 2008
4. Jha SK, Rauniyar K, Jeltsch M: Key molecules in lymphatic development, function, and identification. *Ann Anat* 219: 25–34, 2018
5. Kotani M, Rai M, Nakao S: Observations with the electron microscope on the absorption of India ink from the peritoneal cavity of the rabbit. *Okajimas Folia Anat Jpn* 38: 149–173, 1962
6. Leak LV: Electron microscopic observations on lymphatic capillaries and the structural components of the connective tissue-lymph interface. *Microvasc Res* 2: 361–391, 1970
7. Baluk P, Fuxe J, Hashizume H et al: Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med* 204: 2349–2362, 2007
8. Bernier-Latmani J, Cisarovsky C, Demir CS et al: DLL4 promotes continuous adult intestinal lacteal regeneration and dietary fat transport. *J Clin Invest* 125: 4572–4586, 2015
9. Tsuchiya M, Asakura H, Miura S et al: Pathological and pathophysiological study on intestinal lymphatic system in fat absorption. *Gastroenterol Jpn* 15: 247–256, 1980
10. Ichikawa S, Kyoda K, Iwanaga T et al: Nerve terminals associated with the central lacteal lymphatics in the duodenal and ileal villi of the monkey. *Acta Anat (Basel)* 146: 14–21, 1993
11. Mislin H: Active contractility of the lymphangion and coordination of lymphangion chains. *Experientia* 32: 820–822, 1976
12. Ruzsnyák IF, Földi M, Szabó G: Active motion of the Lymphatics. *In Lymphatics and Lymph Circulation*. pp542–554, Pergamon Press, Oxford (1967)
13. Yoffey JM, Courtice FC: *Lymphatics, Lymph and the Lymphomyeloid Complex*. Academic Press, London (1970)
14. Ohhashi T, Azuma T, Sakaguchi M: Active and passive mechanical characteristics of bovine mesenteric lymphatics. *Am J Physiol* 239: H88–H95, 1980
15. Ohtani O: Structure of lymphatics in rat cecum with special reference to submucosal collecting lymphatics endowed with smooth muscle cells and valves. I. A scanning electron microscopic study. *Arch Histol Cytol* 55: 429–436, 1992
16. Kotani M: The lymphatics and lymphoreticular tissues in relation to the action of sex hormones. *Arch Histol Cytol* 53 (Suppl 1): 1–76, 1990
17. Kotani M: *Lymphgefäße, lymphatische Apparate und extravasculäre Saftbahnen der Schlange (Elaphe quadrivirgata Boie)*. *Acta Schol Med Univ Kyoto* 34: 121–171, 1959
18. Tyler MJ: *Frogs*. The Australian Naturalist Library 1976
19. Kutsuna M: *Anatomie des Lymphsystems der Japaner*. Kanehara Shuppan Co., Tokyo (1968)
20. Kihara T: Das extravasculäre Saftbahn system. *Okajimas Folia Anat Jpn* 28: 601–621, 1956
21. Seiki K, Kotani M, Yamashita A et al: Androgens in blood and lymph plasma from normal and castrated rabbits. *J Endocrinol* 42: 157–158, 1968
22. Kotani M, Seiki K, Hattori M: Retardation of spermatogenesis and testosterone secretion after ligation of lymphatics draining the testes of rabbits. *Endocrinol Jpn* 21: 1–8, 1974
23. Kotani M, Seiki K, Higashida M et al: Demonstration of thyroglobulin in dog lymph. *Endocrinology* 82: 1047–1049, 1968
24. Okada E, Shozawa T: Three dimensional structures of the human epicardial lymphatic vessels. *In Progress in Lymphology XI (Partsch H ed)*. pp141–145, Excerpta Medica, Amsterdam-New York-Oxford (1988)
25. Ichikawa S, Uchino S, Hirata Y: Lymphatics of the cardiac chordae tendineae with particular consideration of their origin. *Lymphology* 22: 123–131, 1989
26. Shimada T, Morita T, Oya M et al: Morphological studies of the cardiac lymphatic system. *Arch Histol Cytol* 53 (Suppl): 115–126, 1990
27. Kotani M: Absorption of India ink from the pericardial cavity of the rabbit. *Okajimas Folia Anat Jpn* 33: 373–383, 1959
28. Kotani M: Absorption of India ink from the pericardial cavity of the toad. *Okajimas Folia Anat Jpn* 34: 509–515, 1960
29. Ohtani Y, Ohtani O, Nakatani T: Microanatomy of the rat diaphragm with special reference to the lymphatics and mesothelial stomata. *Ital J Anat Embryol* 100 (Suppl 1): 143–153, 1995
30. Shimada T, Zhang L, Oya M: Architecture and function of the extravascular fluid pathway: special reference to the macula cribiformis in the diaphragm. *Kaibogaku Zasshi* 70: 140–155, 1995
31. Kida S, Pantazis A, Weller RO: CSF drains directly from the subarachnoid space into nasal lymphatics in the rat. *Anatomy, histology and immunological significance*. *Neuropathol Appl Neurobiol* 19: 480–488, 1993
32. Shimotsuna M, Shields JW, Simpson-Morgan MW et al: Morpho-physiological function and role of omental milky spots as omentum-associated lymphoid tissue (OALT) in the peritoneal cavity. *Lymphology* 26: 90–101, 1993

33. Kampmeier OF: Evolution and Comparative Morphology of the Lymphatic System (Charles C Thomas ed). Springfield, Illinois (1969)
34. Kihara T: Das Lymphgefäßsystem der Japaner von Buntaro Adachi. Kenkyusha, Kyoto (1953)
35. Yaniv K, Isogai S, Castranova D et al: Live imaging of lymphatic development in the zebrafish. *Nat Med* 12: 711–716, 2006
36. Isogai S, Hitomi J, Yaniv K et al: Zebrafish as a new animal model to study lymphangiogenesis. *Anat Sci Int* 84: 102–111, 2009
37. Kutsuna M: Beiträge zur Kenntnis der Entwicklung des Lymphgefäßsystems der Vögel. *Acta School Med Univ Kyoto* 16: 6–12, 1933
38. Sabin FR: On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pigs. *Am J Anat* 1: 367–391, 1902
39. Huntington GC, McClure CFW: The anatomy and development of the jugular lymph sacs in the domestic cat (*Felis domestica*). *Am J Anat* 10: 177–311, 1910
40. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T et al: Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3566–3570, 1995
41. Oliver G: Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol* 4: 35–45, 2004
42. Martinez-Corral I, Ulvmar MH, Stanczuk L et al: Nonvenous origin of dermal lymphatic vasculature. *Circ Res* 116: 1649–1654, 2015
43. Semo J, Nicenboim J, Yaniv K: Development of the lymphatic system: new questions and paradigms. *Development* 143: 924–935, 2016
44. Buttler K, Ezaki T, Wilting J: Proliferating mesodermal cells in murine embryos exhibiting macrophage and lymphendothelial characteristics. *BMC Dev Biol* 8: 43, 2008
45. Kato S, Miura M, Miyauchi R: Structural organization of the initial lymphatics in the monkey mesentery and intestinal wall as revealed by an enzyme-histochemical method. *Arch Histol Cytol* 56: 149–160, 1993
46. Miura M, Yonemura Y: Morphological characteristics of the lymphangiogenesis and postnatal growth. *Japanese Journal of Lymphology* 37: 10–15, 2014 (in Japanese)
47. Ando S: Systemic study on the development of lymph nodes in human and mammalian. I. Rabbit's embryos, II. Cat's embryos, III. Human embryos. *Acta Anatomica Nipponica* 3: 761–998, 1930 (in Japanese)
48. Kotani M: Inhibition of mitosis in the guinea pig thymus after ligation of draining efferent lymphatics. *Lymphology* 31: 21–26, 1998
49. Kotani M: Anatomy of the lymphatic system. *Surgical Therapy* 26: 285–290, 1972 (in Japanese)
50. Gandhi GM: Role of lymphography in management of filarial chyluria. *Lymphology* 9: 11–18, 1976
51. Esmarch F, Kulenkampff D: Die Elephantiasischen Formen. J.F. Richter, Hamburg (1885)
52. Mackay IR, Burnet FM: *In* Autoimmune Diseases (Charles C Thomas ed). pp47–69, 70–104, 212–231, Springfield, Illinois (1964)
53. Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC et al: Missense mutations interfere with VEGFR-3 signaling in primary lymphoedema. *Nat Genet* 25: 153–159, 2000
54. Petrova TV, Karpanen T, Norrmen C et al: Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med* 10: 974–981, 2004
55. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E et al: Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 296: 1883–1886, 2002
56. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG et al: Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 7: 192–198, 2001
57. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME et al: VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 7: 186–191, 2001
58. Stacker SA, Achen MG, Jussila L et al: Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2: 573–583, 2002
59. Kougas P, Chai H, Lin PH et al: Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: implication of vascular disease. *J Surg Res* 126: 121–129, 2005
60. Harvey NL, Srinivasan RS, Dillard ME et al: Lymphatic vascular defects promoted by *Prox1* haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat Genet* 37: 1072–1081, 2005
61. Nurmi H, Saharinen P, Zarkada G et al: VEGF-C is required for intestinal lymphatic vessel maintenance and lipid absorption. *EMBO Mol Med* 7: 1418–1425, 2015
62. Kira Y, Yuge M: Lymphedema: its causes and treatment of common symptoms. The 36th annual meeting of the Japanese Society of Lymphology 35: 77, 2012
63. Dameshek W: Chronic lymphocytic leukemia—an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* 29 (Suppl): 566–584, 1967
64. Miller JF: Immunological function of the thymus. *Lancet* 2: 748–749, 1961
65. Cooper MD, Peterson RD, Good RA: Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken. *Nature* 205: 143–146, 1965
66. Cooper MD, Raymond DA, Peterson RD et al: The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J Exp Med* 123: 75–102, 1966
67. Reinhardt WO: Some factors influencing the thoracic-duct output of lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 113: 844–866, 1964
68. Yoffey JM: Thoracic duct lymphocytes. *In* Quantitative Cellular Haematology (Charles C Thomas ed). pp14–17, Springfield, Illinois (1960)
69. Hungerford GF, Reinhardt WO, Li CH: Effects of pi-

- tuitary and adrenal hormones on the numbers of thoracic duct lymphocytes. *Blood* 7: 193–206, 1952
70. Hungerford GF, Reinhardt WO, Li CH: Effects of cortisone and hydrocortisone on the numbers of thoracic duct lymphocytes. *Blood* 7: 1125–1127, 1952
 71. Kotani M, Horii I: Effects of administration of physiological saline and potassium chloride solution on the number of thoracic duct lymphocytes in normal and adrenalectomized rats. *Asian Pacif Soc Hematol Annu Rep* 6: 59–60, 1963
 72. Iwamoto T: Effects of administration of KCl solution into the carotid artery and the jugular vein on thoracic duct lymph in normal and hypophysectomized rats. A thesis of the 2nd Department of Anatomy, Kyoto Univ M.D., Ph.D. 81: 1–16, 1965 (in Japanese)
 73. Nagasawa T, Hinako K: Effect of adrenalectomy on the thoracic duct lymph flow and lymphocyte output. A thesis of the 2nd Department of Anatomy, Kyoto Univ M.D. Ph.D. 86: 1–12, 1966 (in Japanese)
 74. Gowans JL, Knight EJ: The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159: 257–282, 1964
 75. Kotani M, Nawa Y, Fujii H et al: Post-capillary venules as the pathway for migrating B lymphocytes. *Cell Tissue Res* 152: 299–303, 1974
 76. Miyasaka M, Tanaka T: Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol* 4: 360–370, 2004
 77. Matsuno K, Ueta H, Shu Z et al: The microstructure of secondary lymphoid organs that support immune cell trafficking. *Arch Histol Cytol* 73: 1–21, 2010
 78. Kotani M, Matsuno K, Ezaki T et al: The increase in permeability of postcapillary venules in lymph nodes subjected to the regional graft-versus-host reaction. *Lab Invest* 42: 589–595, 1980
 79. Yamashita A, Fukumoto T, Nawa Y et al: The generation of large pyroninophilic cells in the lymphoid tissues of rats infused with cell-free lymph. *Aust J Exp Biol Med Sci* 53: 11–26, 1975
 80. Kotani M, Kawakita M, Fukanogi M et al: The passage of thymic lymphocytes to the circulation in the rat. *Okajimas Folia Anat Jpn* 43: 61–71, 1967
 81. Kotani M, Seiki K, Yamashita A et al: Lymphatic drainage of thymocytes to the circulation in the guinea pig. *Blood* 27: 511–520, 1966
 82. Ekino S, Matsuno K, Kotani M: Distribution and role of lymph vessels of the bursa Fabricii. *Lymphology* 12: 247–252, 1979
 83. Shimizu K, Morikawa S, Kitahara S et al: Local lymphogenic migration pathway in normal mouse spleen. *Cell Tissue Res* 338: 423–432, 2009
 84. Smith JB, McIntosh GH, Morris B: The traffic of cells through tissues: a study of peripheral lymph in sheep. *J Anat* 107: 87–100, 1970
 85. Kotani M, Yamashita A, Rai F et al: Reutilization of DNA breakdown products from lymphocytes in lumen of intestine. *Blood* 29 (Suppl): 616–627, 1967
 86. Kotani M, Yamashita A, Seiki K et al: Reutilization by maternal and embryonal cells of nuclear materials from H3-thymidine labeled lymphocytes introduced into the lumen of intestine of rats. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 83: 359–363, 1967
 87. Kotani M, Yamashita A, Rai F et al: Absorption from intestinal lumen into blood and lymph of DNA and DNA degradation products from H3-thymidine labeled lymphocytes. *Jpn Circ J* 31: 1745–1750, 1967
 88. Herberman RB, Djeu J, Kay HD et al: Natural killer cells: characteristics and regulation of activity. *Immunol Rev* 44: 43–70, 1979
 89. Abo T, Watanabe H, Sato K et al: Extrathymic T cells stand at an intermediate phylogenetic position between natural killer cells and thymus-derived T cells. *Nat Immun* 14: 173–187, 1995
 90. Kotani M, Fukumoto T, Brandon MR: Destruction of Hassall's corpuscles by macrophages in the sheep thymus. *Cell Tissue Res* 217: 49–54, 1981
 91. Kotani M, Nawa Y: Demonstration of hydrolytic enzymes in the clastic cells of Hassall's corpuscles in the guinea-pig thymus. *Acta Histochem Cytochem* 15: 223–227, 1982
 92. Kotani M, Ezaki T, Ekino S et al: Lymph macrophages enter the germinal center of regional lymph nodes. *Adv Exp Med Biol* 149: 837–841, 1982
 93. Kotani M, Ezaki T, Fujii H et al: Peritoneal macrophages introduced into mouse foot pads enter the germinal center of regional lymph nodes nonspecifically. *Acta Anat (Basel)* 104: 406–413, 1979
 94. Kotani M, Okada K, Fujii H et al: Lymph macrophages enter the germinal center of lymph nodes of guinea pigs. *Acta Anat (Basel)* 99: 391–402, 1977
 95. Ohmori J, Miyakawa K, Matsuno K et al: Increased vascular permeability of *Brucella abortus* bacilli in the thymus of NZB/W F1 mice. *Autoimmunity* 10: 99–105, 1991
 96. Matsuno K, Ezaki T: Dendritic cell dynamics in the liver and hepatic lymph. *Int Rev Cytol* 197: 83–136, 2000
 97. Mori K: Vergleichende Untersuchung des Zellbildes der Lymphe und des Blutes bei verschiedenen Wirbeltieren. *Acta School Med Univ Kyoto* 23: 286–322, 1940
 98. Kotani M: Lymphoid tissue in the lizard. *Okajimas Folia Anat Jpn* 36: 405–415, 1961
 99. Mizoguchi S, Takahashi K, Takeya M et al: Development, differentiation, and proliferation of epidermal Langerhans cells in rat ontogeny studied by a novel monoclonal antibody against epidermal Langerhans cells, RED-1. *J Leukoc Biol* 52: 52–61, 1992
 100. Schneider M, Conway EM, Carmeliet P: Lymph makes you fat. *Nat Genet* 37: 1023–1024, 2005
 101. Bloom B, Chaikoff IL, Reinhardt WO: Intestinal lymph as pathway for transport of absorbed fatty acids of different chain lengths. *Am J Physiol* 166: 451, 1951
 102. Miura S, Asakura H, Miyairi M et al: [Study on the fat absorption and transportation into intestinal lymph of rats--differences in the absorption of satu-

- rated and unsaturated long chain fatty acids and the role of intestinal alkaline phosphate (author's transl)]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 76: 871–880, 1979
103. Ezaki T: Circulatory System: Basic and Clinical Research (5) Development of Lymphatic Vessels. *J Tokyo Wom Med Univ* 87: 135–145, 2017 (in Japanese)
 104. Ezaki T: How can we detect lymphatic vessels? *Japanese Journal of Lymphology* 35: 105–107, 2012 (in Japanese)
 105. Bernier-Latmani J, Petrova TV: Intestinal lymphatic vasculature: structure, mechanisms and functions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14: 510–526, 2017
 106. Petrova TV, Koh GY: Organ-specific lymphatic vasculature: From development to pathophysiology. *J Exp Med* 215: 35–49, 2018
 107. Funaoka S: Kurze Mitteilung über die Röntgenographie des Lymphgefäßsystems sowie den Mechanismus der Lymphströmung. *In Arb aus d III Abt d Anat Inst d Kaiserl Univ Kyoto Serie D (H1)*: S11, 1930
 108. Cancro M, Potter M: The requirement of an adherent cell substratum for the growth of developing plasmacytoma cells in vivo. *J Exp Med* 144: 1554–1567, 1976
 109. Mancardi S, Stanta G, Duseti N et al: Lymphatic endothelial tumors induced by intraperitoneal injection of incomplete Freund's adjuvant. *Exp Cell Res* 246: 368–375, 1999
 110. Ezaki T, Kuwahara K, Morikawa S et al: Production of two novel monoclonal antibodies that distinguish mouse lymphatic and blood vascular endothelial cells. *Anat Embryol (Berl)* 211: 379–393, 2006
 111. Abu-Hijleh MF, Habbal OA, Moqattash ST: The role of the diaphragm in lymphatic absorption from the peritoneal cavity. *J Anat* 186 (Pt 3): 453–467, 1995
 112. Ezaki T: Lymphangiogenic responses in an adjuvant-induced lymphangioma model. *Japanese Journal of Lymphology* 35: 14–17, 2012 (in Japanese)
 113. Detry B, Bruyère F, Ericum C et al: Digging deeper into lymphatic vessel formation in vitro and in vivo. *BMC Cell Biol* 12: 29, 2011
 114. Rockson SG: Laboratory models for the investigation of lymphangiomatosis. *Microvasc Res* 96: 64–67, 2014
 115. Honda K, Oda H: Pathology of encapsulating peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int* 25(Suppl 4): S19–S29, 2005
 116. Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T: Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol* 32: 315–320, 2011
 117. Ovadia H, Sobcho A, Wholmann A et al: Cellular nuclear binding and retention of glucocorticoids in rat lymphoid cells: effect of long-term adrenalectomy. *Neuroimmunomodulation* 2: 339–346, 1995
 118. Tchernitchin AN, Castrillon MA, Rodriguez A: Cellular distribution of dexamethasone in rabbit spleen and lymph nodes. *Agents Actions* 15: 588–593, 1984
 119. Haruki Y, Seiki K, Enomoto T et al: Estrogen receptor in the “non-lymphocytes” in the thymus of the ovariectomized rat. *Tokai J Exp Clin Med* 8: 31–39, 1983
 120. Ansar Ahmed S, Penhale WJ, Talal N: Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol* 121: 531–551, 1985
 121. Fujii H, Hayama T, Kotani M: Stimulating effect of natural estrogens on proliferation of hepatocytes in adult mice. *Acta Anat (Basel)* 121: 174–178, 1985
 122. Ezaki T, Nawa Y, Hayama T et al: Modulation of the immune responses against SRBC after oestrial treatment in mice. *Clin Exp Immunol* 48: 239–243, 1982
 123. Hayama T, Nawa Y, Ezaki T et al: Effects of estrogen on hepatic hemopoiesis in the adult mouse. *Exp Hematol* 11: 611–617, 1983
 124. Fujii H, Nawa Y, Tsuchiya H et al: Effect of a single administration of testosterone on the immune response and lymphoid tissues in mice. *Cell Immunol* 20: 315–326, 1975
 125. Meyer RK, Rao MA, Aspinall RL: Inhibition of the development of the bursa of Fabricius in the embryos of the common fowl by 19-nortestosterone. *Endocrinology* 64: 890–897, 1959
 126. Tan JK, Watanabe T: Artificial engineering of secondary lymphoid organs. *Adv Immunol* 105: 131–157, 2010
 127. Munn LL, Padera TP: Imaging the lymphatic system. *Microvasc Res* 96: 55–63, 2014
 128. Ezaki T: Progress in imaging of lymphatic vessels and its prospects. *The Cell* 47: 2–4, 2015 (in Japanese)
 129. Ogo M: Valves of human lymphatic vessels. *Acta Anatomica Nipponica* 6: 807–828, 1933 (in Japanese)
 130. Kihara T, Nose Z: Muskulöse Trichterklappe an den Ostien der Froschlymphsacke. *Okajimas Folia Anat Jpn* 9: 143–147, 1931
 131. Mori K: Identification of lymphatic vessels after intra-arterial injection of dyes and other substances. *Microvasc Res* 1: 268–274, 1969
 132. Fraley EE, Weiss L: An electron microscopic study of the lymphatic vessels in the penile skin of the rat. *Am J Anat* 109: 85–101, 1961
 133. Leak LV, Burke JF: Ultrastructural studies on the lymphatic anchoring filaments. *J Cell Biol* 36: 129–149, 1968
 134. Ohtani O, Ohtsuka A: Three-dimensional organization of lymphatics and their relationship to blood vessels in rabbit small intestine. A scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Arch Histol Jpn* 48: 255–268, 1985
 135. Ushiki T: The three-dimensional organization and ultrastructure of lymphatics in the rat intestinal mucosa as revealed by scanning electron microscopy after KOH-collagenase treatment. *Arch Histol Cytol* 53 (Suppl): 127–136, 1990

136. Kato S, Miyauchi R: Enzyme-histochemical visualization of lymphatic capillaries in the mouse tongue: light and electron microscopic study. *Okajimas Folia Anat Jpn* 65: 391-403, 1989
137. Gnepp DR: Vascular endothelial markers of the human thoracic duct and lacteal. *Lymphology* 20: 36-43, 1987
138. Ezaki T, Matsuno K, Fujii H et al: A new approach for identification of rat lymphatic capillaries using a monoclonal antibody. *Arch Histol Cytol* 53 (Suppl): 77-86, 1990
139. Banerji S, Ni J, Wang SX et al: LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 144: 789-801, 1999
140. Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ et al: Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem* 276: 19420-19430, 2001
141. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H et al: Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 154: 385-394, 1999
142. Kahn HJ, Bailey D, Marks A: Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* 15: 434-440, 2002
143. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA et al: Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 166: 913-921, 2005
144. Wigle JT, Oliver G: Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98: 769-778, 1999
145. Nibbs RJ, Kriehuber E, Ponath PD et al: The beta-chemokine receptor D6 is expressed by lymphatic endothelium and a subset of vascular tumors. *Am J Pathol* 158: 867-877, 2001
146. Thompson LF, Ruedi JM, Glass A et al: Antibodies to 5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein, cause human peripheral blood T cells to proliferate. *J Immunol* 143: 1815-1821, 1989
147. Albelda SM, Muller WA, Buck CA et al: Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 114: 1059-1068, 1991
148. DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM: Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31). *Curr Top Microbiol Immunol* 184: 37-45, 1993
149. Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C et al: Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 84: 2554-2565, 1994
150. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT: Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 54: 385-395, 2006
151. Gougos A, Letarte M: Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265: 8361-8364, 1990
152. Duff SE, Li C, Garland JM et al: CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 17: 984-992, 2003
153. Hallmann R, Mayer DN, Berg EL et al: Novel mouse endothelial cell surface marker is suppressed during differentiation of the blood brain barrier. *Dev Dyn* 202: 325-332, 1995
154. Stan RV: Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta* 1746: 334-348, 2005
155. Schlingemann RO, Dingjan GM, Emeis JJ et al: Monoclonal antibody PAL-E specific for endothelium. *Lab Invest* 52: 71-76, 1985
156. Robinson AP, White TM, Mason DW: MRC OX-43: a monoclonal antibody which reacts with all vascular endothelium in the rat except that of brain capillaries. *Immunology* 57: 231-237, 1986

リンパ・リンパ管・リンパ組織の謎

¹東京女子医科大学医学部解剖学・発生生物学講座

²熊本大学名誉教授

エザキ タイチ コクニ マサヒコ
江崎 太一¹・小谷 正彦²

(受理 2019年3月8日)

最近の20年の間に、リンパ学は目覚ましい発展を遂げている。体内のリンパ管を同定する種々の技法が開発されたことから、基礎医学の分野でも臨床医学の分野においてもリンパ学に大きな変化をもたらした。しかし、先人達が永年掛かって沢山のことが成し遂げられたとは言え、リンパ学の領域には今もなお未解決の基本的な疑問がまだまだ多く残っている。我々は最近、“リンパ管の7不思議”と“リンパ学に残された謎をめぐって—リンパと脂肪の関わり—”の2つの総説にそれらについて記述した。本稿では、その未解決なリンパ学の謎について特に強調しながら、とりわけ重要なトピックスや興味深いポイントについていろいろな観点から考えてみた。

キーワード：リンパ，リンパ管，リンパ組織，リンパ系，脂肪

はじめに

近年、リンパ管内皮に対する特異的なマーカーやその増殖・再生に関与する諸因子、遺伝子の発見、さらには様々な診断・治療技術の進歩とともに、リンパ学研究が飛躍的な進歩を遂げつつある。しかし、我々とはかく新しい技術・機器を用いた発見の方に目を向け勝ちで、既存の古い基礎的なデータや生命現象を見落とししたり、ともすれば軽視したりしてはいないだろうか？ また、先人達がこれまで永年築き上げてきた研究の中でも、疑問に思うこと、未解決で心残りなことがまだまだ数多く残っていることに気付かされる。リンパ学研究についても例外ではない。

そこで最近、我々はそれらをまとめて、「リンパ管の7不思議」¹⁾、「リンパ学に残された謎をめぐって」²⁾と題した総説を発表した。そこには、個々の疑問に対する答えが既にある程度明らかになっているものもあるかも知れないが、日々の自分自身の研究の流れに立ち返ってみることで、意外なヒントや解決の糸口がみつかるかも知れない。

本稿では、それらの中から特に重要と思われるいくつかの話題や興味深い点をPart 1~4の章に分けて挙げ、いろいろな方面から考察してみたい。これらの話題については、最新の分子レベル・遺伝子レベルでの研究とはやや距離を置いて、敢えてより身近な現象論に近いレベルでの話題や今ではほとんど忘れられているような古いデータを提示し、若い研究者や臨床医の皆さんにも一緒に考えて頂きたい。

Part 1：リンパ系とは？

まずリンパ（管）系というと、

1) リンパの流れる流路として固有の壁を持つすべての管系統（リンパ本幹，集合リンパ管，毛細リンパ管，リンパ洞・リンパ嚢）をいい、かつ

2) その補助器官として：a) リンパ装置（リンパ節，リンパ小節，リンパ浸潤）ならびに b) 運動器（推進器：リンパ心臓），さらに

3) その内容物（リンパ，乳び chylus）で構成されている。これらのうち、動物種によって、あるいは系統発生的な分化段階によって存在しないものがある。

1. リンパ管の構造と機能

1) 毛細リンパ管

リンパ管の起始部としての毛細リンパ管は盲端で始まり、その周囲の組織液の吸収と排導にあたる最も重要な機能部位である。血管では回収できない巨大分子、脂肪（厳密には炭素数12以上の長鎖脂肪酸）、さらには細胞や異物にいたるまで、何でも吸収できる。“毛細”といっても管径とはほとんど関係なく、毛細リンパ管は通常の毛細血管（5~10 μm）の数倍からそれ以上の内径（15~75 μm）となることがある。しかし、厚さが薄くてリンパが透明なため、肉眼的にも顕微鏡的にも、通常の毛細血管や組織間隙と見分け難いことが、当初からリンパ管研究が血管研究に遅れをとった原因の1つであった。つまり、素人にはリンパ管を同定することが極めて至難の業であった（表1）。だが、近年になってようやく、リ

表1 伝統的な組織学的方法を用いたリンパ管観察のための主な手法.

手法	特異性	信頼度	特殊技術の必要性	文献*
色素注入法	- #	±	±	Kutsuna (1968) ¹⁹⁾
硝酸銀の動脈内注射	-	±	+	Mori (1969) ¹³¹⁾
透過型電子顕微鏡	-	++	++	Fraley & Weiss (1961) ¹³²⁾ Leak & Burke (1968) ¹³³⁾
走査型電子顕微鏡				
i) 樹脂鋳型法	-	±	++	Ohtani & Ohtsuka (1985) ¹³⁴⁾
ii) KOH- コラゲナーゼ処理	-	±	++	Ushiki (1990) ¹³⁵⁾
酵素組織化学				
5- スクレオチダーゼ	+	+	+	Kato & Miyauchi (1989) ¹³⁶⁾
レクチン染色	+	++	-	Gnepp (1987) ¹³⁷⁾
免疫組織化学	++	++	-	Ezaki et al. (1990) ¹³⁸⁾

* 代表的文献のみ掲載.

- : 陰性, ± : 弱陽性, + : 陽性, ++ : 強陽性.

リンパ管内皮に特異的に発現するマーカー³⁾や遺伝子、さらにはリンパ管に特異的な成長因子などが発見されることにより、血管研究に肩を並べるほどに急激にリンパ管の研究が進んできた⁴⁾。毛細リンパ管の内皮細胞は極めて扁平で、核の部分が管腔に突出し、そこにやや豊富な細胞質と細胞内器官が存在する。毛細血管と違って、毛細リンパ管は基底膜の発達に極めて悪く、連続した基底膜がない上に、外膜細胞も欠く。これは組織液の吸収、特に有形粒子の吸収に適している。非吸収時、隣接する内皮細胞は狭い間隙をはさんで、互いに重なり合っている。内皮細胞間にいわゆる tight junction はない。吸収が始まると、内皮細胞間隙はいろいろの広さに開く。墨粒子などの有形粒子は勿論、吸収の激しい時には赤血球などの細胞まで通すのに充分なだけ開く。吸収の激しい時⁵⁾は、リンパ管内皮細胞は伸びたり、縮んだり、薄くなったり、厚くなったり、時にはそり返ったりして形を変える。その激しさは内皮細胞の自発的あるいは能動的な変形というしかない。ここに不思議がある。非吸収時と吸収時との形態的・機能的変化は何がもたらしているのであろうか。内皮細胞には超微細なフィラメント cytoplasmic filaments があって、いろいろな太さの束をなし、多くは細胞の長軸方向に走っている⁶⁾。このフィラメントに収縮性を求めるのが1つの有力な説明になるかも知れない。また、Balukら⁷⁾は毛細リンパ管内皮同士の境界部に、起始部リンパ管のみに特有なボタン状の結合装置 button-like structures を発見した。彼らによれば、この構造に挟まれる隙間から組織液は自由に吸収されるといふ。また、リンパ管内皮細胞には多数の飲小胞 pinocytotic vesicle があり、飲小胞への取

り込みによっても組織液の吸収が行われる。腸絨毛の中心リンパ管からカイロマイクロン (0.1~0.3 μm) を含む脂肪滴が吸収される⁸⁾。この時にも内皮細胞の離開と飲小胞への取り込みによって行われる⁹⁾。飲小胞への取り込みは単細胞時代からの基本的な食形式として理解される。さらに毛細リンパ管の内皮細胞の外面には形質膜から起こり、周囲の結合組織につなぐ細線維の束があり、繫留フィラメント anchoring filaments として知られている。これは組織圧が高まった時にリンパ腔が圧平されないためのもと考えられている。絨毛の中心リンパ管の内皮細胞に接して神経終末が分布し、その神経ペプチドによって中心リンパ管の長軸方向に寄り添う平滑筋を収縮させることにより吸収と運搬を調節しているとの報告¹⁰⁾がある。

2) 集合リンパ管

集合リンパ管になると、血管と同様に内皮は完全な基底膜にしっかりと被われ、さらにその壁に平滑筋、その腔に弁が現れる。筋線維の特徴は、しばしば内皮細胞直下に達しているため、内膜と中膜(筋層)の境が明らかでないこと、筋線維間に豊富な結合組織が存在すること、斜走またはらせん状に走っていること、右廻りのものと、左廻りのものが入り混じっていることである。それでも下肢のリンパ管ではほぼ内縦走、中輪走、外縦走の3層に区別することができる。上肢のリンパ管は2層で、外縦走筋を欠く。頭頸部のリンパ管は筋線維の発育が悪く、弱い斜走性の縦走筋だけのもの、あるいは全く筋線維を欠くものも多い。内臓からのリンパ管は器官内を走る間は筋線維を欠くが、器官を離れると斜走に近い縦走筋が、時にその外に斜走に近い輪走筋が現

れる。多くのリンパ管は単なる円筒形でなく、弁と弁との中間部は筋線維がよく発達して壁が厚く、弁の存在部は壁が薄くて筋線維に乏しいか、筋線維を全く欠いているので、古くから弁と弁との間を1つの単位 (lymphangion, リンパ管分節)¹¹⁾とみなしてきた。リンパ管の自発性収縮^{12)~14)}はこれを単位として分節的に中枢に伝わる。リンパ流量の増加、リンパ管内圧の上昇が自発性収縮の起こる要因と考えられている。また、リンパ管分節を越えて走る平滑筋があるという¹⁵⁾。リンパ管の自発性収縮は腸間膜リンパ管が観察の対象とされることが多く、ウシ、ヒツジ、モルモット、ラット、マウスに高頻度で認められているが、ネコ、イヌ、家兎では低い。発生頻度の低い動物はいずれも管壁における筋線維の発育が悪い。リンパ管の自発性収縮はヒトでも観察されていて、毎分の収縮は下肢のリンパ管で4~5回、胸管で1~4回といわれる。カニューレーションで胸管からリンパを採集する際には、呼吸が止まると、あるいは腸の運動が止まると、直ちにリンパの流れが止まる。その時腹をポンポンと軽く叩くだけでリンパはザーと流れる。また、四肢のリンパ管にカニューレーションすると、麻酔下ではほとんどリンパを採集できないが、指、足を軽く揉むだけでリンパは流れてくる。実際にこのような現象をみていると、リンパの流れは受動的なものが主体であると感じる。つまり、リンパの流れには周囲からのマッサージや筋肉運動が大切である。

集合リンパ管になると、多数の弁が出現する。その頻度は静脈よりはるかに多い。四肢や躯幹の皮下リンパ管には特に多く、所によっては1~2 mm 毎に弁をみる。弁は通常2葉性半月弁である(図1A)。囊が浅くて三日月状のこともある。また1葉性、3葉性、4葉性のこともある。弁は内膜のひだで、薄い結合組織性の膜の表面をリンパ管内皮が両面から被っている。線維は弁膜付着部から放散し、弁膜の中心部で交織する。リンパ管は弁がよく発達しているので、リンパ流は一方向性に向かい逆流はまず起こらない。そのため、末端部からの色素や造影剤の注入によるリンパ管描出の適用範囲はおのずから限定されてくる。しかし、リンパ管またはリンパ節が何らかの原因で閉塞され、リンパの鬱滞が起こり、リンパ管が異常に拡張してくると、弁は閉鎖不全におちいる。このような変化が次々末梢部に波及して行くと、リンパの逆流も起こり得る。癌の逆行性転移は考え難いが、リンパ管またはリンパ節が癌でブ

ロックされると、リンパ管弁の閉鎖不全による逆行性転移も起こり得ないとはいえない。

リンパ管の筋層と弁について不思議がある。まず筋層についていえば、リンパ管壁に平滑筋が出現するのは鳥類と哺乳類だけで、爬虫類、両棲類、魚類にはみられない。ヘビやカメ、カエルやヒキガエルのリンパ管は非常によく発達して、大きなリンパ囊やリンパ洞を作るのに、その壁に平滑筋はない。次に弁をみると、鳥類や哺乳類の弁は半月状であるが、爬虫類や、無尾両棲類の大きなリンパ囊の隔壁や広いリンパ洞にある弁はロート状である。しかも鳥類や哺乳類の半月弁に筋はないが、ヘビやヒキガエルのロート状弁にはそこにだけ平滑筋が出現する(図1B & C)。この違いはどうして起こるのか。鳥類になって急にリンパ管が細くなるからだろうか。リンパの流れの激しさの違いだろうか。

ところで、カエルやヒキガエル(無尾両棲類)の皮膚は大きくつまみ上げることができる¹⁶⁾。皮膚の下が大きなリンパ囊になっているからである。哺乳動物の皮下組織にあたる所である。深部には諸器官の間に広いリンパ洞があって、動静脈がその中を走っている。ヘビやカメ(爬虫類)でも広いリンパ洞があって、その中を動静脈が走っている(図1B)。アオダイショウでは動静脈だけでなく、甲状腺や胸腺や肝臓などの臓器もリンパ腔の中に存在している¹⁷⁾。これらの動物では自分で熱を生産できない。冷血動物というのは血が冷たいという意味ではなく、熱を産出できないという意味である。それで、太陽から得た熱で体温を維持せねばならず、熱伝導の低いリンパ液を満たしたリンパ洞、リンパ囊が体温を保つために必要と思われる。また水分の貯留にも役立つと考えられる。オーストラリアの熱い地方には、皮下の大きなリンパ囊に水をいっぱい溜めて、地下深くで夏眠するカエルのことが知られており、“water-holding frog”とも“to avoid heat”ともいわれている¹⁸⁾。自分で熱を産出できる鳥類になると、リンパ管は急に細くなる。しかしまだ熱産出が十分でないので、体表を羽毛で被られるだけでなく、血管の1部あるいは全周をリンパ管で囲まれたものが多い。哺乳動物のリンパ管は細い。

他方、同じ両棲類でも、1日のほとんどを水中で暮らすイモリ、サンショウウオなどの有尾両棲類では、リンパ管は非常によく発達しているが細くて管状である。カエルでも、水中で暮らすオタマジャクシの間は細く管状である。陸上に上る頃になると、

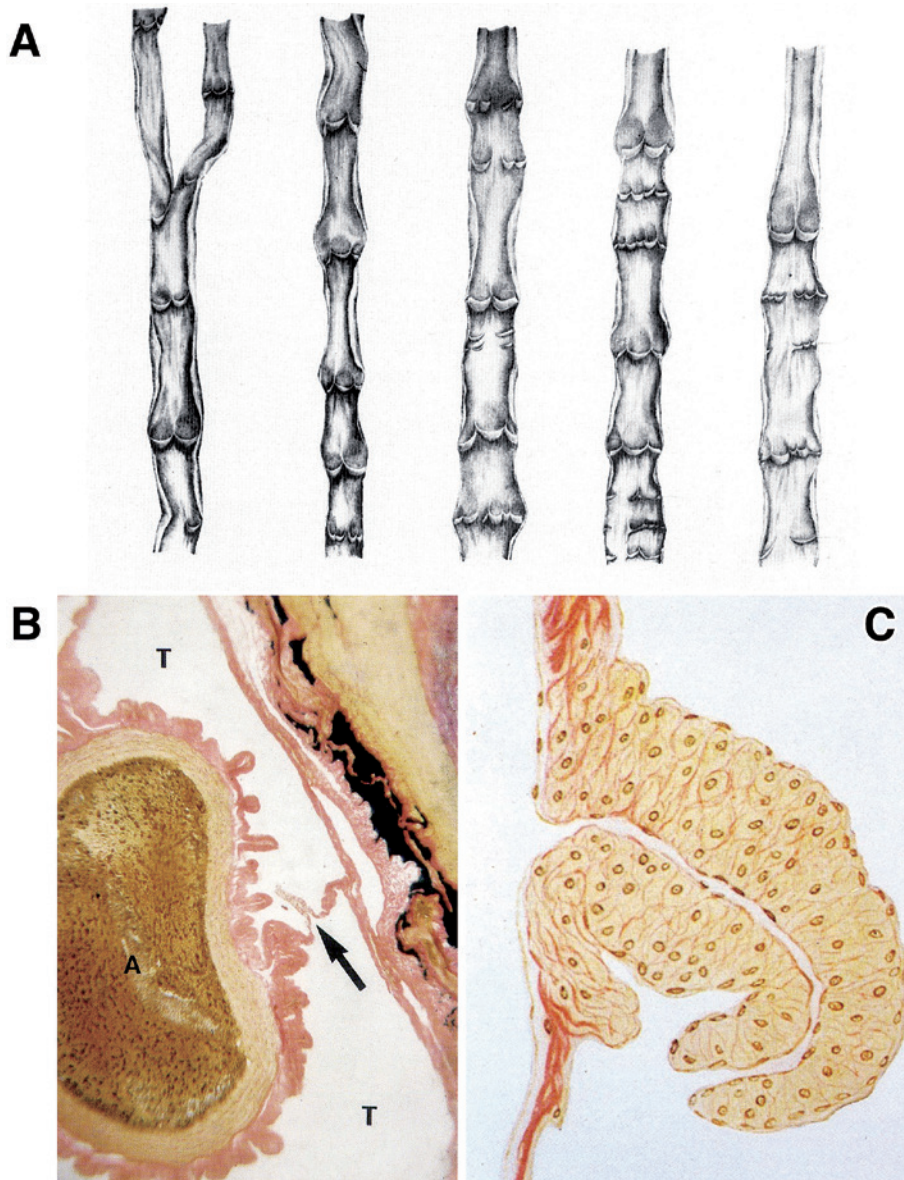


図1 各動物種におけるリンパ管弁.

A: ヒト下肢における浅リンパ管弁の諸型. ヒトのリンパ管のほとんどは2葉の半月弁である. (Ogo, 1933 より引用)¹²⁹⁾

B: シマヘビの大動脈 (A) を包む胸管 (T). 平滑筋を伴う有筋性弁が矢印で示されている. Van Gieson 染色. (Kotani, 1959 より引用)¹⁷⁾

C: ヒキガエルの皮下リンパ嚢間の中隔に存在する有筋性ルート状弁. Van Gieson 染色. (Kihara and Nose, 1931 より引用)¹³⁰⁾

リンパ管が互いに癒合して大きなリンパ嚢になる。コイ、フナなどの硬骨魚類のリンパ管はよく発達しているが管状である。これらを総括すると、リンパ管の形は恒温動物と変温動物で変わってくるし、水中で生活するか陸上で生活するかも変わってくる。ここに不思議がある。血管系にはリンパ管にみられるような大きな変化はみられない。

3) リンパ幹管：リンパ本幹 lymph trunk とリンパ主本幹 lymphatic duct

体内で最大のリンパ本幹である胸管（左のリンパ主本幹）の内膜には、しばしば縦走性平滑筋線維が現れる¹⁶⁾。胸管の下部ほどよく発達している。中膜は内縦、中輪、外縦の3筋層からなるが、いずれも斜走に近い。斜走に近い内縦筋の発達が最もよい。筋線維間に豊富な結合組織を含んでいるのが特徴である。弾性線維は内膜下および筋層の外側で縦来す

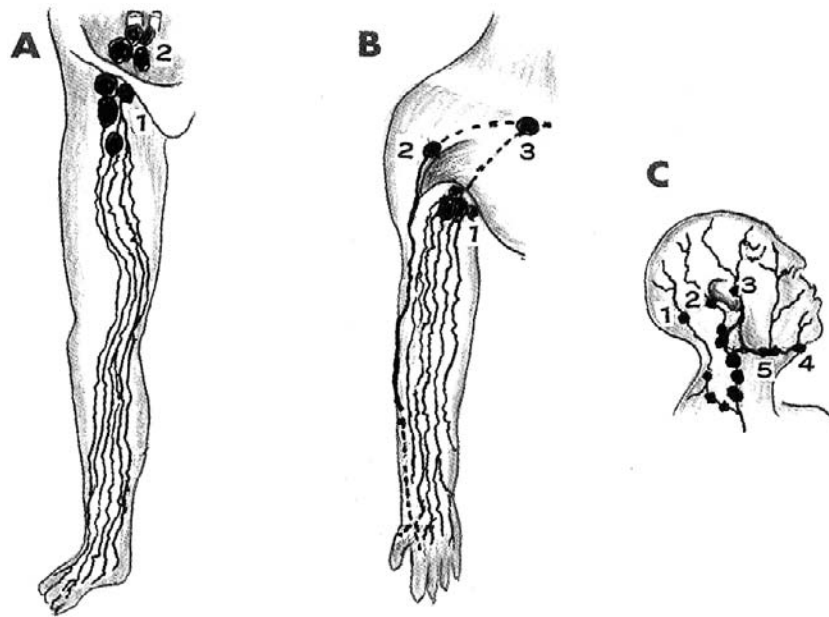


図2 四肢ならびに頭頸部における主な表在リンパ管流を示す図。

A：下肢；浅鼠径リンパ節（A1），下腸骨リンパ節（A2）。

B：上肢；中心腋窩リンパ節（B1），三角筋胸筋リンパ節（B2），鎖骨下リンパ節（B3）。

C：頭頸部；後頭リンパ節（C1），耳介後リンパ節（C2），浅耳介リンパ節（C3），オトガイ下リンパ節（C4），顎下リンパ節（C5）。

（Kotani, 2012 より引用）¹⁾

る線維からなる網をつくる。右リンパ本幹，腰リンパ本幹は胸管より壁は薄い，筋線維に富み，3筋層を区別することができる。気管支縦隔リンパ本幹，腸リンパ本幹は外縦走筋を欠く。頸リンパ本幹，鎖骨下リンパ本幹は更に壁が薄く，縦走性の斜走筋のみからなる。胸管にも多数の弁がみられる。

2. リンパ管の走行と太さ

古来から，リンパ管の分布は墨などの色素溶液を局所の結合組織内に注入すること^{*註}によって，その領域内に存在するリンパ管を描出することで可視化されてきた¹⁹⁾。趾間に墨を注入すると，数条から10数条の浅リンパ管が足背に現われ，下腿を上行する（図2A）。膝部を越え一目散に上腿を上行し，浅鼠径リンパ節に流入する¹⁹⁾。しかもこれらの浅リンパ管は血管に伴うことなく走行する。（踵部に起こる2～3条の浅リンパ管は浅膝窩リンパ節に入る）浅鼠径リンパ節を出たリンパ管は深リンパ管となり，外腸骨動脈に沿う下腸骨リンパ節，さらに総腸骨動脈

に沿う上腸骨リンパ節から腹大動脈に沿う旁大動脈リンパ節を経て，右と左の腰リンパ本幹を形成し，乳び槽に流入する。ここから胸管が始まる。乳び槽には腸管からの腸リンパ本幹が合流する。指間に墨を注入すると，数条から10数条の浅リンパ管が手背および手掌に現れ，前腕を上行する（図2B）。肘部を越え一目散に上腕を上行し，三角筋胸筋リンパ節あるいは中心腋窩リンパ節を経て鎖骨下リンパ節に流入する。やはり血管に伴うことなく（手掌尺側部に起こる2～3条の浅リンパ管は浅肘リンパ節に入る）鎖骨下リンパ節を出たリンパ管は鎖骨下リンパ本幹となり，右は頸リンパ本幹と合流し右静脈角へ，左は頸リンパ本幹とともに胸管に合流し左静脈角に注ぐ。頭頂部，顔面中央部に墨を注入して現れた10数条の浅リンパ管は，頭頂部からのものは後頭リンパ節，耳介後リンパ節，浅耳下腺リンパ節を経て，顔面中央部からのものは浅耳下腺リンパ節，オトガイ下リンパ節，顎下リンパ節を経て（図2C），総頸

*注：なお，墨などの色素注入によるリンパ管の描出は，ヒトでも動物でも，屍体でも可能である。死後ある程度時間が経つ方がうまく注入できる場合もある。これは血管は凝血しているため，血管に入ることなく，リンパ管に選択的に注入されるためである。リンパには赤血球も血小板もなく，ほとんど凝固しない。色素をリンパ節に直接注入する方法もあるが，その場合には注入リンパ節から中枢寄りのリンパ管とリンパ節がうまく描出される。この方法は，臨床診断技術としても，現在もリンパ管造影などに盛んに施行されている。

動脈および内頸静脈に沿って存在する上深頸リンパ節、下深頸リンパ節に流入する。下深頸リンパ節の輸出リンパ管は頸リンパ本幹を形成し、右は右鎖骨下リンパ本幹と合流し右静脈角に注ぎ、左は左鎖骨下リンパ本幹とともに胸管に合流して左静脈角に注ぐ。

ここに不思議がある。リンパ管の太さを起始部と中枢部と比較するとほとんど変わらないのだ²⁰⁾。浅リンパ管が深リンパ管になっても、それがさらにリンパ幹管になっても、リンパ管の太さにはほとんど変りがみられない。胸管の如き最大のリンパ幹管でも径数mmに過ぎない。このようなことは血管系ではみられない。一本の大きな樹のように、細い静脈枝は合して次第に太い静脈になる。動脈は反対に分岐するごとに細くなる。忽那¹⁹⁾によれば、リンパ管は本来のリンパを吸収したり排導する機能のみならず、一方ではリンパをその流路の途中で管外漏出する機能も有し、漏出したリンパは傍リンパ管通路²⁰⁾を介して周囲に広がるという。

リンパ節の輸出入リンパ管の間にも不思議がある(図3)。通常1個のリンパ節に数条の輸入リンパ管が流入するが、はじめ2~3条の輸出リンパ管があっても結局合して、輸出リンパ管は1条になる。数個のリンパ節が群をなす所でも、同様のことが起こる。つまり、輸入リンパ管は多数あるのに、輸出リンパ管は結局1本に過ぎないということ、更に輸入リンパ管と輸出リンパ管の太さにほとんど差がないことである。この不思議はある程度説明できるかも知れない。輸入リンパ管からリンパ節のリンパ洞に入ったリンパの流れをいったん緩和し、うっ滞させて、リンパによって運ばれて来た抗原や細胞のリンパ節実質内への浸潤を推進することにより、リンパ流の関所としてのリンパ節の生体防御機構に役立つと考えられる。

リンパ管、リンパ節と脂肪組織の間にも不思議が存在する(図3)。浅リンパ管は血管を伴わず単独で走るのが特徴である。足背や手背からの浅リンパ管も腹壁のリンパ管も必ず浅筋膜の上にある皮下脂肪組織の中を走って所属リンパ節に達する。そしてそのほとんどすべてのリンパ節が脂肪組織の中に埋没している。つまり、上述の如くリンパ管、リンパ節は脂肪組織とは密接な関係(Part 4で後述)にある。この不思議は脂肪組織の柔軟性と熱伝導性の低さによって、リンパ管、リンパ節を外圧から保護するだけでなく、恒温性を保つことによって、それぞれの

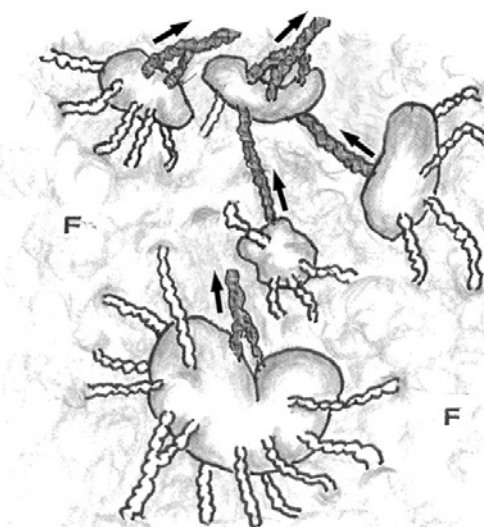


図3 ヒト浅鼠径リンパ節とその輸出入リンパ管。輸入リンパ管と輸出リンパ管の両者が認められる。一般的に1個のリンパ節当たりに輸入リンパ管は数本に対して、輸出リンパ管(灰色)は始めに2, 3本で出てもすぐに合流して1本となり一方向性(矢印)のリンパ流を形成する。したがって、輸入リンパ管が数本あったとしても輸出リンパ管としては結局1本以上になることはほとんどない。すべてのリンパ節が脂肪組織(F)の中に存在することに注意。(Kotani, 2012より引用・一部改変)¹⁾

機能の維持に役立っているといえるのかも知れない。

3. リンパ管の分布と体液の流れ

1) リンパ管分布の基本形式

リンパ管はどこにでも分布しているものではない。上皮組織には血管もリンパ管もない。しかし、激しい機能を営み、激しく分裂する上皮細胞に酸素と栄養は欠かせない。そのため上皮組織の基底膜直下に毛細血管が分布する。皮膚では真皮の表層の乳頭部に、粘膜では固有層の表層に毛細血管は密な網をつくる。毛細リンパ管網はそれよりやや離れた、もっと深層に分布する。これは血管を透過した液を回収するというリンパ管本来の機能にかなっていて、古来リンパ管が吸尿管と呼ばれるゆえんである。肝臓や脾臓あるいは唾液腺などの実質性臓器には小葉間結合組織や被膜にリンパ管は分布するが、小葉内には存在しない。肺の小葉内にも毛細リンパ管はない。ここに不思議がある。なぜこれら実質臓器ではリンパ管は小葉内に入り込まないのだろうか？血管は豊富に分布するのに、リンパ管は上皮および毛細血管から離れて分布するという原則に基づくものだろうか？限られた臓器スペース内に胆汁、膵液、唾液などの分泌管あるいはガス交換のための肺胞をできるだけ増やすためだろうか。

実質臓器としては例外的に生殖腺（卵巣，精巣）と甲状腺は実質内にはリンパ管が存在する。ただし，ここでも毛細血管は腺上皮近くに分布し，毛細リンパ管はそれより離れて分布するという原則は守られている。卵巣では毛細血管は卵胞をつつむ内卵胞膜に密に分布するが，毛細リンパ管はその外にある外卵胞膜に分布する。黄体ではかなり太いリンパ管が血管とともに黄体中心部に進入するが，毛細血管のように黄体細胞にまで細かく分布することはない。精巣では毛細血管は各精細管を取り囲むように分布するが，毛細リンパ管は精細管から離れて，精細管間の結合組織のやや豊富な所に分布する。甲状腺でも，毛細血管は各濾胞を囲んで密な網をつくるが，毛細リンパ管は濾胞から離れて濾胞間結合組織の豊富な所に分布する。その結果，精巣から分泌されるテストステロンや，甲状腺から分泌されるサイロキシン（T4），トリヨードサイロニン（T3）は血管のみならず，リンパ管にも分泌される²¹⁾²²⁾。しかし，血流量とリンパ流量を比較して考えると，これらのホルモンはやはり血行性に放出されるのが主流であると思われる。ところが，イヌの甲状腺からのリンパ採集という実験の中から思いもかけない不思議な結果が出て来た。甲状腺濾胞にはサイログロブリン（分子量65万）がコロイドとして含まれている。よほどのことがない限り，サイログロブリンは濾胞外に出ることはなく，もし出ると，自己蛋白でありながら，それを抗原とみなして自己免疫病（橋本病）を惹起するといわれている。ところが，イヌの甲状腺の排導リンパ管にカニューレーションすると，皮膚の上から甲状腺を軽くマッサージするだけで簡単にサイログロブリンがリンパに現れる²³⁾。甲状腺刺戟ホルモン（TSH）を投与するとさらに著明に増加する。サイログロブリンのように分子量の大きいものが濾胞外に出ると，それを吸収するのはリンパ管しかない。今までの概念と違って，サイログロブリンが容易にリンパ行性に一般循環に放出される可能性があることが分かり，橋本病の成因に新たな見解を与えるかも知れない。

では，上皮組織以外の組織ではどうだろうか。筋組織におけるリンパ管の分布をみると，毛細血管は個々の筋線維を取り巻いて密に分布するが，ここに毛細リンパ管はない。毛細リンパ管は多くの筋線維を大きく束ねる結合組織束（筋周膜）と，筋全体を囲む結合組織膜（筋上膜，いわゆる筋膜）に分布する。脂肪組織におけるリンパ管の分布をみると，毛

細血管は個々の脂肪細胞を取り巻いて密に分布するが，ここに毛細リンパ管はない。毛細リンパ管は多くの脂肪細胞を小葉状に大きく隔離する厚い結合組織束内にはじめて存在する。骨組織におけるリンパ管の分布をみると，ハヴァース管にかなり豊富な毛細血管が分布するが，ここにリンパ管はない。骨髄にも豊富な毛細血管は分布するがリンパ管はない。リンパ管は骨を被う結合組織の膜（骨膜）に分布する。その理由として，筋組織，脂肪組織，骨組織などのもともと代謝の盛んな組織には，豊富な毛細血管の分布に加えて，組織液の流通を容易にする細網線維網が極めて豊富に分布しており，リンパ管として分布しなくとも十分に栄養分や組織液が流通可能だからかも知れない。これらに対して，血管が進入しない軟骨組織内には毛細リンパ管も分布していない。つまり，軟骨組織では，リンパ管は血管同様に軟骨膜にのみ分布する。

2) 動脈と心臓

リンパ管の分布について，動脈と心臓の間に驚くべき差がある。大型の動脈は所々で自らを養う小動脈を出し，静脈は近くを走る動脈から栄養枝をもらう。このように血管を栄養する血管のことを“血管の血管 vasa vasorum”と呼ぶ。“血管の血管”は動脈の外膜で多数の枝に分かれ，その一部は中膜に入り平滑筋線維の間で毛細血管網をつくる。中膜の毛細血管網は内膜に近づくに従って疎になり，内膜に達しないまま終わってしまう。内膜に血管はない。したがって，内膜および中膜の内膜に近い部分は動脈の内皮を透過した液と，中膜の血管存在部からしみ込んできた液で養われることになる。内膜と中膜の境にある弾性板は有窓性で，組織液の通過を助ける。リンパ管は太い動脈の外膜の深層に分布するが，内膜と中膜には分布していない。したがって内膜と内膜に近い中膜に溜まった老廃物を除去する方法がない。特に高血圧によって内皮細胞が障害され，それに高脂血症が伴うと，脂質が内膜に侵淫し，コレステロールが沈着しても，リンパ管がないので，それを除去することができない。もしここに大きな分子量を持つ脂質の回収を得意とするリンパ管が分布していれば，動脈硬化症という疾患はなかったかも知れない。あったとしても重篤な疾患にはならなかったと思われる。

ところが，ここに不思議がある。動脈と違って，心臓にはリンパ管がよく発達している^{24)~26)}。毛細リンパ管は心内膜直下および心筋との境界部に分布す

る。心内膜のリンパ管網から出た排導リンパ管は心筋層を貫く厚い結合組織束を走り、心外膜のリンパ管網に連なる。心筋線維束内にはリンパ管はないが、心筋線維束間の結合組織の中に起こる毛細リンパ管があり、この排導リンパ管に連なるものがあるという。心外膜には深淺2層のリンパ管網が存在する。深層のリンパ管網は心筋層を貫いてきた排導リンパ管を受け、すべて冠状溝に向かって上行する¹⁹⁾。右冠状動脈に伴うものは上行大動脈前面あるいは肺動脈前面ないし両動脈間を上行し、ヒトでは大動脈弓前上壁にて大動脈弓リンパ節に、左冠状動脈に伴うものは肺動脈幹背面を長軸に沿って上行し、右上気管支リンパ節に注ぐ。心外膜浅層では毛細リンパ管が網を形成している。家兎などで実験的に心膜腔に墨汁を注入すると、これを吸収する²⁷⁾²⁸⁾。リンパ管は洞結節や房室結節などの刺激伝導系の特殊心筋線維の間にある結合組織内にも観察されている。動脈も心臓も、もともと一本の管でありながら、曲がりくねって収縮性をおび、漿膜腔に囲まれたというだけで、心臓になぜリンパ管がこうもよく発達したのだろうか。同じ心膜腔内にあっても、心臓を養う冠状動脈は一般の動脈と同じように、内膜には毛細血管も毛細リンパ管も存在しない。心臓にだけ、リンパ管がこうもよく発達しているのは不思議である。

3) 脈管外通液路

皮下組織や腹腔・胸腔などのいわゆる漿膜腔に色素などを注入すると、リンパ管腔に入る前に色素液が流れ易いところと流れ難い場所があることに気付く。木原²⁰⁾は、そのような場所には細網線維に富んだ特殊な結合組織間隙があり、そこを絶えず体液が流れるだけでなく細胞はじめ有形の粒子の通過を許す流路があり、それらを“脈管外通液路 extravascular fluid pathway (または extravascular fluid-path-system)”と定義した。

それには、①漿膜腔から毛細リンパ管までの流入路と考えられる前リンパ管通液路 prelymphovascular fluid pathway, ②リンパ管からのリンパの管外漏出のための排出路をなすと考えられる傍リンパ管通液路 paralympovascular fluid pathway, ③細静脈の周囲にある吸収路と考えられる傍細静脈通液路 paravenular fluid pathway の3つの通液路がある。一般的には、これらの通液路はほとんど認識されていないが、胸・腹水や局所の浮腫、炎症反応、さらには腫瘍転移などの脈管系と密接な関係のある様々な病態時には、決して見逃してはならない構造であ

る。

4) リンパ管と漿膜腔 (前リンパ管腔)

腹膜腔に注入した墨汁は横隔膜腱部の毛細リンパ管にすぐ吸収される⁵⁾¹⁶⁾²⁹⁾。腹膜中皮細胞の離開に伴って、リンパ管内皮は横隔膜の線維束に沿って大きく変形し、両者の間に運河状の交通路ができる。まさにこれが、前毛細リンパ管通液路の代表である。漿膜腔 (腹膜や胸膜) 側から毛細リンパ管までの結合組織性の吸収路で、篩状斑³⁰⁾と呼ばれる。吸収はリンパ管内皮の離開変形による交通路の形成だけでなく、リンパ管内皮細胞の飲小胞への取り込みによっても行われる。胸膜腔に注入した墨汁 (Pelican ink[®]: Günther Wagner, Hanover) は肋骨胸膜の毛細リンパ管にすぐ吸収される。ここにも胸膜中皮細胞とリンパ管内皮細胞との間に運河状の交通路ができる。心膜腔に注入した墨汁は臓側心膜の毛細リンパ管にすぐ吸収される。中枢神経系では¹⁶⁾³¹⁾、古くから脳脊髄腹膜を注入した色素が嗅神経に沿って頭蓋腔から鼻粘膜に出、そこに発達した毛細リンパ管に吸収されることが知られている。その後、木原門下¹⁶⁾により、すべての脳神経、すべての脊髄神経が頭蓋腔あるいは椎間孔を出た所で、そこに分布する毛細リンパ管に吸収されることが分かってきた。末梢神経では神経上膜 epineurium のリンパ管に現れる。この上膜下隙は硬膜下腔に続き、外膜内隙はクモ膜下腔の続きなので、墨汁は外膜内隙、上膜下隙を経て、神経上膜のリンパ管に現れる。ここに不思議がある。これら漿膜腔はそれ自身中皮で囲まれた閉鎖腔であり、リンパ管も内皮で囲まれた閉鎖腔である。それにも拘らず、漿膜腔に注入した墨汁は、漿膜の全面からではなく、特定の場所からではあるがすぐ毛細リンパ管に現れる。いいかえると、腹膜腔、胸膜腔、心膜腔、髄膜腔などすべての漿膜腔は前リンパ腔あるいはリンパ前腔だといえる。

カエルやヒキガエルの胸腹膜腔と哺乳動物の胸管にあたる椎骨下リンパ洞 Truncus or Sinus subvertebralis との隔壁には噴火口状の小孔が夜空の星をみる如く多数存在し、胸腹膜腔に注入した墨汁はここを通過してすぐリンパ洞に入る¹⁶⁾。魚類、有尾両棲類、爬虫類、鳥類などでの系統発生的な実験検証が望まれる。心膜腔や髄膜腔からのリンパ管への吸収についても系統発生的な研究が期待される。

家兎の腹腔に墨汁を注入すると、横隔膜のリンパ管が黒く描出されるが、大網にも黒い斑点が多数現れる。ここが大網乳斑 milky spot と呼ばれる所³²⁾で、

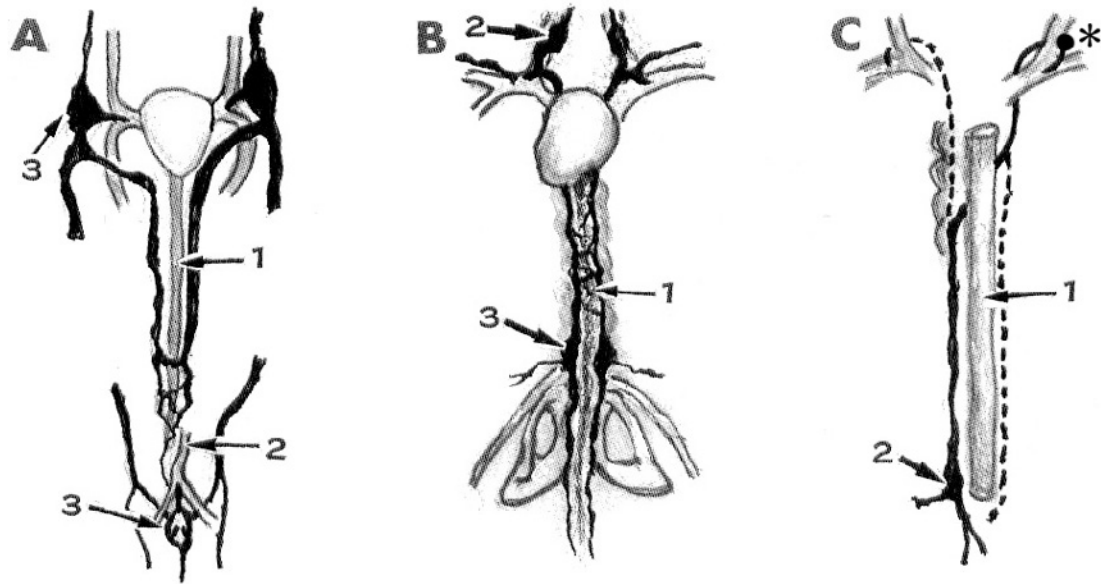


図4 各動物種における胸管.

A: コイ; 大動脈 (A1), 後主静脈 (A2), 推進器 (A3).

B: アヒル; 大動脈 (B1), 頸胸リンパ節 (B2), 腰リンパ節 (B3).

C: ヒト; 大動脈 (C1), 乳び槽 (C2). *: 静脈角と胸管所属のウィルヒョウリンパ節.

(Kotani, 2012 より引用・一部改変)¹⁾

墨を貪食した多数のマクロファージが集まっている。ここに始まる毛細リンパ管の内皮細胞はこれを被う腹膜中皮に接し、大網乳斑における墨の吸収を示唆している。さらにこのリンパ管は大網を走って胃大弯のリンパ節に注ぐ。大網乳斑は古くから腹腔マクロファージの産出母地として知られており、腹腔内に遊出したマクロファージが墨を取って横隔膜リンパ管に入るが、大網乳斑に帰るものもあるかも知れない。その他、漿膜腔とリンパ管の間にいろいろな問題が残っている。腹腔に限ってみても、腹膜炎や肝硬変での腹水貯留の問題、腹腔を介する腹膜透析の問題、放射線照射による腹腔からリンパ管への吸収の障害など多数の問題が残っている。

Part 2: リンパ管系の発生・分化・再生と病態

1. リンパ管系の発生

1) リンパ管の系統発生

系統発生的にリンパ管系の分化をみる¹⁶⁾³³⁾。まずヤツメウナギ (円口類) には大動脈や後主静脈の腹側に脊椎下洞と呼ばれる腔があり、ロート状の弁を持つ多数の小孔で後主静脈に開口している。その位置から哺乳動物の胸管にあたると思われるが、ヤツメウナギの腸には哺乳類にみるような中心乳糜管はなく、乳糜は腸粘膜の静脈に吸収され、その静脈がこの腔に注いでいるので、この腔は血リンパ管²⁰⁾

とも血リンパ洞とも呼ばれるべきものである。サメ (軟骨魚類) では、大動脈の全長にわたって、その両側に胸管に相当するリンパ幹管が1対走っており、頭側でそれぞれ頸リンパ本幹と合して左右の静脈角に、尾側では後主静脈に開口している。しかし、独立した乳糜管ではなく、まだ血リンパ管と呼ばれるべきものである。リンパ管系が血管系から完全に独立するのはコイやフナ (硬骨魚類) からである。これらの動物の胸管は1対あって (図4A)、大動脈の両側に沿って上行し、体壁の外側中央を上行してきた外側リンパ本幹 Truncus lymphaticus lateralis をそれぞれ合流して左右の静脈角に開口する³³⁾。また肛門より尾方では単管となり、背側大動脈に沿って尾鰭の付け根まで下行し、体壁を下行してきた外側リンパ本幹と合流して後主静脈に開口する。イモリ、サンショウウオ (有尾両棲類) の胸管もやはり1対あって、大動脈の両側を上行して左右の静脈角へ、肛門より尾方では1本になって後主静脈に開口する。カエルやヒキガエル (無尾両棲類) の胸管は椎骨下に広いリンパ洞 Sinus subvertebralis を形成するが、これはオタマジャクシの頃1対の胸管として大動脈の両側を走っていたものが融合したものである。アヒルやガチョウ、ニワトリ (鳥類) の胸管は腹腔動脈の基部で大動脈を囲むようにして始まり、大動脈の両側に沿って上行 (図4B)。第3~4胸椎の

高さで左右に分かれ、それぞれ左右の静脈角に開口する³³⁾。

ヒトでは腸リンパ本幹と左右の腰リンパ本幹が合して、通常第2腰椎の前で、腹大動脈の右背側に様々の広さの乳び槽をつくる。胸管は乳び槽に始まり、腹大動脈の右背側に沿って上行し、横隔膜の大動脈裂孔を通過して胸腔に入り、大動脈と奇静脈の間を上行するが、ほぼ第5胸椎の高さで次第に左方に曲がり、第3胸椎の高さで食道の後ろを通過してその左側に出、暫く上行した後第7頸椎の高さで弓状をなして前方に曲がり、左総頸動脈と左鎖骨下動脈との間で左頸リンパ本幹および左鎖骨下リンパ本幹を受けた後、左静脈角に開口する。

ここに不思議が存在する。系統発生学的にみて、リンパ管系が血管系からまだ独立しない軟骨魚類から、さらにリンパ管系が血管系から独立した硬骨魚類、両棲類、爬虫類、鳥類のすべてにおいて、胸管は大動脈の左右両側に1条ずつ計2条あって、頭側に伸びてそれぞれ右および左静脈角に開口する。この原則がヒトを含め多くの哺乳動物で崩れる。すなわち、右胸管の静脈開口部と左胸管の大部分が消失し(図4C)、右胸管の大部分と左胸管の静脈開口部が残り、その間をもともと左右胸管の間にあった吻合枝が1本残り、連結するという形になる。いいかえると、右胸管が残った左胸管の静脈開口部を使って左静脈角に開口するといえる。なぜ哺乳動物になって胸管がこのような走行をとるのか。このような走行をとれば何か都合のよいことがあるのだろうかとの疑問が湧く。右静脈角に開口する前の右胸管の退化ないし消失は既に1部の鳥類に起こっているという³³⁾。またヒトでも胎生期のごく初期には左右に胸管があってそれぞれ左右の静脈角に開口するという³³⁾³⁴⁾。一方、静脈系の発生においても、最初は左右対称性に対をなして発達していた静脈系が途中で非対称性に片方に退縮が起こることによって、最終的には左右非対称な走行(下大静脈とその枝、奇静脈、半奇静脈、副半奇静脈など)を取るようになる。リンパ管の場合にも、それと同様の、あるいはそれと関連した変化だろうか。

2) 静脈開口部とリンパ心臓

コイ、フナなどの硬骨魚類は胸管の静脈角開口部の左右に推進器 propulsor というものを備えている³³⁾。また、最終椎骨の腹側で尾鰭の付け根の所にも推進器があって、尾鰭の運動によってリンパを後主静脈に送っている。推進器には弁がある。ゼブラ

フィッシュでは各体節ごとに節間リンパ管と節間静脈が交通する³⁵⁾³⁶⁾。両棲類、爬虫類になると、リンパ管の静脈開口部にリンパ心臓が出現する¹⁶⁾³³⁾。イモリ、サンショウウオなどの有尾両棲類には各体節ごとに1対、全身で10数対のリンパ心臓が存在する。カエル、ヒキガエルなどの無尾両棲類になると、リンパ心臓は前・後の各1対に減少する。ヘビやトカゲなどの爬虫類になると、さらに減少して後リンパ心臓1対だけになる。ヘビでは前リンパ心臓は消失するが、その位置が1つの大きなリンパ腔になって心臓の上に載り、その拍動を利用してリンパを静脈に送っている¹⁶⁾¹⁷⁾。リンパ心臓の壁は横紋筋からなり、自律的収縮を営む。(補足図: 動画 https://doi.org/10.24488/jtwmu.89.Extra1_E4) トカゲの後肢の付け根にある米粒大のリンパ心臓は1分間に約40回収縮する。カエルの後リンパ心臓は夏は1分間に60~80回収縮するが、冬は20~30回に減少する³³⁾。両棲類、爬虫類のリンパ心臓の出入口には平滑筋線維を備えた弁がある。鳥類では1対の後リンパ心臓が一時的に出現するが、孵化後1か月以内に消滅する³⁷⁾。

ここに不思議がある。リンパ管の静脈開口部を総括すると、魚類から哺乳動物になるに従って、リンパ管の静脈開口部が減ってゆき、ヒトの胸管の静脈開口部は左静脈角だけになる。これは何を意味するのだろうか。リンパ管系が血管系から次第に違った方向に分化していることを示すものなのだろうか。

2. リンパ管の個体発生

ヒトのリンパ管が初めて認識できるのは胎生第2か月頃からである¹⁹⁾。リンパ管の個体発生については古来から論争が尽きない。リンパ管が静脈内皮の発芽によって末梢側に向かって伸張していくとする「遠心説 centrifugal theory」³⁸⁾、静脈周囲の間葉性組織間隙の細胞が扁平化して小腔を作り、形成された腔と腔が互いに連結して原始的なリンパ囊となりさらに繋がってリンパ管となり中枢側に向かうとする「求心説 centripetal theory」³⁹⁾である。その際のリンパ管と静脈との連結は二次的に生じるとされた。その他、両者の「折中説 compromise theory」として、胸管は胎生静脈から、他は組織間隙からとするもの、あるいは頸リンパ囊は静脈性で、他は組織間隙からとするものなどがある。

リンパ管発生機序について100年以上も論争が続いてきた最大の理由は、血管とリンパ管を厳密に同定する方法がなかったことである。血管内皮の特異

表2 リンパ管内皮細胞と血管内皮細胞の分子マーカー。

マーカー	動物種*	細胞内局在	分子サイズ (kDa)	機能	代表的文献 #
リンパ管					
LYVE-1	H, M, R	細胞表面	60	hyaluronan 受容体	Banerji et al. (1999) ¹³⁹⁾ Prevo et al. (2001) ¹⁴⁰⁾
Podoplanin	H, M, R	細胞表面	43	接着?	Breiteneder-Geleff et al. (1999) ¹⁴¹⁾
D2-40			40		Kahn et al. (2002) ¹⁴²⁾ Schacht et al. (2005) ¹⁴³⁾
VEGFR-3 (Flt4)	H, M, R	細胞表面	170	VEGF-C 受容体	Kaipainen et al. (1995) ⁴⁰⁾
Prox-1	H, M, R	核	85-95	転写因子	Wigle and Oliver (1999) ¹⁴⁴⁾
Foxc-2	H, M, R	核	54-63	転写因子	Petrova et al. (2004) ⁵⁴⁾
D6	H, M, R	細胞表面	43	chemokine 受容体	Nibbs et al. (2001) ¹⁴⁵⁾
CD73	H, M, R	細胞表面	69	接着, 5'-Nucleotidase	Thompson et al. (1989) ¹⁴⁶⁾
B27	R	細胞質	?	?	Ezaki et al. (1990) ¹³⁸⁾
LA102	M	細胞表面	25-27	マウス-Thy1?	Ezaki et al. (2006) ¹¹⁰⁾
血管					
CD31	H, M, R	細胞表面	110-120, 130-140	PECAM-1	Albelda et al. (1991) ¹⁴⁷⁾ DeLisser et al. (1993) ¹⁴⁸⁾
CD34	H, M, R	細胞表面	90, 105-120	GlyCAM-2, mucosialin	Baumhueter et al. (1994) ¹⁴⁹⁾ Pusztaszeri et al. (2006) ¹⁵⁰⁾
CD105	H, M, R	細胞表面	90, 180	TGF-β 受容体, endoglin	Gougos and Letarte (1990) ¹⁵¹⁾ Duff et al. (2003) ¹⁵²⁾
MECA-32	M	細胞表面	50-55, 100-120	diaphragm protein (マウス PV-1)	Hallmann et al. (1995) ¹⁵³⁾ Stan (2005) ¹⁵⁴⁾
PAL-E	H	細胞表面	60-120	diaphragm protein (ヒト PV-1)	Schlingemann et al. (1985) ¹⁵⁵⁾
OX-43	R	細胞表面	90	?	Robinson et al. (1986) ¹⁵⁶⁾
LA5	M	細胞表面	12-13	?	Ezaki et al. (2006) ¹¹⁰⁾

* H:ヒト, M:マウス, R:ラット.

最初の論文または代表的論文のみを掲載.

的マーカーがいち早く発見されて以来、血管生物学は飛躍的に進歩したのに比べ、リンパ管内皮の特異的マーカーの発見は20年近くも後になったことから、リンパ管研究は大きく遅れてしまった。つまり、1995年にVEGFR3がリンパ管内皮に特異的に発現することが発表⁴⁰⁾されて以来、ようやく本格的に種々の分子マーカーが報告されてきた(表2)。このようなリンパ管特異的なマーカーによってリンパ管を厳格に同定することによって初めて、リンパ管と血管との相関性が証明できるようになった。また、近年では分子生物学的手法を用いて遠心説を支持する報告⁴¹⁾が多くなっている。しかしその一方、最近ではゼブラフィッシュを用いたライブイメージングによる解析から、求心説を支持する所見や、リンパ管内皮の由来とその分化を制御するメカニズムが頭頸部と体幹部では異なるとする説も報告^{42/43)}され、新たな波紋を呼んでいる。

リンパ管の個体発生を考える上で、胎生期のリンパ管形成について遠心説の立場から考えると、静脈から発芽する「リンパ管発生 lymphovasculogenesis」と、既存のリンパ管から新たにリンパ管が伸張する

「リンパ管新生 lymphangiogenesis」を区別して考えることができる。Buttlerら⁴⁴⁾は胎生期は静脈から発芽するリンパ管発生と同時に末梢の間葉由来のマクロファージ様細胞が取り込まれながらリンパ管を形成することを報告している。また、加藤とその共同研究者ら⁴⁵⁾は酵素組織化学的手法によって、種々の臓器の間質組織に、しばしば原始的なリンパ嚢様の構造(リンパ島 lymphatic island)が出現し、さらにそこから小突起が伸びて互いに融合・連結して次第に有弁性のリンパ管網が形成される一連の過程を報告⁴⁶⁾している。いずれにしても、成体におけるリンパ管形成は、既存のリンパ管から新たにリンパ管が伸張するリンパ管新生が主体となると考えられ、例えば血管に認められる脈管形成 vasculogenesisに相当するような、末梢血中でのリンパ管内皮前駆細胞の存在などについては今のところよく分っていない。

3. リンパ管の再生

リンパ管は再生するが、リンパ節は再生しない。なぜリンパ節が再生しないかという不思議がある。リンパ管は高分子の物質や細胞の吸収に適した構造

になっている。したがって、外界から侵入した細菌を含め異物、抗原が組織に侵入するとリンパ管に入る。これに対する生体防御機構としてリンパ節が備わってくる。したがって、リンパ節の原基の発生はリンパ管よりも遅く、リンパ管が一定の発達を遂げた後に、一定の決まった場所に出現する。このリンパ節原基には、リンパ管壁の間葉組織から発生する管性リンパ節原基と発生初期のリンパ管叢がリンパ囊と変化し、その囊壁の間葉組織から発生する囊性リンパ節原基の2通りのパターンがある。深頸リンパ節、大動脈リンパ節、腸骨リンパ節などは後者の囊性原基から、その他浅頸リンパ節、顎下リンパ節、腋窩リンパ節、膝窩リンパ節、鼠径リンパ節などは前者の管性原基から起こるとい¹⁹⁾。ヒトのリンパ節原基は胎生2か月の末(腋窩、鼠径リンパ節など)から3か月(腸間膜根リンパ節など)にかけて出現し始め、遅くとも3か月末(膝窩リンパ節など)から4か月にかけて出揃う⁴⁷⁾。どの動物でも、リンパ節の出現する場所およびそこに出現するリンパ節の数はほぼ決まっている。1つ1つのリンパ節が、あるいは1つのリンパ節群が脾臓と同じように、哺乳動物の長い進化の過程で、生体防御のために決まった場所に決まった数だけ準備されてきた器官 organ なのである。それで、リンパ節を摘出すると再生しないのは、脾臓を摘出すると再生しないのと同じ機序によるものである。

これに対して、リンパ管は再生可能である。リンパ節あるいはリンパ節群を完全に摘出すると、やがて輸出入リンパ管の断端の間にリンパ管が新生して連結する。結紮によって生じるリンパの鬱滞によるリンパ管内圧の上昇がリンパ管新生の引き金になると思われる。また、摘出部の組織間隙が連なって管性の連結路ができる可能性もある。この考え方はリンパ管系の個体発生における求心説¹⁶⁾³³⁾の基本的な考え方に似ている。実験的にリンパ管を結紮すると、その支配域に急性浮腫が生じ、組織や臓器の機能が障害される。モルモットの胸腺リンパ管が流入する頸リンパ本幹を結紮すると、胸腺細胞の分裂は皮質で1日以内、髄質で5日以内に約50%減少する⁴⁸⁾。リンパ管再生に伴って10日ほどで回復する。家兎精巣の排導リンパ管を結紮すると、精巣の間質に浮腫が生じ、曲精細管における精子形成が強く障害される²²⁾。男性ホルモンの分泌も完全に停止する。結紮12~15日目頃からリンパ管が再生し、30~60日目には機能も正常にもどる。ここで注目したいのは10例

中2~3例、リンパ管の再生に失敗するもののあることである。再生に失敗すると、90日過ぎても精子形成は回復せず、曲精細管の基底膜は肥厚し、間質に浮腫と線維の増殖が残る。次に家兎胸管を結紮すると、末梢部は大きく膨らみ、リンパが鬱滞する。10~14日目頃結紮糸を乗り越えて、末梢部から中枢部に向かって極く細いリンパ管が形成される。この細い1本のリンパ管が新生するだけで、動物は生き長らえることができる。臨床的には食道癌の手術時などに、誤って胸管を傷つけ、乳び胸 chylothorax などを起こす恐れのある場合には直ちに胸管を結紮すべきである。ここでもまた注目したいのは、家兎胸管結紮実験の際にも10例中1~2例リンパ管の再生に失敗するものがあったことである。ここに不思議がある。家兎精巣の排導リンパ管結紮の場合にも、家兎胸管結紮の場合にも、数は少ないが、なぜリンパ管再生に失敗するものがあるのだろうか。実験手技の失敗によるとは思われないのに。

外科的侵襲あるいは外傷によってリンパ管が切断されても、致命傷となることはまずなく、リンパが透明に近いため気がつかないことが多い。傷害部周辺のリンパ管に吸収されるが、十分ではなく、傷害部に滲出液が溜まり、傷害部はみずみずしい感を与える。それが線維の増殖を促し、肉芽組織を形成する。やがて傷害部にリンパ管が再生すると、浮腫は消失し線維の増殖が止る。胸膜炎で臓側胸膜と壁側胸膜が癒着すると、そこにリンパ管が新生し、肺表面のリンパは肺門部に流れる一方、癒着部の新生リンパ管を通して胸壁や横隔膜に向って流れる⁴⁹⁾。その結果、肋間リンパ節や腹腔の傍大動脈リンパ節が肺から吸収した塵埃で黒く染まることもある。移植片と宿主の間にリンパ管が連なるかどうかは拒絶反応に関連する重要な問題である。自家移植 autograft でも同種移植 homograft でも10~14日前後には移植片と宿主のリンパ管は交通する。移植片の抗原情報はそれより早く、宿主のリンパ管によって所属リンパ節に伝えられる。拒絶反応が起こる場合、移植片が壊死に陥る3~4日前にはリンパ管は破壊され、交通がとだえる。

リンパの流れが何らかの原因で遮断されると、リンパ管の再生によって交通が復旧されるのみならず、新生によって側副路が形成される。その代表的な疾患として乳び尿 chyluria がある⁵⁰⁾。フィラリア・バンクロフト寄生虫の感染によって胸管が閉ざされると、乳びを含んだ胸管リンパ液を一般循環に

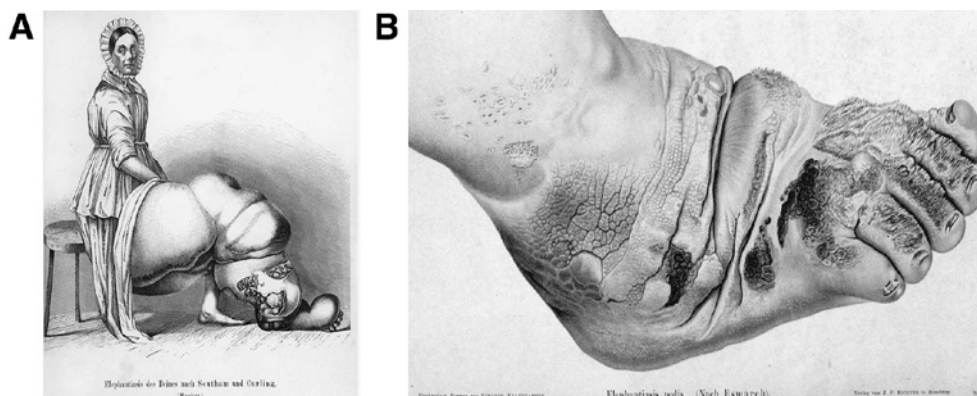


図5 典型的な象皮病患者を示す図。
 A：右下肢に象皮病を患う女性。
 B：典型的な慢性象皮病の足患部。
 (Esmarch and Kulenkampff, 1885 より引用)⁵¹⁾

送ろうとして、胸管起始部の高さから拡張した多数のリンパ管が後腹膜を腹壁に向かって延びて行く。その経過中に腎臓を含めた尿路があり、たまたまあるリンパ管は尿路に破れる。破れる機序は分からないが、リンパ排導ルート形成のすさまじさを感じる。

4. リンパ管の関わる病態とその制御

リンパ管に関連する病態は心血管系に比べると、一般的には命に直結する緊急性はほとんどない。その点、臨床的にもリンパ管についての認識がより軽いと言わざるを得ない。それでも、やはり深刻な問題がどうしても症状がかなり進行したあとで発生することが意外と頻繁にある。

1) 浮腫

リンパ浮腫とはリンパ管の低形成や弁不全、閉塞などによる機能不全によって末梢の組織間隙に組織液がうっ滞・貯留する病態（いわゆる“むくみ”）である。リンパ管性浮腫には急性と慢性がある。

急性リンパ管浮腫は癌の根治手術として、腋窩または骨盤のリンパ節を根こそぎ郭清した時に起こる。しかし、それはリンパ管の再生あるいは側副路の形成によってやがて消失する。古くから不思議としていわれてきたことは、腋窩リンパ節の郭清によって上肢に浮腫が来るが、骨盤内リンパ節の郭清によって下肢に浮腫が起こることは上肢の場合と比べるとより少ない。まず、骨盤リンパ節は後腹膜の疎性結合組織の中であって、リンパ管の再生あるいは側副路の形成がし易いからと考えられる。ただし、広範子宮全摘術後など、手術による切除領域が拡大する場合には下肢の浮腫が問題となる。その他解剖学的にみて、骨盤ではリンパ節が大きな動静脈に

沿って存在するため、手術によって血管が侵襲を受けることが少ない。いいかえると、腋窩リンパ節郭清による側胸部および上肢の浮腫には静脈性浮腫が加わるのではないかと推測される。また解剖学的にみると、撓側皮静脈流域から起こる浅リンパ管は上肢を上行し三角筋溝に入り、三角筋胸筋リンパ節を経て、鎖骨下リンパ節に注ぐ（図2B）。この経路は乳房からのリンパ管と直接的な関係がなく、腋窩リンパ節郭清時、このリンパ管系が傷害を受けなければ、上肢の浮腫は軽くすむのではないかと憶測される。鎖骨下リンパ節が摘出されたとしても、この経路から側副路が新生されれば術後の浮腫は発生しないのではないかと思う。

慢性リンパ管浮腫は一次性 primary と二次性 secondary に分かれる。二次性慢性浮腫は原因がはっきり分かっているもの、例えばリンパ管の炎症をもたらすような感染症、特に白癬（水虫）菌やフィラリアの感染によるリンパ管、リンパ節の閉塞によるものである。今では少なくなったが、熱帯地方の風土病としてのフィラリア症は末期には象皮病⁵¹⁾として知られている（図5）。問題は原因の分からない一次性慢性浮腫である、そのうち約10%は先天性のもので、残り約90%の多くは思春期に始まるので lymphoedema praecox と呼ばれる¹²⁾¹³⁾。その70~90%が女性に起こる。通常一側の下肢に起こるが、一側の前腕部にのみ、一側の上肢のみにみられることもある。この疾患はリンパ管の閉塞によるものではなく、リンパ管の迂曲や蛇行、怒張あるいは排導リンパ管の狭小などによるものである¹²⁾¹³⁾。ここに不思議がある。全身性紅斑性狼瘡（SLE）、橋本病、シェグレン

症候群、重症筋無力症などの自己免疫病⁵²⁾が女性に、しかも思春期に発症することが多いということで、患者層が類似する (Part 4 で後述)。また月経周期によって病状が変化するものがあることも似ている。しかし、一次性慢性浮腫が自己免疫病であるといっているのではない。少なくとも性ホルモンとの関係が推測されるが、それにしてもホルモンの影響として考えるには病変があまりにも局所的でありすぎる。最近、先天性のリンパ浮腫のうち、Milroy 病や lymphedema distichiasis (LD) 症候群では、それぞれ VEGFR3 と FOXC2 が原因遺伝子であることが報告されている⁵³⁾⁵⁴⁾。

2) 悪性腫瘍とリンパ行性転移

昔から臨床的にしばしば問題となるのが、癌腫 carcinoma はリンパ行性に、肉腫 sarcoma は血行性に転移することが多いということである。ここに不思議がある。なぜ癌腫と肉腫で転移のしかたが違うのか。癌腫は上皮性、肉腫は非上皮性の悪性腫瘍である。腫瘍細胞が集団から離れて周囲組織に浸潤するメカニズムとか、腫瘍血管や腫瘍リンパ管の形成のメカニズムなどなど、いろいろの問題はあるが、いまここでは正常な上皮組織と非上皮組織における血管とリンパ管の分布の違いを改めて比較検討することにする。

リンパ管が血管と同じように分布するなら、周囲組織に浸潤した腫瘍細胞は構造的に外膜細胞を欠き、基底膜がほとんどなく、内皮細胞間隙がたやすく開くリンパ管を選ぶはずである。上皮性の組織では、上皮が重層扁平上皮であろうと、単層円柱上皮であろうと、また腺組織であろうと、リンパ管は毛細血管網との間に結合組織をはさんで、その外で密な毛細リンパ管網を形成する。しかも、そこに広がる毛細リンパ管は毛細血管に比べて数倍の太さがある。これに対して、非上皮性の筋組織では、リンパ管は多数の筋線維を大きく束ねる厚い筋線維束間結合組織と筋全体を包む筋膜にのみ分布する。脂肪組織では、リンパ管は多数の脂肪細胞を小葉状に大きく区切る厚い結合組織にのみ分布が始まる。いいかえると、上皮組織では毛細リンパ管は、非上皮性組織でのそれに比べて、上皮細胞にはるかに近く、またはるかに密に分布している。リンパ行性転移の多い甲状腺や卵巣には、既述の通り、腺の実質内にもリンパ管が豊富に分布することで納得できる。

一方、上皮性組織と非上皮性組織における毛細血管の分布を比較すると、上皮内に毛細血管は分布し

ないが、非上皮組織では個々の筋線維、個々の脂肪細胞が極めて豊富な毛細血管で取り囲まれている。骨膜にしかリンパ管の分布をみない骨にも毛細血管はかなり豊富に分布している。骨芽細胞に由来する骨肉腫の細胞からみれば、リンパ管の分布する骨膜までの道のりは遠いが、毛細血管は直ぐそばに豊富に分布する。骨肉腫は好んで若年者に多く発症するので、毛細血管は (老齡者より) 特に豊富に分布している。骨肉腫でも骨膜に達するまで発育すればリンパ行性転移が起こる。ただどの組織においても、血行性転移を起こすには、リンパ行性転移と異なり、血管を破壊せねばならない。

リンパ行性転移であろうと、血行性転移であろうと、腫瘍細胞によって転移する遠隔臓器に好みがあって、いろいろな臓器に転移が起こるが、脾臓にだけは転移するものがほとんどない。ここに不思議がある。脾臓はもともと血液の濾過装置としての機能を持つ。脾動脈から流入した腫瘍細胞は何らかの理由で脾組織への定着が許されず、脾静脈へと去って行くのか、あるいはまた脾組織のマクロファージなどの作用を受けて死滅するのだろうか。

腫瘍のリンパ節転移については、最近まで腫瘍が増大する過程で既存のリンパ管に偶発的に侵入し、リンパ節へ到達するという考えが主流であった。また、腫瘍組織内には血管は豊富でもリンパ管は存在しないと考えられていた⁵⁵⁾。ところが、腫瘍が VEGF-C⁵⁶⁾ や VEGF-D⁵⁷⁾ を発現・分泌することでリンパ管新生を誘導し、リンパ行性に転移するケースが報告されている。さらに、VEGF-C の発現とリンパ節転移との相関が胃、大腸、肺、前立腺、甲状腺、メラノーマなどの腫瘍例でも報告されており、腫瘍内および腫瘍周囲に新生するリンパ管は「腫瘍リンパ管」と呼ばれているが、これらに対して抗 VEGFR3 抗体の投与をはじめとする抗リンパ管新生療法も試行され始めた⁵⁸⁾。

3) 肥満

先にも述べたが、もともと脂肪とリンパ管は切っても切れない関係を持つが、その多くは依然として謎が多い²⁾。血管と脂肪細胞との関係については種々のアディポカインの存在を含めて数多くの報告⁵⁹⁾があるものの、特に肥満との関係でリンパ管の機能不全が肥満を引き起こすという証拠は Harvey ら⁶⁰⁾によって初めて報告された。つまり、Prox1^{+/-}マウスにおいて、リンパ管からのリンパ漏出が脂肪細胞の肥大を招くことにより肥満が起こる。また、Nurmi

ら⁶¹⁾は成体で VEGF-C を欠乏状態にしたマウスにおいては、高脂肪食を与えても、小腸の乳び管が退縮すると同時に絨毛内の平滑筋機能も低下して脂肪吸収が低下するために肥満が発症しないことを報告している。

一方、リンパ浮腫が慢性化すると、しばしば不可逆性に局所に脂肪が組織液とともに貯留し脂肪細胞が増加して“脂肪浮腫”の状況を呈し、さらに長期化して線維化が加わると組織が硬化してよいよ末期状態である象皮病(図5)となる。したがって、脂肪の代謝を制御することで、肥満を予防するだけでなく、逆に健全なリンパ循環を維持できると考えられる。肥満を含む生活習慣病の予防や浮腫の予防・改善のためリンパ体操⁶²⁾も考案されている。

肥満自体は直接的に命に関わる状況ではないが、実は生活習慣病という現代人にとっては日常気付かないうちにジワジワと進行する深刻な病態であること、それには血管病変だけに注目するのではなく病態改善のための鍵となるのが実はリンパ管機能であることを忘れてはならない。今後とも、脂肪とリンパ管との関わりについての研究のさらなる発展が期待される。

Part 3：リンパ内およびリンパ組織内の細胞群

本章では、リンパとリンパ組織に存在する細胞群についてそのプロフィールと発生・分化について論じてみたい。

1. リンパ内細胞群のプロフィール

1) リンパ球

リンパ球は、哺乳類のリンパ中に存在する細胞のほとんどを占めるが故に“リンパ球”と18世紀に William Hewson が命名したとされている⁶³⁾が、その機能は1960年代になるまでほとんど分からず注目されることもなかった。その機能を初めて解明したのは、当時の若い2人の臨床医達であった。その1人がオーストラリアの Jacques F Miller で、白血病の原因を知るために行った新生仔マウスの胸腺摘出によって、リンパ球数の減少といわゆる細胞性免疫能が消失(易感染性や他家移植への寛容)することを発見⁶⁴⁾し、これが胸腺と胸腺依存性リンパ球(Thymus の頭文字を取って T 細胞)の機能解明の発端となった。もう一人は米国の小児科医 Max D Cooper で、重症の免疫不全症の小児患者を救うため、やはり新生のヒヨコの胸腺とファブリキウス嚢の摘出実験で、ニワトリにおけるファブリキウス嚢の役割と

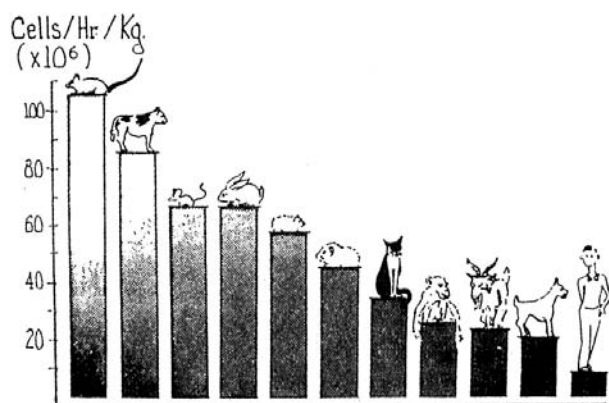


図6 各動物種における胸管リンパ内細胞数。体重1kg当たりの毎時胸管リンパ内細胞数をY軸に示す。(Reinhardt, 1964より引用)⁶⁷⁾

ここで分化するリンパ球(bursa of Faburiciusの頭文字を取ってB細胞)が液性免疫能(抗体産生機能)を担うこと⁶⁵⁾⁶⁶⁾を発見した。

ヒトを含め哺乳動物の胸管リンパ内細胞の85~95%以上がリンパ球で、血液リンパ球の主要な供給源である。1日に胸管から血液に放出されるリンパ球数はどの動物でもほぼ決まっています、血液リンパ球総数の約2~5倍である¹³⁾⁶⁷⁾。この数値をD.R.F.(daily replacement factor)という⁶⁸⁾。いいかえると、血液リンパ球は日に2~5回入れ替わる。ここに不思議がある。小さい動物ほど激しく入れ替わり(図6)、寿命の短い動物ほど激しく入れ替わる⁶⁷⁾。牛は例外にみえるが、仔牛のデータに因るためである。同じ動物でも若い動物ほど激しく入れ替わる。正常な動物の血液リンパ球が一定しているのは、胸管から血管系に放出されるリンパ球数が一定しているからである。静注や点滴、特に高張ブドウ糖溶液を静脈注射すると、胸管リンパ流量はすぐ増量するが、それに反比例して胸管リンパ球数は減少する。胸管リンパ球はいろいろな因子で制御されているが、直接的に強い影響を示すのは副腎であり、下垂体である⁶⁹⁾⁷⁰⁾。副腎を摘出すると、胸管リンパ球数は不規則に増加する。副腎皮質ホルモンにリンパ球の増殖抑制作用のあることはよく知られているが、副腎摘出による胸管リンパ球数の増加は細胞分裂に要する時間では考えられないほど早いので、恐らく副腎摘出によって、リンパ節などのリンパ組織に足どめされていたリンパ球の足かせが外れるのではないかと考えられる。血液リンパ球数の日内変動も同じような機序で説明できるかも知れない。余談だが、麻酔下でラットにストレス(塩化カリウム溶液の静

脈内投与) を与えると胸管リンパ球数の減少だけでなく、乳びの白濁度(つまり脂肪の吸収度)が顕著に減少する。ところが、副腎摘出(または下垂体摘出)したラットでは同じストレスを与えても乳びの白濁度は変わらないかむしろ増加する^{71)~73)}。このことは副腎皮質ホルモンが脂肪の吸収にも深く関わっていることを示唆するかも知れない。

さて、胸管リンパ球の主な供給源は以下の3つが考えられる。

- (1) リンパ節やパイエル板などのリンパ組織で、血液-組織-リンパへと再循環するもの、
- (2) リンパ節や脾臓、胸腺などのリンパ組織で新たに作られるもの、
- (3) すべての器官、臓器の特定の微小血管から組織に遊出したもの、

まず、(1)の再循環リンパ球は胸管リンパ球の60~70%を占める。再循環が行われる場所はリンパ節やパイエル板の高内皮細静脈 high endothelial venules (HEV) である⁷⁴⁾。胸管リンパ球の80~85%はTリンパ球で、10~20%がBリンパ球で、その比率は血液とほとんど変わらない。Tリンパ球もBリンパ球⁷⁵⁾もHEVを介して再循環をしている。このHEVを介する選択的なリンパ球の通過機構を解明するためにいろいろな細胞接着因子などが研究されている⁷⁶⁾。HEVを通して再循環する細胞はほとんどが抗原にまだ出会ったことがない naive な細胞だという⁷⁷⁾。ラットでは胸管リンパ球の約80%がT cellで、そのうち90%が naive T cell である。ここにまた不思議がある。単純な疑問であるが、再循環する細静脈の内皮細胞はなぜ丈が高いのだろうか。これについては、まだ完全に解明しつくされたとはいえない。ただし、これらの高内皮細静脈では細胞は血液側から末梢性リンパ組織の実質側に一方方向にしか移動しない。決してその逆の方向へは細胞移動は起こらない。これに対して、中枢性リンパ組織である胸腺の細静脈はむしろ丈の低い内皮細胞から構成されることが多いが、ここでは胸腺で分化成熟した胸腺細胞が胸腺実質側から末梢血側に向かう逆方向の移動も起こる。つまり胸腺の細静脈は全身の中で唯一二方向性の細胞移動を可能にする血管である。この細胞移動の方向性と内皮細胞の高さとの間に何か関係があるのだろうか? これに対して、移植片対宿主 graft-versus-host (GVH) 反応でリンパ節での血管透過性が亢進する時は内皮細胞はむしろ扁平となり、墨はそこを通る⁷⁸⁾。放射線照射後胸腺組織が

回復する時には、静脈内皮細胞は丈が高くなって立方形になり、リンパ球はそこを通過して胸腺内に入る。

次に、(2)リンパ節や脾臓、さらに胸腺などのリンパ組織で新たに作られたリンパ球は胸管リンパ球の重要な供給源となる。ラットの胸管リンパをカニューレションで採り続けると、リンパ球数は急激に減少し、4~5日目には約1/10に減少する。それ以降も採り続けても、細胞数はそれ以上は減らない。ここを thoracic duct baseline と呼んでいる。中・大リンパ球が比較的多く(20~30%)なる。腸間膜根リンパ節、膝窩リンパ節、胸腺(特に皮質)、脾臓の重量は1/4~1/5に減少する。その時、細胞だけを採集して、リンパ漿を返してやると、リンパ組織の退縮は1/2~3/4ですむ⁷⁹⁾。リンパ組織を刺激してリンパ球の産出を高める何らかの因子がリンパ漿に増えるのではないかと思われる。

中枢性リンパ組織である胸腺も胸管リンパ球の供給源として大きな役割を担う。マウスの胸腺を摘出すると、胸管リンパ球数は7日後50%以下に減少し、モルモットの胸腺を摘出すると、胸管リンパ球数は14日後40%以下に減少する。胸腺はTリンパ球の産出母地として知られており、ここで産出されたリンパ球は直接静脈系に入ると解されてきたが、胸腺にリンパ管の分布が分かって以来、リンパ行性に意義を見出すようになった⁸⁰⁾⁸¹⁾。モルモットの胸腺からリンパ行性に1日に放出されるリンパ球数は血液リンパ球総数の約16%である。なお、哺乳動物と違って、鳥類ではTリンパ球は胸腺で、Bリンパ球はファブリキウス嚢で別々に産出されるが、ファブリキウス嚢にもよく発達したリンパ管の分布が見出され、ここで産出されたBリンパ球もリンパ行性に放出されることが分かった⁸²⁾。末梢性リンパ組織である脾臓も胸管リンパ球の供給源の1つであるが、最近マウス脾臓の白脾髄にもリンパ管の存在が実証され⁸³⁾、脾臓で産出されたリンパ球もリンパ行性に放出される可能性が実証された(図7)。

(3)リンパ球は、顆粒白血球と違って、炎症がなくても、すべての器官、臓器において特定の微小血管から組織に遊出し、パトロールした後に末梢毛細リンパ管に入る。つまり、一次リンパ節の輸入リンパ管には常に必ず一定数のリンパ球やマクロファージ系の細胞が存在すること⁸⁴⁾から明らかである。しかし、その部位が具体的にどの血管から遊出しているのかは今も謎のままである。一転して病態時には、組織内で抗原情報を得たリンパ球は所属リンパ節で

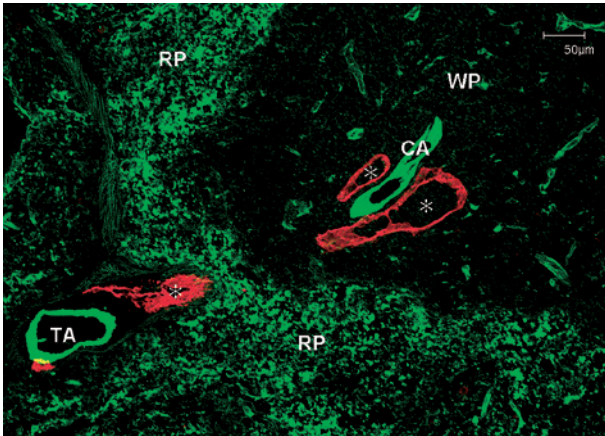


図7 マウス脾臓のリンパ管。
共焦点レーザー走査顕微鏡による FITC 標識トマトレクチン (緑) と LYVE-1 (赤) の二重染色像。白皮髄 (WP) 内の中心動脈 (CA) の近傍にみられるリンパ管の起始部 (*) が認められる。RP: 赤皮髄, TA: 梁柱動脈。Bar: 50 μm。(Shimizu ら, 2009 より引用) ⁸³⁾

免疫応答を惹起する。血液-組織-リンパへの循環路としては、(1)と同じく再循環に違いないが、そこに高内皮細静脈 (HEV) は存在するのだろうか。

一方、腸絨毛の血管から遊出したリンパ球は粘膜上皮細胞間に進出し、ここで抗原情報を得て腸絨毛のリンパ管に帰り、所属リンパ節で免疫応答を惹起すると考えるのが通常概念である。ところが、粘膜上皮間に進出した無数のリンパ球は引き返すことなく腸管に突入してしまう。ここに不思議がある。リンパ球にとって、腸管はまさに墓場である。腸管に突入したリンパ球はすぐ壊されるが、その核成分は腸管から吸収され、リンパ節、胸腺、脾臓、骨髄などで細胞構成要素として再利用される⁸⁵⁾。さらに妊娠中に母親の腸管から吸収されたリンパ球の核成分は胎児の造血幹細胞をはじめリンパ節、胸腺、脾臓などの細胞に再利用される⁸⁶⁾。その核成分はヌクレオシド、ヌクレオチドのレベルで吸収されるだけでなく、DNA レベルで血液およびリンパに吸収される⁸⁷⁾。これはリンパ球の免疫学的記憶を継承する可能性を秘めている。

血液や脾臓にはナチュラルキラー (NK) 細胞と呼ばれる細胞がある⁸⁸⁾。この細胞は腫瘍細胞あるいはウイルス感染でトランスフォームした細胞を非特異的に障害する細胞である。NK 細胞はアズール顆粒を持つ大型リンパ球 (large granular lymphocytes: LGL, 末梢血リンパ球の 5~10% を占める) の一部としてリンパ球の範疇に入れられている。ところが、

NK 細胞は胸管リンパやリンパ節に出現しない。ここに不思議がある。そもそもリンパ球はリンパ、リンパ組織に多くみられる細胞になるが故に名づけられたもので、他の血球のように形態や機能を示すものではない⁶³⁾。さらに、胸腺を生まれつき持たない nude 変異をもつヌードマウスには、胸腺依存性リンパ球である T 細胞を欠くが、NK 細胞は逆に多く、NK 活性も高い。そのため、この細胞のことを胸腺外分化 T 細胞⁸⁹⁾と呼ぶこともある。

2) 非リンパ球性細胞 (単球, 樹状細胞)

単球はヒト末梢血白血球の 5%, 胸管リンパ内細胞の 3% 程度を占める。ところが、末梢リンパでは 5~22% に上昇する⁸⁴⁾。顆粒白血球と違って、単球はリンパ球と同じく炎症がなくても血液-組織-リンパへと循環している。単球は生体防御機構の原点である。強い貪食機能を持ち、組織に侵入した異物、抗原を取り込み処理するほか、細胞内のライソゾームを細胞外に放出し、組織の修復、再建を促すものがある。胸腺に遊走した単球は細胞外に放出したライソゾームによってハッセル小体を破壊し⁹⁰⁾⁹¹⁾、胸腺細胞の分化成熟を助ける。更に単球の重要な機能は抗原の取り込み分解によって抗原提示細胞となり、末梢リンパ管を経て、所属リンパ節で免疫応答を惹起することである^{92)~94)}。抗原を取り込んだ単球は自己免疫を発症する NZB/w F1 マウスの胸腺内にも現れる⁹⁵⁾。

単球よりはるかに数は少ない (1~3%) が、組織から末梢リンパ管を経て、リンパ節に抗原情報を運ぶ細胞がいる。この細胞は樹枝状の突起を持っているので、樹状細胞 dendritic cells (DC) と呼ばれる⁷⁷⁾。その代表的な細胞が皮膚の表皮の間に樹枝状の長い突起をのびしたランゲルハンス細胞 Langerhans cell である。この細胞は口腔、咽頭、食道などの粘膜重層扁平上皮にも存在する。表皮内のランゲルハンス細胞は表皮を離れ真皮のリンパ管に入ると、さすがにここでは長い突起を縮めて、ヒラヒラとリンパの中を泳いで所属リンパ節に入る。そのため、ヴェール状細胞 veiled cell とも呼ばれる。ヴェール状細胞は抗原提示細胞の 1 つとして知られているが、新しいランゲルハンス細胞と交替するために表皮を去る細胞も含まれると思われる。DC は腸粘膜や気管支粘膜からの末梢リンパ管の中にも存在する。また肝リンパにも存在する⁹⁶⁾。骨髄からの DC 前駆細胞は肝臓の類洞を出、デイチセ腔を流れて小葉間組織に始まる肝リンパ管の中に DC として姿を

現わし、肝リンパ節に達して免疫応答を惹起する。ここに不思議がある。DCはリンパ節の輸入リンパ管に存在するが、輸出リンパ管には存在しない。DCはリンパ節の傍皮質（T細胞域）に入り、ここに分布する陥合（かみあい）細胞 interdigitating cells (IDC) に抗原または抗原情報をわたした後消滅するのか、あるいはIDCとして定住し、リンパ球を活性化し続けるのだろうか。末梢リンパは少なくとも1コのリンパ節を経て、胸管に入るという原則（介在律）¹⁹⁾があるが、輸出リンパ管に含まれないDCは胸管リンパに出現しないことになる。

2. リンパ内細胞の系統発生

1) リンパ球

リンパ球はヤツメウナギ（無顎の円口類）にはまだなく、サメ（軟骨魚類）になって初めて出現する。これらの動物のリンパ管は血管系からまだ独立していなくて血リンパ管¹⁶⁾と呼ぶべき状態なので、血液に含まれる細胞すべてがリンパに現れる。リンパ管系が血管系から独立した硬骨魚類から哺乳類にいたるすべての動物において、リンパ球は血液におけるよりリンパにはるかに高率で出現する⁹⁷⁾⁹⁸⁾（表3）。ヒキガエル（無尾両棲類）のリンパでは、リンパ球が既にリンパ内細胞の52%を占める。アオダイショウ、イシガメ（爬虫類）では更に高率となり、アヒ

ル（鳥類）やヒト（哺乳類）ではリンパ内細胞のほとんどすべてをリンパ球が占める。哺乳類ではリンパ節がよく発達しているので、リンパ球の主な供給源をリンパ節に求めることができるが、鳥類（アヒル、ガチョウ）では原始的で小さいリンパ節が胸管に介在して頸部（頸胸節）に1対、腰部（腰節）に1対存在するだけである（図4B）。爬虫類、無尾両棲類には勿論リンパ節はない。ではこれらの動物のリンパ内リンパ球の供給源をどこに求めるのか。これらの動物では胸管壁のみならず末梢リンパ管壁に、より簡単なリンパ装置が内皮下リンパ小節、内皮下リンパ浸潤の形で無数に出現する²⁰⁾⁹⁸⁾。表面はリンパ管内皮で被われるだけで、管腔に突出するものも多い（図8）。実はリンパ節のよく発達しているヒ

表3 各動物種におけるリンパ球の出現率。

動物種	リンパ中 (%)	血液中 (%)
ウナギ	62.1	20.6
ナマズ	43.5	22.0
ヒキガエル	52.1	32.3
アオダイショウ	80.0	56.0
イシガメ	86.1	47.0
アヒル	96.7	26.9
ヒト	97.0	23.0

(Kotani, 2012 より引用)¹⁾

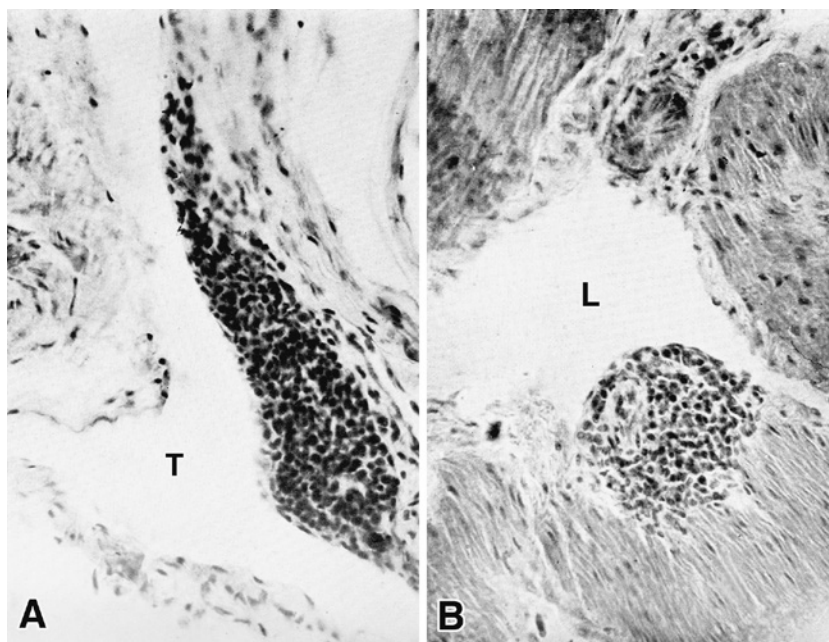


図8 トカゲの内皮下リンパ組織。

A: 胸管 (T) の壁から内腔に突出した錐体状のリンパ小節。

B: 小腸の内輪走筋間のリンパ管 (L) の内腔に突出した球状のリンパ組織。

(Kotani, 1961 より引用)⁹⁸⁾

トや他の哺乳類のリンパ管にも、同じようなリンパ小節やリンパ浸潤が内皮下リンパ装置として広く分布している。

2) 非リンパ球性細胞 (顆粒白血球, 単核球)

魚類, 両棲類, 爬虫類では, 鳥類, 哺乳類に比べ, リンパに非リンパ球性細胞の出現率が高い⁹⁷⁾⁹⁸⁾ (表4)。出現率だけでなく, 非リンパ球性細胞の種類が多くなる⁹⁷⁾ (表5)。ヒキガエルのリンパには中好性, 酸好性, 塩基好性の顆粒白血球をはじめ, 単核球, 色素細胞など, [赤血球と紡錘状細胞 (哺乳類の血小板と同じような働きをする栓球とも呼ばれる有核細胞) を除く] 血液中のすべての細胞が現れる。硬骨魚類でも爬虫類でも同じことがいえる。ここに不思議がある。哺乳類では炎症がない限りリンパに現れない顆粒白血球が爬虫類, 両棲類, 硬骨魚類のリンパになぜ現れるのか。その供給源はどこなのか。哺乳類, 鳥類の顆粒白血球は骨髄で産出され血管系に送られる。ところが, 硬骨魚類の骨髄はまだ発達が悪く, 無尾両棲類になって初めて骨髄造血が認められるが, それも冬眠から覚めた直後の短い期間だけである。骨髄造血は爬虫類になってやや盛んになるが, 哺乳類, 鳥類のように造血中枢の主体となるようなものではない。たとえ顆粒白血球の産生が骨髄で盛んに行われたとしても, 骨髄にリンパ管はないので, リンパ内細胞の直接の供給源とはなり得ない。そこで考えられるのは, 魚類, 両棲類, 爬虫類の諸臓器, 諸組織で行われる髄外造血である。主な顆粒白血球造血は円口類では腸の皺襞 (原始脾), 軟骨魚類では生殖腺 (卵巣, 精巣) の間質, 硬骨魚類では中腎の間質, 有尾両棲類では肝の間質 (特に被膜下) で行われる。カエル (有尾両棲類) やカメ (爬虫類) の腸粘膜上皮には顆粒白血球の造血巣があり, 幼若型の細胞がすべて存在する。このような髄外造血

巣で成熟した顆粒白血球は血管に入ると同時に, 恐らくここに分布するリンパ管にも入ると推察される。それとも, 哺乳類と違って, 硬骨魚類, 両棲類, 爬虫類では, 炎症の有無にかかわらず, 顆粒白血球は血管から組織に遊出し, リンパ管に入るのだろうか。

次に注目されるのは, ウナギやナマズのリンパに含まれる単核球の比率の高さにある (表5)。血液の含有率 (8.7~10.1%) に較べてもはるかに高い。これは単球以外に組織球 (組織内に住み着いたマクロファージ) が多く含まれているためである。硬骨魚類では単球系と組織球系と2種類が識別される。組織球は大リンパ球の2~3倍の大きさがある。ヒキガエルの単核球の比率は低い, その半数は単球, あとの半数が組織球である。それぞれの血液の含有率 (4.8~3.7%) よりやや低い。組織球には含褐色色素細胞 (メラニン色素を貪食したマクロファージ) が含まれる。アオダイショウのリンパの単核球含有率は血液 (26.6%) よりやや低い, 単球のほか, 組織球も含んでいる。組織球は単球同様貪食性に富み, 体内に侵入した異物, 細菌などをライソゾームで溶解するほか, 抗原提示細胞として知られている。ここに不思議がある。ヒキガエルのデータを別にする

表4 各動物種のリンパ内細胞の割合。

動物種	リンパ球 (%)	非リンパ球性細胞 (%)
ウナギ	62	38
ナマズ	51	49
ヒキガエル	36	64
アオダイショウ	80	20
イシガメ	86	14
アヒル	98	2
ヒト	97	3

(Kotani, 2012 より引用)¹⁾

表5 各動物種のリンパ内非リンパ球性細胞の割合。

動物種	好中球 (%)	好酸球 (%)	好塩基球 (%)	単核球 (%)
ウナギ	9.2	0	0	25.8*
ナマズ	12.9	0	0.1	43.3*
ヒキガエル	42.0	19.0	0.3	4.6*
アオダイショウ	3.8*	0	0	16.2*
イシガメ	8.2*	0	0	5.7*
アヒル	0	0	0	0.6
ヒト	0	0	0	3.0

* 哺乳類の好中球に相当する細胞であるが, 異調染色性により特殊顆粒は好酸性を示す。

単球および組織球を含む。

(Kotani, 2012 より引用)¹⁾

と、爬虫類から魚類にさかのぼるに従って組織球のリンパ内出現率が上る。特に魚類で著明に増加する。生体防御機構におけるマクロファージ系への依存度の高さを示すものと思われる。一般的に哺乳類のリンパには組織球は存在しないとされているが、ランゲルハンス細胞は真皮から重層扁平上皮の基底細胞層に移住した細胞で、この細胞を組織球系のマクロファージと解釈すれば⁹⁹⁾、すべての動物（鳥類は未詳）の末梢リンパに組織球が存在することになる。

Part 4：リンパ系と脂肪とのかかわり

近年、現代病ともいわれる肥満や代謝性疾患についての関心の高まりとともに、リンパと脂肪との関わりについては分子レベル・遺伝子レベルでの研究も盛んになってきている¹⁰⁰⁾⁶⁰⁾。これまで既述した点と多少の重複があるかも知れないが、リンパ系と脂肪との関わりについても、まだまだ分かっていない謎や知りたい点がある。そこで、本章ではより現象論に近いレベルでの話題や興味深い点を挙げ、若い研究者や臨床医の皆さんにも一緒に考えて頂きたい。

1. 脂肪の吸収路としてのリンパ管

一般的に、腸管からの脂肪の吸収は、吸収上皮の直下にある毛細血管からではなく絨毛中心部に位置する中心リンパ管からしか吸収されない。つまり、リンパ管系は組織内において血管系では回収できないもの、すなわち一定の大きさ以上の巨大分子（ヒアルロン酸、高分子蛋白など）、炭素数が12を超える長鎖の脂肪酸などを細胞とともに吸収することである^{101)~103)}。一般的な長鎖脂肪酸である脂肪成分はカイロミクロン（0.1~0.3 μm）としてリンパ中に吸収される。そのため、食後の腸管リンパは乳白色に濁ってみえ、“乳び milky” と呼ばれる由縁となった。したがって、炭素数が12かそれに満たない短~中鎖の脂肪酸は腸管の毛細血管内へ自然拡散によって十分に吸収可能なものであり、毛細血管から吸収されるか、毛細リンパ管からしか吸収されないかは、基本的にはその物質の分子サイズによるが、動物の種類や脂肪の種類によって、若干の差があるらしい。ただし、体内のすべての毛細リンパ管が同様の吸収機能を有するのか、あるいは微小血管群と同様に部位によって異なる機能を持つのか、つまり部位特異性¹⁰⁴⁾を持つのかは未解決のままである。しかし、つい最近になってようやく、臓器特異的なリンパ管の存在が議論され始めている¹⁰⁵⁾¹⁰⁶⁾。

ところで、初期のリンパ管描出法に油絵の具のプ

ルシャン青とテレピン油を配合した色素液（ゲロータ液）を使用したのが、このことは正に油性の液体がリンパ管に好んで吸収されることを利用したものである。さらに、臨床診断でのリンパ管造影には、日本でも世界に先駆けて¹⁰⁷⁾油性のヨード製剤が用いられた経緯があり、以来水溶性造影剤の欠点でもある“管外漏出”の程度が少ないリピオドールをはじめとする脂溶性造影剤が汎用されてきた。

2. ミネラル油によってリンパ管腫が発症する理由

どうやら、脂肪を取り込むのはリンパ管のみばかりではなさそうだ。腹腔などの漿膜腔を被う中皮細胞も脂肪に対する特有の反応をきたす。

実は1970年代にミネラル油や腹水誘導用の pristane など油性の物質を腹腔内に投与すると、種々の細胞の腫瘍（骨髄腫、B細胞系腫瘍など）が発症することが知られていた¹⁰⁸⁾が、同時に腹腔表面には別の種類の腫瘍が発症していた。当時はほとんど注目を集めていなかったが、それから十数年後に Mancardi ら¹⁰⁹⁾が同じ油性のアジュバント（FIA）を用いて良性のリンパ管腫を誘導したと報告した。彼らは、病理学的にリンパ管腫と診断したが、正確には腹膜中皮細胞が骨髄由来の腹腔内マクロファージなど種々の細胞を巻き込んで腫瘍化して中皮腫の一種を形成する（図9）。つまり、油により刺激を受けると普段は単層扁平な中皮細胞が油を摂取しながら、立方化するとともに細胞同士の結合を緩め、一時的に極性を失う。さらに、中皮のマーカーであるポドブ

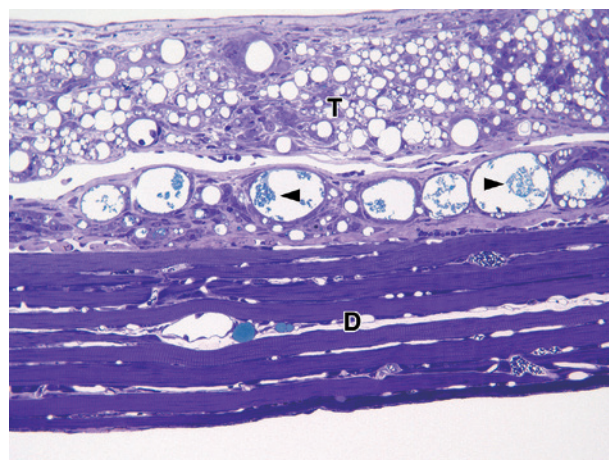


図9 マウスのアジュバント誘導性リンパ管腫。典型的な蜂蝸状良性腫瘍（T）がフロイント不完全アジュバント（FIA）を腹腔内投与後に発症する。FIAと混合投与したEM-blue色素（矢頭）が腫瘍内で摂取され、互いに融合してより大型の管状構造へと蓄えられる。

ラニンPDPNを強発現すると同時にケモカインCCL2などを分泌して骨髄由来の細胞を呼び寄せて、腹腔表面のいたるところで多彩な腫瘍を形成していく。この腫瘍形成の過程で、摂取した脂肪滴が細胞内で融合し、それが巨大化すると近隣の細胞同士で連なって管状の構造や巨大な嚢胞状の構造を呈する。この過程には、中皮細胞以外にも骨髄由来の腹腔マクロファージが、盛んにFIAを摂取して中皮内に進入して腫瘍の形成に関与している。やがて管状構造が次第にリンパ管様につながっていき、最終的に機能的なリンパ管を形成することを確認した。さらに我々は、マウスにこの腫瘍を誘導し、その腫瘍細胞¹⁰⁹⁾を免疫原としてラットを免疫し、マウスのリンパ管内皮に対するモノクローナル抗体を作製することに成功した¹¹⁰⁾。正常マウスのリンパ管内皮を抗原の材料として大量に集めることが至難の業だったからである。元々、腹腔内の特定部位、つまり横隔膜表面に存在する篩状斑では、腹膜の中皮細胞とリンパ管内皮細胞同士が連続性に直接接している¹¹¹⁾。したがって、両者が互いに移行し合えるような非常に緊密な関係にあるといえる。つまり、我々は上記のアジュバント誘導性のリンパ管腫の成立には、アジュバントという異物性の油を中皮細胞や腹腔マクロファージが摂取して取り込み、さらに時間が経過すると、自らそれらを腹腔外へ排導するために、互いに融合して管状に連なり、ついには長く伸びたりリンパ管様の排導路を形成するのではないかと考えている。ここに不思議がある。中皮と内皮との相関性の高さと両者を近づける要因の1つに脂肪(ミネラル油)が関係している点である。言い換えると、中皮-脂肪摂取細胞-リンパ管内皮間の形質転換(中皮-内皮間形質転換)が起こっている可能性を提唱¹¹²⁾している。このことは、最近特に注目を集めているリンパ管新生のメカニズムを解明する上で極めて重要な問題でもある¹¹³⁾¹¹⁴⁾。中皮細胞とリンパ管内皮との移行を制御できれば、慢性リンパ浮腫や腹膜透析患者が抱える腹膜硬化症¹¹⁵⁾などの治療への応用にも何らかの手がかりが得られるかも知れない。

我々の経験では、アジュバントを腹腔内に投与後約1週間でもこの腫瘍は腹膜表面のあらゆる中皮細胞から発症する可能性がある。1つ不思議なことには、腹腔内での唯一の例外が、卵巣表面を被う中皮、つまり表面上皮(または胚上皮ともいう)だけは、アジュバントによる変化をほとんど起こさなかった。この細胞は通常は単層立方状を呈しており、定

期的に起こる排卵のための準備をしているのか、他所の中皮細胞のように単層扁平な形状をしていない。あるいは、卵巣癌の発症源となりやすいのは、逆にアジュバントによる中皮腫の発症とは逆相関するのだろうか？

3. リンパ系と脂肪組織の基本構造：細網組織

本来、リンパ管・リンパ組織と脂肪組織とは切っても切れない関係を持っている。ここに不思議がある。両者はともにいわゆる細網線維(主にIII型膠原線維からなる)が豊富な組織、つまり細網組織に属する。細網組織とは、間葉系の細網細胞(線維芽細胞の特殊型で組織球の仲間でもある)とその細胞が産生する細網線維で構成されていて、組織液や細胞・物質の移動が盛んな場を提供する特殊な結合組織である。特に造血組織やリンパ組織、さらに脂肪組織に特に良く発達している(図10)。つまり、す

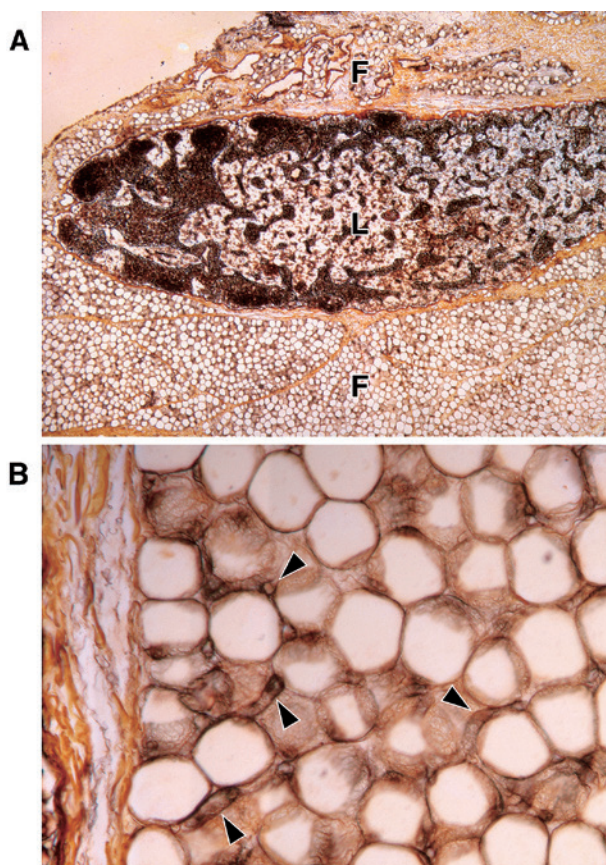


図10 リンパ節および脂肪組織の基本構築を成す細網組織。A: リンパ節と脂肪組織の親密な関係。両者は鍍銀染色に強染する銀親和性細網線維によって成り立っている。B: 脂肪組織の強拡大像。個々の脂肪細胞と多数の毛細血管(矢頭)が大変繊細な細網線維網で被われている。A & B: 細網線維を染色するための鍍銀染色による。(Ezaki, 2014より引用)²⁾

すべてのリンパ組織および造血組織は、この細網組織を基本骨格としており、そこに居候である血球系の細胞が移住したものである。一方、脂肪組織でも脂肪細胞の周囲が細網線維で包まれていて、盛んな代謝が行われていることから、細網組織の一種であることに間違いはない。リンパ節は通常体の屈曲部(顎下、腋窩、鼠径、膝窩など)の脂肪組織中に埋もれている。したがって、正常状態でリンパ節を触診することは難しく、感染時など炎症が起こって初めて触知可能となる。この時のリンパ節の腫大は炎症の度合いによって2~3倍から20~30倍以上にも及ぶことがある。先に言及した通り、リンパ節が脂肪組織中に普段から埋もれていることで免疫応答のための自由度や恒温性を残していると考えられる。さらに、漿膜腔系と脈管系との間には脈管外通液路²⁰⁾が存在して、そこには特に細網線維が豊富に分布しており、組織液をリンパ管系へと排導する有力な誘導路となっている。したがって、いざリンパや脂肪が鬱滞する場合には、ここがリンパ浮腫や脂肪浮腫の発症現場となるであろう。以上のことから、細網組織を形成する構成要素を探求することこそがリンパ系と脂肪組織の両者の不思議な関係を解き明かすための重要な“鍵”の一つである。

4. 加齢退縮と脂肪化

一般的に造血組織やリンパ組織は加齢によって退縮し、脂肪組織に置き換えられる。例えば、ヒトの骨髄は赤色骨髄から黄色骨髄へと変化してくる。最も激しい加齢退縮を示すのが胸腺である。ここに不思議がある。先に述べた通り、リンパ組織と脂肪組織は正に同じ起源を持つといっても過言ではない。両者は発生学的に同じ間葉系細胞に由来し、細網線維を作る細網細胞が分化したものと考えられる。したがって、リンパ組織(造血組織)は細網細胞の形成する物質移動や代謝の盛んな微小環境下に血球系が居を構えたものの、加齢とともに造血能力が落ちてくると、居候である血球が居なくなるため、あとに残った細胞は有り余った栄養源や蓄積物を貯め込むために脂肪細胞へと移行するのも知れない。これも一種の形質転換と言っても良からう。長澤ら¹¹⁶⁾は骨髄の細網細胞が、造血幹細胞に対する微小環境nicheとしての役割を果たすと同時に、この細胞自身が脂肪細胞または骨芽細胞へと分化することを報告している。しかし、これらの細胞間の相互分化を促すメカニズムは未だ明らかではない。また、リンパ組織の加齢による退縮・脂肪化が、そこに在住す

る細網細胞が直接脂肪細胞に変化することによって起こるのか、それともそれ以外の細胞が脂肪細胞として変化を遂げていくのか、現時点では結論は出ていない。しかし、骨髄線維症などに特徴的なように、骨髄が脂肪化や線維化を招くような疾患・病態の解明のためにも、そのメカニズムを研究することは極めて重要であるといえる。慢性化したリンパ浮腫における脂肪浮腫化・線維化についても、ある意味ではリンパ組織の加齢退縮(=脂肪化)と大変類似していることから、この方面でも今後の研究の伸展を期待したい。

5. リンパ組織とステロイドホルモン

臨床医にとってステロイドホルモンは正に“諸刃の剣”である。この言葉は明らかにリンパ系とステロイドホルモンの緊密な関係を裏付けている⁷⁰⁾。以前はステロイドホルモンの薬効を胸腺の退縮度で判定していた時期もあるという。従来から強力な免疫抑制剤として副腎皮質ステロイド剤が治療に使用されているとおり、リンパ球自体が糖質ステロイドホルモンに対する受容体を持つことは明らかである¹¹⁷⁾。これに対して、リンパ組織の加齢退縮には思春期頃から始まる二次性徴による性ホルモンの影響をまず強く受ける。ここに不思議がある。同じステロイドホルモンでありながら、副腎皮質ホルモンと性ホルモンとは、作用する標的も効果も全く異なる。特に加齢変化については性ホルモンが圧倒的に優位に働き、我々の人生の中でも思春期や更年期などの重大な転機をもたらすことになる。性ホルモン自体も脂質性のステロイドホルモンの一種であり、ここでもリンパ組織と脂肪との関係は切り離せない。思春期に入って性ホルモンの産生が高まってくると、胸腺はじめリンパ組織のほとんどがその影響を受け、加齢退縮の引き金が引かれる。ヒトでは思春期を過ぎると胸腺はその免疫学的な役割をほとんど終え、退縮の一途をたどり、後に残った細網組織のほとんどが脂肪化してしまう(図11)。ここで興味深いのは、後に残った細網細胞¹¹⁸⁾をはじめとするストローマ細胞自体もステロイドホルモンに対する受容体を持つのか否かという問題である。春木ら¹¹⁹⁾によると、胸腺におけるエストロゲン受容体を持つ主体は胸腺リンパ球ではなく、むしろ細網性上皮細胞である。このことは、胸腺の退縮と脂肪化が一元的に起こっているのではなく、性ホルモンの影響が胸腺のリンパ球にも微小環境にも多元的に起こる可能性を示唆している。

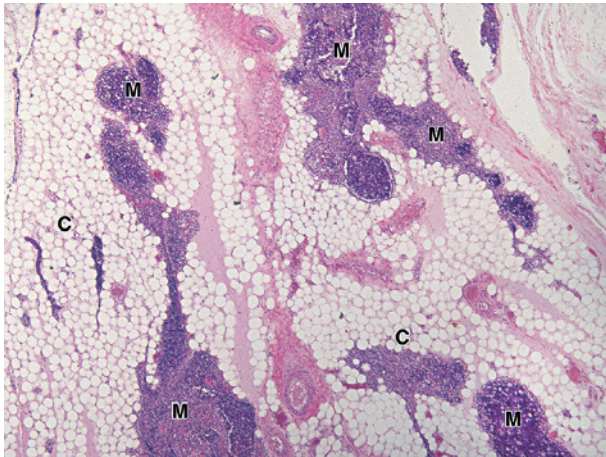


図 11 二十歳前後の女性の正常胸腺。
髄質 (M) のみが存在するが、皮質 (C) はほとんど退縮して脂肪組織で置き換えられている。(Ezaki, 2014 より引用)²⁾

表 6 女性に多い自己免疫病。

主な疾患	女性における発症率 (対男性比) *
全身性狼瘡性紅斑 (SLE)	9 ~ 10
高安動脈炎	10
シェーグレン症候群	14
線維筋痛性症候群	7
全身性硬化症	3 ~ 9
リウマチ様関節炎	5
多発性筋炎/皮膚筋炎	2.5
バセドー病	4 ~ 7
橋本甲状腺炎	10 ~ 20
重症筋無力症	2

* 参考文献:「内科学」, 第 8 版 (杉本恒明, 小俣政男, 水野美邦総編集), 朝倉書店, 東京 (2003) ほか (Ezaki, 2014 より引用)²⁾

6. 性差のある疾患：女性に多い自己免疫病，一次慢性リンパ浮腫

一般に自己免疫病の多くになぜ性差があるのか、本当に不思議である (表 6)。もともと、免疫応答自体も女性の方が男性よりも反応性が高いのだが、Ahmed ら¹²⁰⁾によるとこれらの性ホルモンの効果はほとんどが胸腺、つまり T 細胞を介して働くという。しかも、末梢での免疫応答では免疫調節性 T 細胞が性ホルモンに対する感受性が最も高い。

我々の実験ではマウスの胸腺重量に対する影響で判断すると、副腎皮質ステロイドホルモンが最も退縮効果が強く、それに続いて女性ホルモン (エストロジェン)、最も効果の弱かったのが男性ホルモン (テストステロン) であった。しかし、これらのホルモンが持つ実際の標的はどうも異なっているらし

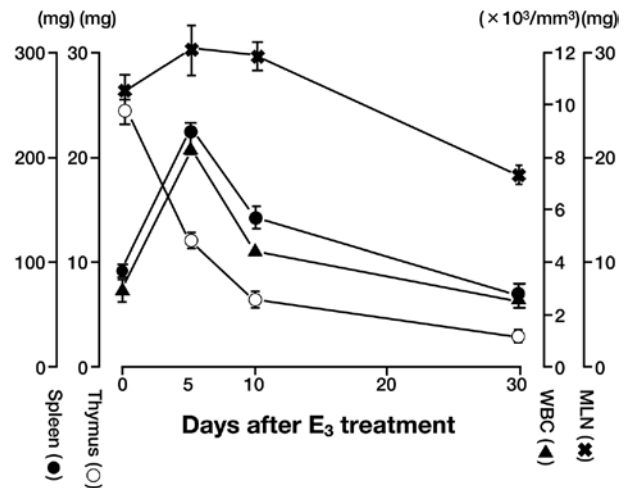


図 12 免疫系に対するエストロール (E3) の影響。
成体雄マウスに E3 (10 mg) を腹腔内注射後に経時的に胸腺 (○)、脾臓 (●)、腸間膜根部リンパ節 (MLN: X) の各重量、および末梢血白血球数 (WBC: ▲) を測定したもの。E3 投与後 5 日目で胸腺は急速に退縮したが、脾臓と腸間膜根リンパ節の両者の重量および末梢血白血球数は逆に増加した。(Ezaki, 2014 より引用)²⁾

い。まず、副腎皮質ステロイドホルモンは容赦なく末梢の成熟リンパ球はもちろん胸腺細胞そのものにも致命的打撃を与える。しかし、エストロジェンは胸腺リンパ球を直接傷害するのではなく、むしろ胸腺外に叩き出すようである (図 12)。

エストロジェンの中でも特に興味深いのは、女性ホルモンとしては最も生理活性の低いエストロール (E3) である。ここに不思議がある。E3 はエストラジオール (E2) やエストロン (E1) に比べると、女性ホルモンとしての本来の標的 (つまり生殖器官系) に対する作用は極めて弱い (1/10~1/100) が、リンパ組織や本来の標的以外の細胞・組織に対しては、両者に決して劣らないか、または両者が持たない別の作用も持っている^{16)121)~123)}。したがって、母児相関によって E3 が妊娠末期に急激に母体内で増産されるのは、母体の免疫機能と妊娠の継続を維持するだけではなく、胎児の諸器官・組織の分化・発育を増進させていると思われる (表 7)。このようなエストロジェンの作用は、ビタミン A やビタミン D などの脂溶性ビタミンや甲状腺ホルモン、あるいは他のステロイドホルモンなどと同様に、核内受容体に結合し活性化させることによって、極めて多くの遺伝子転写を調節しているため、生体にとって強い効果をもたらすと考えられる。これらの脂質はいわゆるステロイド環などの共通の基本的化学構造が

表7 エストロゲン (E3) の生体内での多彩な標的に対する想定される影響.

標的	作用・影響*
生殖系器官 (本来の標的)	↑: 増殖・成熟 (機能促進)
リンパ系組織	
・胸腺	退縮 (胸腺細胞を胸腺外に排導する)
・造血組織: 骨髄など	↑: 造血 (エリスロポイエチン, GM-CSF の産生) ↑: 血小板因子の産生
結合組織	
・線維芽細胞	↑: 細胞外基質の合成 (ヒアルロン酸など) ↓: 線維合成
・血管内皮細胞	↑: 血管成長 ↑: 透過性
・マクロファージ	↑: 細網内皮系の貪食活性 ↑: 組織内 MMP-9 など
・ナチュラルキラー細胞	↑: キラー活性
・肥満細胞	↑: 脱顆粒 (ヒスタミン・セロトニンの放出)
代謝系	
・骨代謝	↓: 破骨細胞 (→骨粗鬆症の予防) ↑: 骨芽細胞
・脂質代謝	↑: 血中コレステロール・トリグリセライド ↓: LDL 酸化 (→動脈硬化の抑制)
・肝細胞	↑: 増殖 ↑: α-フェトプロテイン合成 (肝細胞の幼若化?) ↓: アルブミン合成
・顎下腺	↓: 導管上皮細胞による EGF 産生
中枢神経系	↑: 脳の性分化 ↓: アミロイド産生 (→アルツハイマー病の抑制)

*我々のデータならびに一般的教科書による。(Ezaki, 2014 より引用)²⁾

あって、それぞれの末端基にわずかな違いを持つだけでその作用が正反対になったりもする不思議な物質である。このようにみていくと、少しずつ免疫疾患における性差の問題がエストロゲンによる影響の幅広さを垣間見ることによってみえてくるような気がする。これに対して、男性ホルモンは幼若な B 細胞に対して作用する¹²⁴⁾。ニワトリ卵をテストステロン液に漬けることによって作製される (chemical bursectomy) B 細胞欠損動物モデル¹²⁵⁾は有名である。

今後ますます、性ホルモンと加齢変化、性ホルモンとリンパ系との直接的な関係が解明されることを心から願いたい。

付録：リンパ管・リンパ節の走行分布の 4 原則

これまで述べてきた通り、血管の分布していない組織 (上皮組織, 角膜, 軟骨組織, 歯の硬組織など) にはリンパ管は当然分布しないが、血管の分布はあってもリンパ管が存在しない組織や器官がある。例えば、肝臓, 腎臓, 乳腺, 脾臓などの実質性臓器では小葉間結合組織内や被膜にはリンパ管の分布をみるが、実質内にはリンパ管はみられない。さらに、

毛細リンパ管網は毛細血管網とはある程度距離を置いた部位にしか存在せず、組織や器官を離れるようになったやや太めの集合リンパ管のレベルになって初めて血管に伴って走る。

その他、臨床面、特に悪性腫瘍の外科的治療において極めて重要なリンパ管系に関する法則がある。それは、既に半世紀以上前に忽那¹⁹⁾が、「リンパ管の走行分布についての 3 原則」として謳っている。

原則 1：人体においてすべてのリンパ管は静脈への合流前に必ず 1 つまたはそれ以上のリンパ節を通過する。(介在律)

原則 2：リンパ流は末梢より中枢方向に向かって一方向のみに流れる。(伝導律)

つまり、集合リンパ管以降のリンパ管には弁が存在するため、正常時において、決して所属を異にするリンパ節に注いだり、また逆流したりすることはない。

原則 3：人体の正中線近くにおいては、リンパ管はそれが表在であろうと深部であろうと左右吻合する。(正中交叉現象)

これらに加えて、もう一つの重要な点を加えて、

敢えて「リンパ管・リンパ節の走行分布の4原則」として提唱したい。つまり、

原則4：リンパ管は再生するが、リンパ節は生涯の間その原基数は一定で、一度郭清すると再生しない。(リンパ節定数律)

既述の通り、小谷によれば、リンパ節は脾臓と同様に発生途上からもともと数が決まっているという。現在、感染や癌転移に対する対策として、リンパ節の再生の研究が脚光を浴びているが、リンパ節自体は一度取り去ると再生はしない。このことは、悪性腫瘍のリンパ節郭清の術式について、臨床家にとっては極めて重大な関心事となる。最近、人工リンパ節を作製する試み¹²⁶⁾もあるが、自然のリンパ節同様の確実な成功例を未だにみない。

以上、臨床とも深く関連する「リンパ管・リンパ節の走行分布の4原則」として再認識して頂くことで、今後の臨床活動や研究の発展のための参考の1つとなることを祈りたい。

おわりに

リンパ管研究は今や、基礎医学と臨床医学の両面から、正に新しい時代を迎えている。それを確実にしているのが、リンパ管のイメージング技術の飛躍的な進歩である¹²⁷⁾¹²⁸⁾といっても過言ではない。リンパ管の発生過程の足取りとそのメカニズムを理解することによって、今後ともリンパ管の機能とその生理学的意義、免疫学的意義、腫瘍学的意義が少しずつでもおのずと理解されよう。そして、我々の体内

において、血管系を上水道に例えるならば、リンパ管系はまさに下水道に当たる。忘れてならないのは、ライフラインとして命と直結している血管系に対して、リンパ管系は緊急性はないものの、これら下水道が詰まって上手く流れなくなると、とたんに生命活動が成り立たなくなってしまうことである。つまり、「病気が発症するのも、治癒するのも、すべて局所のリンパ管を含む微循環系次第である」といっても過言ではない。この言葉とともに、本稿が今後の基礎医学と臨床医学の発展に少しでも役に立つことを願う。

不思議はどこにでもある。ここに提示した話題は筆者らがリンパ系の研究にのめり込み始めた頃からずっと頭にあったものである。それからもう随分と年月が経ってしまった。なんでこれが不思議？という人もいると思うが、こんな古い話にでも、一人でも1か所でも興味を持って頂ければ幸いである。異論、反論をお寄せ頂ければ、これまた幸いである。

謝 辞

本研究をまとめるに当たって、長年の間たくさんの方々のご協力・ご支援を受けた。ここに心より感謝申し上げます。特に、当教室の仲間である故森川俊一君、清水一彦君、北原秀治君、菊田幸子君、森島正恵君、および故山崎康子氏、佐川弘美氏、元丸佳恵氏、中田和子氏、佐藤伊桜里氏に心より感謝いたします。

利益相反：開示すべき利益相反はない。