

令和元年6月25日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20286

研究課題名(和文) 口腔粘膜上皮シートを用いた経口的移植手技による傷害声帯治療法の確立

研究課題名(英文) Transoral grafting for vocal fold scarring using epithelial sheet of oral mucosa

研究代表者

深堀 光緒子 (Fukahori, Mioko)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：50529310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：声帯癒痕や声帯溝症は、声帯層構造の変化による不可逆的な音声障害を来しうる病態であり確立された治療方法はない。本研究では、これらの難治性疾患に対する治療を目的に、口腔粘膜上皮シートを用いて経口的移植手技による声帯層構造の再生を目指した。口腔粘膜小片より上皮細胞を分離培養し、上皮細胞シートを作成した。癒痕声帯モデルの癒痕除去後に直達喉頭鏡下に上皮シートを移植した。移植声帯は正常声帯に近い声帯形であり、粘膜波動が観察された。発声に有利な声帯の物性が再生したことを示唆する結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト声帯は、組織学的に粘膜上皮、粘膜固有層、筋層の3層構造から成り、その層構造と物性は良好な音声にとって重要である。声帯癒痕や声帯溝症は、声帯層構造の変化による不可逆的な音声障害を来しうる病態であり確立された治療方法はない。本研究では、これらの難治性疾患に対する治療を目的に、口腔粘膜上皮シートを用いて経口的移植手技による声帯層構造の再生を目指した。口腔粘膜小片より上皮細胞を分離培養し、上皮細胞シートを作成した。癒痕声帯モデルの癒痕除去後に直達喉頭鏡下に上皮シートを移植した。移植声帯は正常声帯に近い声帯形であり、粘膜波動が観察された。発声に有利な声帯の物性が再生したことを示唆する結果であった。

研究成果の概要(英文)：Scarred vocal folds result in irregular vibrations during phonation due to stiffness of the vocal fold mucosa. To date, a completely satisfactory corrective procedure has yet to be achieved. The purpose of this study is to regenerate vocal fold mucosa with the epithelial sheet consisted of autologous oral mucosal cells by the technique of transoral transplantation. Laryngeal endoscope was inserted orally under general anesthesia with endotracheal intubation, the unilateral membranous portion of the vocal fold was resected according to the cordectomy type II method. The resected area was immediately covered with the fabricated epithelial sheet using forceps and fibrin glue. Laryngeal stroboscopy revealed regular but slightly small mucosal waves at the transplanted site. The regenerated vocal fold mucosa on the transplanted portion was morphologically similar to that of the normal side.

研究分野：喉頭科学

キーワード：声帯癒痕 声帯粘膜再生 口腔粘膜上皮培養 傷害声帯治療 経口的移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト声帯は、組織学的に粘膜上皮、粘膜固有層、筋層の3層構造から成る。声帯の粘弾性や粘膜振動において重要なのは、声帯のカバーになる粘膜上皮およびヒアルロン酸に富む粘膜固有層浅層である。しかし、声帯の手術操作や炎症後に生じる声帯癒痕や加齢変化で生じる声帯溝症では、声帯層構造に不可逆性の異常を来している。声帯粘膜の粘弾性は低下し発声時の粘膜波動が不規則あるいは消失するため、硬起性あるいは気息性の嘔声となり日常生活でコミュニケーション障害を生ずる。治療には、声帯筋層内への自家脂肪注入術や種々の増殖因子等を用いた声帯粘膜固有層内への注入術が報告されているが、十分な音声改善が得られていない。これらの手技の原理は、粘膜固有層や筋層の容量増加もしくは声帯自体の内方移動により、発声時の声門間隙を狭くし声帯振動を獲得させようとするものである。しかし、単なる粘膜上皮下層での容量増加では、声帯粘膜上皮の萎縮あるいは肥厚および粘膜固有層の癒痕は改善されず、発声時の良好な粘膜波動を得ることができない。一方、口腔粘膜を自家移植した報告もあるが、口腔粘膜上皮は正常声帯の粘膜上皮に比べて重層扁平上皮が厚く不均一であることに加え、移植後に生着しにくいという点で、声帯への移植材料としては不向きであるといえる。本研究は、声帯癒痕や声帯溝症に対する治療を目的に、口腔粘膜上皮シートを用いた経口法での声帯移植手技の確立と声帯層構造の再生を目指している。

2. 研究の目的

傷害声帯の声帯癒痕や声帯溝症に対する治療を目的に、口腔粘膜上皮シートを用いた経口的移植手技による声帯層構造の再生を目指す。

3. 研究の方法

- (1)組織の採取：口腔粘膜を3×3mm採取し、粘膜上皮と粘膜上皮下組織に分離する。
- (2)上皮細胞と線維芽細胞の回収：採取した粘膜上皮組織をDispase溶液に60分間反応(37℃)させた後、実体顕微鏡下に上皮層を固有層から剥離した。得られた上皮組織をTrypsin-EDTAで8分間反応(室温)させ、実体顕微鏡下で上皮細胞を分散させsingle cellとする。遠心分離を行い上皮細胞のみを回収する。採取した粘膜上皮下組織を細切しシャーレに接着させたのち、培養液(DMEM+10%自己血清)を加えて線維芽細胞を初代培養する。その後、数回の継代を行い回収する。
- (3)共培養による培養重層上皮の作製：Cell Culture Insert (Becton Dickinson)を用いて、上層に回収した上皮細胞、下層に線維芽細胞を播種し共培養を行う。上層の培養液にはDMEM/F12、上皮細胞増殖因子、自己血清、抗生剤・抗真菌剤などを含む溶液を、下層の培養液にはDMEM、自己血清、抗生剤・抗真菌剤などを含む溶液を使用する。約2週間共培養を行いコンフルエントになったのち、4日間の気相・液相培養を行う。セルスクレイパーを用いて培養上皮組織を採取する。
- (4)組織採取を行った移植群に対して、全身麻酔下に直達喉頭鏡を経口的に挿入し、硬性鏡を用いて声帯を明視下とする。
- (5)声帯癒痕を確認し、メスを用いて癒痕を切除する。
- (6)直径15mmのフィルム上に、作製した上皮シートの上皮基底細胞が上面となるよう付着させ、喉頭用鉗子で把持し声帯切除部へ移動させる。
- (7)切除部へ上皮シートをフィルムごと軽く押し付け(約10分間)培養組織が声帯側へ残るようにフィルムのみをゆっくりと剥がす。フィブリン糊で固定する。
- (8)移植1週間、1ヶ月、2ヶ月後、6ヶ月後に内視鏡による声帯の観察を行い、声帯形の経時的な変化を記録する。
- (9)移植後1ヶ月、上皮化が完成すると考えられる移植後2ヶ月、癒痕形成が完了すると考えられる6ヶ月のタイミングで喉頭を摘出する。
- (10)摘出喉頭を用いて、ストロボスコープを用いた吹鳴実験による声帯粘膜波動の評価と音響分析を行う。移植側声帯と正常声帯および声帯癒痕モデルとの比較を行う。
- (11)摘出喉頭を10%ホルマリン固定し、脱水、パラフィン包埋し、前額断大切片標本作製する。HE染色、アルシアンブルー染色、エラスティカ・ワンギーソン染色、酵素抗体法による免疫組織化学的に検討する(サイトケラチン、ビメンチン、Eカドヘリン)。
- (12)移植側声帯の粘膜上皮および上皮下組織の層構造を観察し、経時的な組織構造の変化を検証する。また移植声帯と正常声帯および声帯癒痕モデルとの比較を行う。

4. 研究成果

採取した口腔粘膜小片より上皮細胞を分離培養し、上皮細胞シートを作成した。作製した上皮細胞シートは1~2層の細胞で構成され、免疫組織学的にサイトケラチン陽性、ビメンチンは陰性であった。癒痕声帯モデルの作製は、声帯膜様部全長にわたり声帯筋表層まで粘膜を切除し、3~6ヶ月経過させた。

気管挿管を行い、全身麻酔下に、喉頭鏡を挿入し喉頭を明視下とした。まず声帯癒痕をメスで切除した。直径15mmのフィルム上に、作製した上皮シートの上皮基底細胞が上面となるよう付着させ、喉頭用鉗子で把持し声帯切除部へ移動させた。切除部へ上皮シートをフィルムごと軽く押し付け、培養組織が声帯側へ残るようにフィルムのみをゆっくりと剥がした。上皮細胞

シートが声帯切離面へ付着したことを確認し、固定を十分なものとするためフィブリン糊を塗布した。3ヶ月、6ヶ月後に喉頭を摘出した。

喉頭前額断の観察で、移植声帯は正常声帯に近い声帯形であった。声帯粘膜は正常側と同様に2~4層の上皮と粘膜固有層を有した。アルシアンブルー染色では粘膜固有層の染色が少なかったが、瘢痕除去のみを行った非移植声帯と比較すると正常声帯に近い結果であった。粘膜固有層の膠原繊維が多く弾性線維が少ない結果であった。

摘出喉頭の吹鳴実験において、ストロボスコープでは振幅はやや小さいものの粘膜波動が観察された。発声に有利な声帯の物性であることを示唆する結果であった。

口腔粘膜から分離培養し作製した上皮細胞シートを、経口的に声帯へ移植する手技は問題なく可能であった。移植後の安定性、安全性に関して検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。