

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16907

研究課題名（和文）FIB/SEMトモグラフィー法、CLEM法による声帯の三次元的微細構造の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the three-dimensional fine structure of the vocal fold using FIB/SEM tomography and Correlative Light and Electron Microscopy

研究代表者

佐藤 公宣 (Sato, Kiminobu)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30738852

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,100,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト声帯は声帯上皮、粘膜固有層、声帯筋、軟骨から構成される複雑な組織であり、本研究では最新の電子顕微鏡技術であるFIB/SEMトモグラフィー法と光相関電子顕微鏡法（CLEM法）を用いて声帯の三次元的微細構造を解明する事を目的とした。ヒト喉頭の組織切片を用いたCLEM法での観察により、これまで不明であった声帯粘膜の各移行部の微細構造を明らかにした。また、声帯の疾患の一つであるラインケ浮腫の組織切片を用いたCLEM法での観察により、疾患の病態を微細構造レベルで明らかにした。正常な声帯組織のみならず、疾患モデルの観察へと応用でき、今後は実験動物や様々な疾患モデルへの応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喉頭の機能は発声、嚥下、呼吸であり、喉頭は人間の生命維持に必要な臓器である。喉頭の中でも声帯はその中心的な部位であり、その正常な機能と関連した疾患（良性・悪性疾患）の病態の解明が求められる。喉頭は様々な硬組織・軟組織を含む複雑な臓器であるため、三次元的微細構造については不明な点も少なくなかった。本研究では、最新の顕微鏡技術を用いて喉頭の機能形態と関連した疾患の病態を明らかにした。本研究は喉頭の正常な機能形態と関連した疾患の病態の解明に今後も大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Human vocal fold is composed of epithelium, lamina propria, vocal fold muscle and cartilage. The aim of this study is to clarify the three-dimensional fine structure of vocal fold using FIB/SEM tomography and Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM) technique. In this study, we clarified the fine structure of the transitional area between lamina propria and cartilage of the human vocal fold using CLEM technique. The additional study revealed the fine structure of the Reinke's edema and its pathogenesis. We applied the technique to observe fine structure of normal and disease vocal fold and the technique is expected to apply for animal experiment model and various disease of the vocal fold in further study.

研究分野：喉頭、声帯

キーワード：喉頭 声帯 CLEM法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト喉頭は発声、嚥下、呼吸が主な役割であり、喉頭は人間の生命維持に関わる臓器である。喉頭の中でも声帯は中心的な存在であり、その機能の解明が形態学的な側面から求められる。

ヒトは粘弾性を持った振動体としての声帯を維持し発声することで、一生コミュニケーションを取ることができる。一方、加齢や疾患で声帯の物性が変化することで発声障害を来す。声帯の再生・組織修復の機能や疾患における病態が解明されれば、臨床に大きく寄与することができる。

これまで当研究チームは、ヒト喉頭の機能形態学的研究を継続している。振動体としての粘弾性を持った声帯粘膜の恒常性の維持と声帯組織の再生、更に声帯疾患における病態のメカニズムの解明は大きな課題の一つであった。

これまで組織の微細構造の研究は電子顕微鏡による観察が主であった。近年、電子顕微鏡が発達し、三次元立体構造の観察が可能になってきた。FIB/SEM トモグラフィー法 (Focus Ion Beam/Scanning Electron Microscopy tomography) は Focus Ion Beam を用いて試料を SEM スライスから三次元再構築することが可能な観察手法である。また光電子相関顕微鏡法 (Correlative light and electron microscopy: CLEM 法) は光学顕微鏡レベルでの倍率から電子顕微鏡レベルでの解像度までの連続した観察が可能な方法であり、周囲組織との関係を比較しながら高解像度で二次元・三次元微細構造を観察できる手法である。

本研究は、最新の顕微鏡技術を用いてこれまで観察が困難であった声帯の組織・細胞を二次元・三次元微細構造で観察し、ヒト声帯を機能形態学的に解明することを目的とした。

### 2. 研究の目的

声帯の各部位(声帯上皮、粘膜固有層、声帯筋、軟骨、黄斑部)は非常に限局された組織であり、ヒト声帯組織の微細構造の俯瞰的な観察には限界があった。また実験動物においては、声帯は非常に小組織であるため、実験モデルとしての観察が困難な側面があった。

本研究はヒト声帯の微細構造を FIB/SEM トモグラフィー法、CLEM 法により声帯組織あるいは各組織の移行部の三次元微細構造を観察し、ヒト声帯の機能形態学的研究を行うこと、更に声帯の基礎研究における形態学的な評価方法としてのモデルの確立を目的とした。

### 3. 研究の方法

手術、剖検で得られたヒト喉頭を用いて、上記の電子顕微鏡技術を用いて声帯の二次元・三次元微細構造を観察した。本研究では、正常なヒト声帯のみならず、声帯疾患を対象とし形態学的に病態を解明した。

### 4. 研究成果

ヒト喉頭の組織切片を用いた CLEM 法での観察により、これまで不明であった声帯粘膜の各移行部(軟骨、粘膜固有層、黄斑部)の微細構造を明らかにした。ヒト声帯の粘膜固有層の線維は前黄斑・後黄斑へと漸次移行している像が観察された。また、これまで報告されていた声帯黄斑の細胞(vocal fold stellate cell-like cell, fibroblast-like spindle cell, cobble stone-like polygonal cell)と周囲の細胞外マトリックスとの関係が組織切片から観察された。CLEM 法によるヒト喉頭の微細構造の観察は、これまで詳細な観察が困難であったヒト声帯の移行部を組織レベルから観察でき、今後の声帯の機能形態学的研究の発展に大きく寄与すると考えられた。

声帯疾患としては、良性疾患の一つであるラインケ浮腫の組織切片を用いた CLEM 法での観察

により、声帯内の微小血管の pericyte が減少していたことから、血管透過性の亢進が病態に関わる可能性を微細構造レベルで明らかにした。

FIB/SEM トモグラフィー法においてはヒト声帯組織を FIB で試料切削し、声帯黄斑の vocal fold stellate cell をコントラストが得られた状態での連続スライスの画像化に成功した。連続スライスの画像では、vocal fold stellate cell において従来から報告されていた脂肪滴や細胞小器官の像が観察された。今後は画像解析ソフトを用いて、画像の三次元的構造の再構築を行い、細胞の機能形態の解明を目指す。

本研究によるヒト声帯組織の微細構造の解明は、正常な声帯組織のみならず、疾患モデルの観察にも応用され、ヒト声帯の様々な疾患モデルの新たな観察手法として期待された。また今後は、実験動物の喉頭などこれまでに観察が困難であった小組織などへの更なる応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kiminobu Sato, et al	4. 巻 7
2. 論文標題 Three-dimensional fine structures of the maculae flavae of the human vocal fold using correlative light and electron microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investigative Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 1943-1950
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002//lio2.950	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kiminobu Sato, et al	4. 巻 134
2. 論文標題 Pathogenesis of Reinke's Edema of the Vocal Fold	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The laryngoscope	6. 最初と最後の頁 1785-1791
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lary.31084.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kiminobu Sato
2. 発表標題 Three-dimensional fine structures of the maculae flavae of the human vocal fold using correlative light and electron microscopy
3. 学会等名 the 102nd ABEA annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kiminobu Sato
2. 発表標題 Pathogenesis of Reinke's Edema of the Vocal Fold
3. 学会等名 the 103rd ABEA annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------