

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592519

研究課題名(和文)電気刺激による内喉頭筋の再運動化と筋萎縮の抑制に関する研究

研究課題名(英文) Effects of electrical stimulation on remobilization and preventing atrophy in intrinsic laryngeal muscles.

研究代表者

片田 彰博 (KATADA, Akihiro)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：90281899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、喉頭麻痺によって障害された呼吸機能や耐運動能を回復させるための電気刺激の有効性と安全性について検討した。イヌ両側喉頭麻痺モデル動物を作成し、声門開大筋の表面に刺激電極を留置して、埋め込み型電気刺激装置に接続した。神経再支配が完了するまでは電気刺激で誘発される声帯運動が非常に小さかった。しかし、神経再支配が完了すると電気刺激で誘発される声門開大運動が大きくなり、正常とほぼ同等の運動が観察された。誘発される声門開大運動によって喉頭麻痺モデル動物の呼吸機能や耐運動能がほぼ正常の状態に回復した。長期間の電気刺激をおこなったが、誤嚥は誘発されず、筋線維の障害もほとんど観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to evaluate the long-term efficacy and safety of a new generation stimulator in restoring ventilation and exercise tolerance in case of bilateral laryngeal paralysis. Bilateral stimulation electrodes were placed between the cricoid cartilage and laryngeal abductor muscles. Recurrent laryngeal nerves were sectioned and repaired bilaterally. Stimulus parameter was fixed at 40Hz, with duty cycle 4 seconds on, 4 seconds off. During the denervation phase, PCA stimulation produced only nominal abduction. During the reinnervation phase, synkinetic reinnervation resulted in a narrowed passive airway and paradoxical glottic closure during hypercapnea. Animals were stridorous and could walk for only 1-2 minutes. Bilateral PCA stimulation increased glottal area, equaling that of a normally innervated animal. Exercise tolerance was also normal. There was no evidence of aspiration. Histological findings demonstrated focal granulation tissue and intact muscle fibers.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医学 神経科学 喉頭科学 電気刺激

1. 研究開始当初の背景

喉頭は生命維持に必須である呼吸、嚥下、気道防御などに関与する重要な臓器である。喉頭運動を制御する内喉頭筋は、迷走神経から分枝する反回神経の支配を受けている。反回神経が外傷、悪性腫瘍、外科手術などによって障害されると喉頭麻痺がおり、発声運動、嚥下運動、上気道反射が障害され、患者のQOLは著しく低下する。近年、麻痺している筋に電気刺激を与えることで筋収縮を誘発し、運動機能を回復させる機能的電気刺激が脳神経外科、整形外科、泌尿器科などの領域で注目されている。我々は、機能的電気刺激を利用して、反回神経麻痺により障害された呼吸、発声、嚥下などの喉頭機能を正常に近い状態に回復させる新しい治療法の確立を最終目標とし、その治療効果や安全性を検証するための基礎的な研究をすすめてきた。

まず我々は、喉頭運動の誘発に必用な機能的電気刺激の至適刺激のパラメーターを明らかにした。さらに、反回神経切断による一側性の喉頭麻痺をもつネコに発声運動を誘発し、麻痺側の声門閉鎖筋に電気刺激を加えることで発声機能が改善することを確認した。

またラットを用いた組織化学的実験では、機能的電気刺激の持つ筋萎縮抑制作用に注目し、反回神経切断後に生じる筋萎縮が電気刺激によって抑制され、正常とほぼ同等の筋線維の形態が保たれること明らかにした。また、脱神経後に生じる筋萎縮についてはアポトーシスが関与し、小胞体ストレスをトリガーとしたユビキチン/プロテアソーム系の活性化が主な経路であると考えられている。我々は、脱神経によって小胞体ストレスが増加し、小胞体ストレスの回避に重要な valosin-containing protein の発現が低下すること、さらに脱神経後の電気刺激によって valosin-containing protein の発現が増加し、小胞体ストレスが軽減されアポトーシスが抑制されていることを確認した。

近年、体内に埋め込むことのできる小型電気刺激装置と長期間体内に留置可能な電極が開発されている。そこで、イヌを用いてこの新しい刺激装置と電極が喉頭運動機能の回復にどの程度有効なものとなるのか検証をおこなった。その結果、電気刺激がより効果的な喉頭運動を誘発するためには、ある程度の筋組織が保たれていること、さらにその筋が再支配を受け、神経筋接合部の構造が保たれていることが重要であることを明らかにした。

2. 研究の目的

これまでの研究から、1) 電気刺激によっ

て麻痺している喉頭に声門閉鎖運動や声門開大運動を誘発することができること、2) 電気刺激によって脱神経後に生じる筋の廃用性萎縮を防ぐことができること、3) 体内埋め込み型刺激装置と微小電極が開発され、長期間にわたり電気刺激を与え続けられることが示されている。しかし、これらの実験結果は電気刺激によって起こる現象の記述にとどまっており、これらの作用発現に関するメカニズムや長期間の電気刺激が筋線維にどのような変化をもたらすのかは、不明である。

また、反回神経は末梢神経であり神経吻合によって比較的容易に再生し、内喉頭筋の再支配が確立する。しかし、内喉頭筋に再支配が完成したとしても、喉頭機能は十分に回復しない。これは再支配の際に本来の筋支配とは異なる過誤支配が起こるためである。Zealearらは、電気刺激が再支配の選択性に影響することを報告しているが、そのメカニズムについても不明な点が多い。

本研究では、麻痺後の喉頭運動の回復に対する電気刺激の有効性と安全性を確認するために、埋め込み型電気刺激装置を用いて長期間にわたる電気刺激をおこなう。さらに、電気刺激が内喉頭筋の筋線維におよぼすダメージや内喉頭筋再支配の選択性、喉頭機能回復との関連性について検討する。

3. 研究の方法

本研究では、喉頭運動誘発に関する電気刺激の有効性、安全性に対する検証と中心におこない、さらに誘発された運動が麻痺によって障害された呼吸、発声、嚥下などの機能を改善させることができるかどうかを検討する。そのために、大型でヒトに近い喉頭の形態と機能を持つイヌを用いて実験をおこなう。

喉頭麻痺モデルとして一側もしくは両側の反回神経を切断し再吻合は行わない群（脱神経群）と、反回神経切断後に神経の即時再吻合をおこなう群（再支配群）を作成する。これらのイヌ喉頭麻痺モデルに埋め込み型電気刺激装置を留置し、長期間にわたって麻痺している内喉頭筋に電気刺激を継続的におこなう。安静呼吸時、および二酸化炭素負荷による呼吸促迫時、そして電気刺激時の声帯運動を口腔より挿入した内視鏡をもちいて観察し、ビデオに記録する。得られた画像はコンピュータで画像処理をおこない、電気刺激によって誘発される声帯運動を定量的に解析する。さらに、誘発された声帯運動によって呼吸機能や運動機能が正常に近い状態まで回復しているのかどうか確認する。

また、電気刺激実験が完了した段階で喉頭

を摘出し、筋組織を確認するための切片を作成して、長期間にわたる電気刺激が筋線維に及ぼす影響についても検討する。

4. 研究成果

(1) 声門開大筋刺激による呼吸機能の改善
この研究には両側声帯麻痺イヌモデルを用いた。埋込型の刺激発生装置に接続した脳深部刺激用電極を声門開大筋である後輪状披裂筋と輪状軟骨との間に留置した。このモデル動物では両側の反回神経を一旦切断し、直ちに断端を再吻合することで内喉頭筋に過誤支配を誘導した。切断・再吻合から約3ヶ月経過すると内喉頭筋には過誤支配が完成し、声帯は単に麻痺して固定しているのではなく、吸気時に声帯が内転する奇異性声帯運動が観察されるようになる。この時期からは、運動負荷やCO₂投与によって呼吸運動が増大すると著明な喘鳴を生じ、経皮的酸素飽和度が著しく低下するようになる。CO₂投与によって呼吸を増大させた状態で、電気刺激による声門開大運動を喉頭直達鏡下で観察したところ、声門面積は非刺激時の3倍以上の増加を示した。これは、正常吸気時の声門面積とほぼ同等であった。

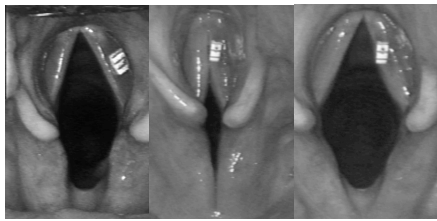


図1

図1：喉頭鏡で確認した吸気時の声門面積
A：正常の動物に5%CO₂を投与した場合
B：反回神経の切断・吻合から3ヶ月後に、5%CO₂を投与して電気刺激を行わなかった場合。
C：反回神経の切断・吻合から3ヶ月後に、5%CO₂を投与して電気刺激を行なった場合。

誘発される声門開大運動の有効性の指標として、モデル動物をトレッドミル上で走行させる運動負荷テストをおこなった。経皮的酸素飽和度と心拍数をモニターし、3分毎にトレッドミルの速度を段階的に上げてゆき、経皮的酸素飽和度が90%以下になった時点で走行運動を中止する運動負荷プログラムを施行した。刺激発生装置をoffにした状態では著明な喘鳴が観察され、低速での歩行も困難な状態となり運動許容時間は著しく低下した。刺激発生装置をonにして両側声門開大筋を刺

激すると、吸気時の喘鳴は完全に消失した。さらに、高速走行でも酸素飽和度の低下がほとんどなく、運動機能は正常と同等のレベルまで回復した。

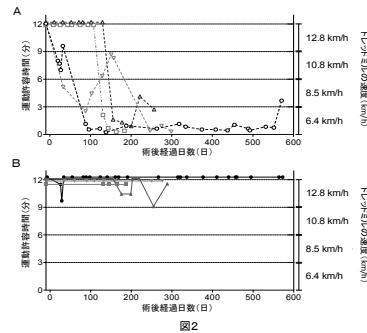


図2

図2. 運動負荷に対する耐性の変化

A：埋め込み型刺激発生装置をOffにした場合の運動許容時間。

B：埋め込み型刺激発生装置をOnにした場合の運動許容時間。

(2) 長期間の電気刺激に対する安全性

この埋込型刺激発生装置は4秒間刺激を加え4秒間休む一定のサイクルで、モデル動物の自発呼吸とは無関係に刺激を繰り返す。したがって、嚥下中に電気刺激が加えられることもあり、嚥下中の声門開大による誤嚥の誘発が懸念される。そこで、電気刺激中の誤嚥の有無を確認するために、嚥下機能検査を施行した。嚥下透視造影検査では、電気刺激が入っていてもバリウムの誤嚥が認められなかった。定期的に撮影した胸部レントゲン写真でも肺炎を示唆する所見は確認されなかった。また、嚥下内視鏡検査による声門の観察では、電気刺激中であっても嚥下時には完全に声門が閉鎖していることが確認された。刺激実験の観察期間が終了した後で、喉頭を摘出し後筋の横断切片を作成して筋の組織学的な変化を検討した。組織学的には電極挿入部の周囲にわずかな肉芽組織の形成を認めたのみであり、電気刺激による筋線維の損傷や変性などの変化は認められなかった。

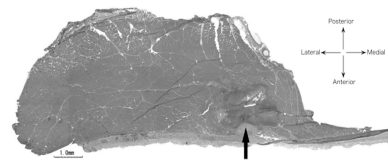


図3

図3. 長期電気刺激後の後輪状披裂筋の所見

電極挿入部(矢印)の周囲にわずかな肉芽組織を認める。

(3) 筋再支配の選択性に与える影響

反回神経を切断した後ですぐに再吻合をおこない、内喉頭筋に神経再支配を誘導することは比較的容易である。しかし再支配が完了したとしても、従来の神経支配とは異なる“過誤支配”となるために正常な喉頭運動は回復しない。今回の研究では、神経再吻合の後に加える電気刺激の刺激頻度を変化させることで、声門開大筋におこる再支配の正確性が変動する現象が観察された。電気刺激の頻度を40Hzにした動物では、10Hzに設定した動物と比較して声門開大筋に誘導された再支配における過誤支配の割合が高くなる傾向が認められた。しかし、そのメカニズムは依然として不明であり、さらなる実験結果の蓄積が必要と考えている。

(4) 発声機能の回復をめざした声門閉鎖筋刺激用電極の開発

反回神経の障害は両側性よりも一側性の頻度が高く、一側性麻痺による発声障害や嚥下障害に悩む患者が非常に多い。そこで、電気刺激により麻痺声帯に声門閉鎖運動を誘発して音声障害を改善させるための基礎実験をすすめた。その第一段階として、声門閉鎖筋である甲状披裂筋を長期間刺激するための埋め込み型電極を作成した。電極は縦8mm、横10mm、厚さ1mmのシリコンシートに、直径1mmの皿状電極を2列に6個配置するデザインとした。甲状軟骨を小さく開窓し、声門閉鎖筋である甲状披裂筋の表面と甲状軟骨との間に電極を留置した。過誤支配がおこっているモデル動物では小さな電気刺激でも正常とほぼ同等の声門閉鎖運動を誘発することができた。さらに、加える電気刺激の強度と誘発される声門閉鎖運動の大きさには比例関係があり、刺激強度を調節することで麻痺側の声帯を望ましい位置に移動させることができた。過誤支配がおこっていないモデル動物では、声門閉鎖運動の誘発により強い電気刺激が必要であり、声帯位置の調節も容易ではなかった。

<引用文献>

①片田彰博：特集“神経をどう扱うか” 再生・再建の工夫 埋込型電気刺激装置による喉頭ペーシング. JHONS 30 : 1493-1496, 10.1, 2014.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Zealear DL, Mainthia R, Li Y, Kunibe I, Katada A, Billante C, Nomura K.: Stimulation of denervated muscle promotes selective reinnervation, prevents synkinesis, and restores function. Laryngoscope 査読有 124 巻, 2014, 180-187, DOI: 10.1002/lary.24454.
- ② 片田彰博: 特集“神経をどう扱うか” 再生・再建の工夫 埋込型電気刺激装置による喉頭ペーシング. JHONS 査読なし 30 巻, 2014, 1493-1496, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2015022728>
- ③ 片田彰博: 平成24年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題 機能的電気刺激による喉頭の動的機能再建に関する研修. 旭川医科大学研究フォーラム 査読なし 14 巻, 2014, 88-90, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2014270551>
- ④ Ota R, Takakusaki K, Katada A, Harada H, Nonaka S, Harabuchi Y.: Contribution of the lateral lemniscus to the control of swallowing in decerebrate cats. Neuroscience. Neuroscience 査読あり 254C 巻, 2013, 260-274, DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.09.036.
- ⑤ 片田彰博: 嚥下医学ペーシックサイエンス 機能的電気刺激の原理と発声・嚥下障害への臨床応用. 嚥下医学 査読なし 1 巻, 2012, 328-334, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2013022634>
- ⑥ 國部 勇, 片田彰博, 野村研一郎, 林達哉, 原渕保明, Zealear DL.: 新しい喉頭麻痺治療への translational research 機能的電気刺激の有効性. 喉頭 査読なし 23 巻, 2011, 71-76, <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2012118969>

[学会発表] (計14件)

- ① 片田彰博, 野村研一郎, 原渕保明: 機能的電気刺激による声帯運動誘発のための電極および刺激発生装置の工夫. 第66回日本気管食道科学会: 11月13-14日, 2014年, 高知.
- ② Nomura K, Katada A, Kunibe I, Harabuchi Y.: Electrical stimulation with an implanted device for vocal fold adduction in unilateral paralyzed larynx. The 18th Joint meeting of the World Association for

Bronchology and Interventional Pulmonology & The International Bronchoesophagology Society (18th WCBIP/WCBE): Apr.13-16, 2014, Kyoto, Japan.

③ Katada A, Nomura K, Kunibe I, Harabuchi Y.: Electrical stimulation induces adduction of immobilized vocal fold with unilaterally paralyzed larynx. The 18th Joint meeting of the World Association for Bronchology and Interventional Pulmonology & The International Bronchoesophagology Society (18th WCBIP/WCBE): Apr.13-16, 2014, Kyoto, Japan.

④ 野村研一郎, 片田彰博, 國部 勇, 原渕保明: 埋め込み形刺激装置を用いた機能的電気刺激による声門閉鎖運動の誘発. 第26回日本喉頭科学会: 3月6-7日, 2014年, 那覇.

⑤ 片田彰博, 野村研一郎, 國部 勇, 原渕保明: 機能的電気刺激を用いた麻痺声帯における声門閉鎖運動の誘発. 第65回日本気管食道科学会: 10月31日-11月1日, 2013年, 東京.

⑥ Katada A, Nomura K, Kunibe I, Harabuchi Y.: Vocal fold adduction induced by electrical stimulation in case of unilateral laryngeal paralysis. The 20th IFOS World Congress: Jun.1-5, 2013, Seoul, Korea.

⑦ Nomura K, Katada A, Kunibe I, Harabuchi Y.: Electrical stimulation with an implanted electrode for vocal fold adduction in unilateral paralyzed larynx. The 134th Combined otolaryngology spring meeting-American Laryngological Association (COSM): Apr.10-14, 2013, Orlando FL, USA.

⑧ 野村研一郎, 片田彰博, 國部 勇, 原渕保明: 埋め込み型電極を用いた機能的電気刺激による声門閉鎖運動の誘発. 第25回日本喉頭科学会: 3月7-8日, 2013年, 横浜.

⑨ Katada A: Laryngeal pacing for reanimation of the paralyzed larynx. The 8th East Asian Conference on Phonosurgery: Nov.30-Dec.1, 2012, Jeju, Korea.

⑩ 片田彰博, 野村研一郎, 國部 勇, 原渕保明: 機能的電気刺激を用いた声帯麻痺モデルにおける声門閉鎖運動の誘発. 第64回日本気管食道科学会: 11月8-9日, 2012年, 東京.

⑪ 片田彰博: シンポジウム: 夢の次世代治療「喉頭の機能回復」-機能的電気刺激の応用-

第74回耳鼻咽喉科臨床学会: 7.5-6, 2012, 東京.

⑫ 片田彰博: 機能的電気刺激による喉頭機能の回復をめざして -麻痺している声帯を動かす-. 第33回東日本音声外科研究会: 4月7日, 2012年, 東京.

⑬ Katada A: Laryngeal pacing -clinical application-. The 16th Japan Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery: Apr.12-14, 2012, Kyoto, Japan.

⑭ 野村研一郎, 片田彰博, 國部 勇, 原渕保明: 機能的電気刺激による声門閉鎖運動の誘発. 第24回日本喉頭科学会: 3月8-9日, 2012年, 金沢.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片田 彰博 (KATADA, Akihiro)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90281899

(2) 研究分担者

國部 勇 (KUNIBE, Isamu)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40321963