

令和元年6月3日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10825

研究課題名(和文) 喉頭麻痺に対する線維芽細胞増殖因子を徐放させた自家筋膜移植術の検討

研究課題名(英文) Evaluation of autologous fascia implantation with control release of fibroblast growth factor for laryngeal paralysis.

研究代表者

永井 浩巳 (Nagai, Hiromi)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：70237486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、喉頭麻痺により萎縮した組織の再生を目的にした実験である。喉頭に入る運動・知覚神経の切断と、導入血管を遮断した動物モデルに対して、増殖因子である塩基性線維芽細胞増殖因子を徐放させた自家筋膜を移植することで、内喉頭筋である外側甲状披裂筋の筋肉の容積を増加させ、筋肉内の微小血管を増加させることが分かった。また、神経の再生にかかわるシュワン細胞の増加も認められた。このことから、この治療で、崩壊した神経・血管機構が再建でき、これが萎縮組織の再生につながると考えている。さらに、この新たにできた神経機構の中核を検索しようと考えているが、実験の遅延により、いまだ、結果を得ていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喉頭麻痺は、声門の閉鎖不全があるため、嘔声や誤嚥が起こる。このことが日常生活の質を低下させることと、誤嚥性肺炎を引き起こし、致死的な症状を起こすこともある。本研究で、神経や血管の支配がなくなった喉頭組織に対して、外的要素(成長因子、足場としての筋膜)を投入することで、周囲の組織の活性などを引き起こし、組織を再生できる可能性を示した。特に、神経麻痺により生じた筋肉の萎縮に対して、筋肉容積の増加、血管・神経網の回復が推測されたことには意義がある。これにより、神経麻痺に対する新たな治療法になりえる研究と考えている。願わくは、この神経支配の中核が解明できれば、さらなる治療の対象疾患の拡大もできる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the regeneration of denervated laryngeal tissue, in which nerves and vessels supplying the laryngeal tissue had been resected. Controlled release of basic fibroblast growth factor and autologous fascia implantation increased muscle volume and the density of microvessels in the atrophied intra-laryngeal muscle. In addition, the distribution of Schwann cells, which is related to regeneration of the neural system, was increased with this implantation. We considered that this treatment facilitated reconstruction and repair of atrophied laryngeal tissue by forming new neuronal and vascular networks. Moreover, we evaluated and identified the parts of the central nerve system involved. However, evaluations are still ongoing because the study period has not ended.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：喉頭麻痺 線維芽細胞増殖因子 ドラッグデリバリー 再生

1. 研究開始当初の背景

喉頭麻痺は、声門の閉鎖不全が起こるため、嚔声や誤嚥を引き起こす。高齢者の場合、嚔声は、努力呼吸を伴うため、他人との会話が億劫となり、必然的に会話を避けるようになる。このことが、他人との関りを減少させ、社会における孤立を招き、認知機能の低下にも繋がる。また、誤嚥は、肺炎を助長する可能性があり、患者の生命の危機を招く。そこで、この声門不全を回復させる治療法を探求する必要がある。従来の喉頭麻痺に対する治療は、声帯を内側に偏移させて、声門間隙を狭くする喉頭形成術、披裂軟骨内転術や、声帯内に自家組織や人工物を注入する声帯内注入術がある。これらの治療は、臨床的に良好な結果を得ているが、萎縮した組織の再生を行っているわけではない。すなわち、喉頭の筋肉の萎縮が進むとその効果は、徐々に低下してしまう。近年、組織再生は、iPS 細胞を筆頭に、万能細胞を用いた治療が脚光を浴びている。しかし、まだ、その供給は不十分であり、オーダーメイド治療とはいかない。そこで Langer らの提唱する、成長因子、足場、細胞の 3 因子を調節することで再生を促すことを考えた。成長因子はすでに、実臨床でも使用されている塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を用いる。しかし、bFGF は生体内での半減期が短いため、ゼラチンハイドロゲルを用いて徐放する。足場は自家筋膜とすることで、移植部周囲の宿主の細胞を利用して、再生に必要な 3 因子を獲得する方法を選択した。これにより、喉頭麻痺の萎縮していく組織を、新たに再生できる治療法になると考えた。

2. 研究の目的

喉頭麻痺の実験動物に対して、bFGF を徐放した自家筋膜移植の効果を検討する。さらに、治療介入によって作成できた新たな喉頭組織における、支配神経の中枢を検索する。

3. 研究の方法

喉頭麻痺モデルを作成する。喉頭を支配する 2 つの神経、反回神経と上喉頭神経をともに切断する。反回神経は再生能力が強いので、焼灼したのちに切除断端を縫縮しておく。上喉頭神経は、反回神経のように縫縮できないため、焼灼したのちに、切断した胸骨舌骨筋を有茎筋弁として、焼灼部に入れ込む。これで、神経再生を阻む。神経切断時に、神経に伴走する下喉頭動静脈、上甲状腺動静脈の枝である上喉頭動静脈も切断する。さらに甲状軟骨の側面、下面、上面も焼灼しておく。これにより、喉頭に入る血管系も遮断する。

移植手術。

神経・血管切断により、組織の萎縮が安定するのに少なくとも 12 週間は必要である。このため、16 週間経過してから、移植治療を行う。移植術は、bFGF をゼラチンハイドロゲルシート(ゼラチンシート)で徐放させた自家筋膜移植群 (bFGF+自家筋膜移植群) bFGF をゼラチンシートに浸透させた群 (bFGF 群) 自家筋膜と薬液を添付していないゼラチンシートを移植した群(自家筋膜移植群) の 3 群とし、これに治療介入していない喉頭麻痺群を加えて、4 群でその効果を比較する。

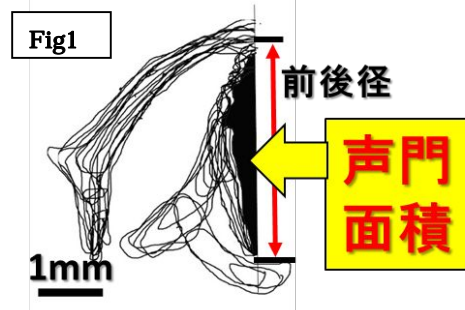
組織学的検討。

治療介入後 12 週間してから、実験動物を麻酔し、声帯運動を確認する。ラットの声帯は小さいため、その運動は評価しにくい。そこで、披裂軟骨の運動を持って代用した。稲木式喉頭鏡を用いて喉頭を展開し、ビデオカメラ(HDR-CX480, Sony)を用いて観察する。その後、CO₂チャンパーを用いて安楽死させる。安楽死後、速やかに喉頭を摘出し、4%ホルムアルデヒドで固定し、十分固定されたのちに、パラフィンで包埋する。検体は水平断に 200 μm 間隔に、3 μm の薄切を行う。検体には、軟骨組織が入っているため、薄切し難い部分は、脱灰しながら行う。各スライスには 10 枚の連続する薄切切片を確保する。これにて、200 μm 間隔の連続切片を得る。1 枚目をヘマトキシリン-エオジン染色し、2 枚目は CD34 抗体を用いた免疫染色、3 枚目は S100 抗体での免疫染色、4 枚目は NF 抗体での免疫染色を行う。もし、十分に染色できなかった場合は 5 枚目以降の標本を使用する。

免疫染色は、ABC 法に準じて行う。1 次抗体は、CD34(ab81289, Abcam), S100(ab52642, Abcam) と、NF 抗体(ab8135, Abcam)は、それぞれ 5000 倍に希釈して使用する。1 次抗体の反応時間は、3 抗体とも、24 時間とした。2 次抗体はヒストファイン シンプルステインラット MAX-PO(Multi)(ニチレイ)を用いた。発色はジアミノベンジジン(DAB)で行う。

各標本は、顕微鏡(Olympus CX43)で 40 倍、または、100 倍で撮影し(Olympus DP2-SAL)、これを画像ソフトウェアの Photoshop(Abobe)を用いて統合画像を作成する。

(1)ヘマトキシリン-エオジン染色の標本は、40 倍の統合画像を用いて評価する。治療効果の指標となる声門間隙の大きさを計測するために、各標本で声帯内縁、各軟骨の辺縁をトレースする。各トレースを、喉頭の正中を基準線として、重ね合わせ画像を作成する(Fig 1)。この図形をもとに、声門の大きさを計算する。計算方法は、まず、麻痺側の



最小声門の面積を測定する。そして、この面積を正中の前後径の2乗で割ることで声門間隙指数を計算する。

$$\text{声門間隙指数} = \text{声門面積} / (\text{前後径})^2$$

次に、各標本での内喉頭筋である内・外側甲状披裂筋、旁声門間隙の脂肪組織の大きさ、さらには、移植筋膜の大きさを測定する。この大きさを、各標本で測定し、200 μmの厚さを考慮して各々の容積を計算する。そして、この容積を健側と比較する。

$$\text{筋肉、脂肪組織、自家筋膜の容積} = n \text{ 枚の面積の総和} \times 200 \mu\text{m} \times n$$

(2)各免疫の標本(CD34, S100, NF)は、100倍の顕微鏡画像を用いて評価する。40倍の顕微鏡画像では、画像が荒く、より精密な染色状況が確認できないために、より倍率のある100倍を選択する。計測の標的は、声帯の多くの容積を占め、さらに、神経麻痺で萎縮が他の内喉頭筋より強い、外側甲状披裂筋とした。各標本のCD34、S100とNF抗体で染色した標本で、外側甲状披裂筋を抜き出し、これをimage Jを用いて、面積当たりの光度を計測した。それを健側と麻痺側で比較する。

麻痺側喉頭の支配中枢の検索。

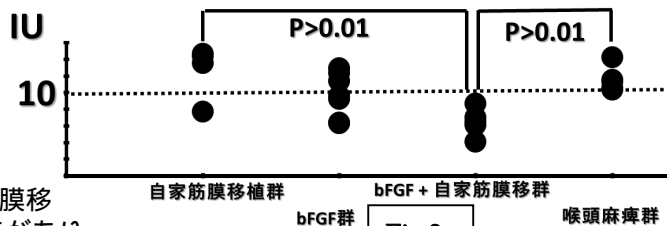
治療介入後12週間してから評価する。麻酔後に、麻痺側喉頭内に、逆行性神経トレーサであるFast Blue(FB)液を注入する。FBは、5%希釈し、この溶液2 μlを、ハミルトンシリンジ(10 μl)を用いて注入する。注入にあたり、注入部位を十分に確認する必要がある。そこで、稲木式喉頭鏡と、星野式喉頭鏡を用いて喉頭を展開し固定する。そこにクローズアップレンズ(MC Close-up NEO No4)を付けて焦点距離を短くしたビデオカメラ(HDR-CX480, Sony)で喉頭を観察する。これにより、喉頭内腔の様子が拡大、さらに鮮明に描出でき、FBの注入部位が観察しやすくなる。この注入部位の確認のため、安楽死後の喉頭を前頭断に200 μm間隔に薄切し、ヘマトキシリン-エオジン染色して、注入部位を確認する。

FBを注入したあと1週間してから、再度麻酔を行う。稲木式喉頭鏡と、星野式喉頭鏡を用いて喉頭を展開し、声帯運動を確認する。確認後、還流固定を行う。十分な麻酔深度にしてから、開胸し、左心室に還流用の針を挿入し、左心耳切断後、4%パラホルムアルデヒドで還流する。十分に還流したのちに、喉頭を摘出する。さらに、断頭し、脳脊髄組織を摘出する。パラホルムアルデヒドで固定後、O.C.T.compoundで濃度を変えながら浸透していく。完全に、O.C.T.compoundに置換できた後、脊髄・脳組織を凍結する。凍結する際、余剰な脊髄と大脳は前頭断に切断して外しておく。薄切は、クライオスタットを用いて、前頭断に50 μm間隔で10 μmに薄切する。凍結薄切切片は、自然乾燥して20で保存する。薄切標本の評価は、共焦点レーザー顕微鏡(LSM 710, Zeiss)で観察する。FBの周波数は420nmであることから、Argonレーザーを用いて観察する。これにて、責任中枢が判明する。

4. 研究成果

組織学的検討

1)声門間隙の大きさ：各群間での有意検定をKruskal-Wallis検定で行ったところ有意差(p = 0.02)を認めたため、各群間での有意検定を行った。治療効果と関連する声門間隙の大きさは、bFGF+自家筋膜移植群が、喉頭麻痺群(p > 0.01)と自家筋膜移植群(p = 0.04)より有意に小さかった。また、bFGF群は、自家筋膜移植群より有意に小さかった(p > 0.01)



今回の検討では、bFGF + 自家筋膜移植群のみ、喉頭麻痺群との有意差があり、治療効果が期待できる治療と考えられた。

残念ながら、自家筋膜移植のみでは、十分な効果が得られない可能性があった(Fig2)。ただ、自家筋膜移植術は、臨床で反回神経麻痺の症例に対して良好な結果を得ていることより考えると、bFGFを徐放させる自家筋膜移植術は、より有効な治療になりうると推測できる。

2)外側甲状披裂筋の大きさ：各群間での有意検定を

Kruskal-Wallis検定で行ったところ有意差(p = 0.04)を認めたため、各群間での有意検定を行った。bFGF+自家筋膜移植群が、喉頭麻痺群(p > 0.01)と自家筋膜移植群(p = 0.04)より有意に大きかった。

外側甲状筋は、神経麻痺の影響を強く受け、萎縮が起こることは報告されている。また、声帯筋である外側甲状披裂筋は、その大きさの変化が声門間隙の大きさに影響される。このため、今回の結果で、外側甲状披裂筋の大きさの増大が、治療効果に影響することは容易に想像できる。

3)傍声門間隙の脂肪組織：各群間での有意検定をKruskal-Wallis検定で行ったところ有意差(p = 0.23)を認めなかった。

bFGFは脂肪増殖する作用もあり、傍声門間隙に脂肪組織が大きくなると、喉頭内の容量が増大して、声門間隙の縮小することが期待されたが、今回の検討では、有意な結果は出なかった。

4)移植筋膜の大きさは、bFGF+自家筋膜移植群と自家筋膜移植群の2群間で検討した。パラメ

トリック法の t 検定を行った。自家筋膜移植群の移植筋膜の大きさ ($10.3 \pm 6.1 \text{ mm}^3$) が、bFGF+自家筋膜移植群 ($3.2 \pm 1.8 \text{ mm}^3$) に比べて有意に大きかった ($p = 0.04$)。

自家筋膜移植群で、移植筋膜の残存がありながら、治療効果に影響していなかったことについては興味深い。移植片としての容積は残存するものの、そこには再生が起きていないのではないかと考える。bFGF を徐放させた自家筋膜移植は、足場としての自家筋膜が、再生の場となり、吸収され、新たな組織に置換されるのではないだろうかと思像する。

5) 外側甲状披裂筋の血管分布 (CD34 抗体による免疫染色) : 喉頭麻痺群は、 $57.5 \pm 18\%$ と健側より低下しているのに対し、bFGF + 自家筋膜移植群 ($152 \pm 38\%$) と、bFGF 群 ($129 \pm 34\%$) は、健側より高い値を認めた。ただ、自家筋膜移植群は $99 \pm 26\%$ と低めであった。

どの治療も、萎縮した外側甲状披裂筋に、あらたな血管網を形成している可能性が示唆された。これは、組織再生には不可欠な点である。自家筋膜移植群が、声門間隙の大きさが十分に小さくならなかったのは、この血管網の形成が少なかったことにも起因するのかもしれない。

6) 外側甲状披裂筋の神経分布 :

(1) シュワン細胞の分布 (S-100 抗体による免疫染色) : 喉頭麻痺群は、 $45 \pm 15\%$ と健側に対して半分くらいまで低下していた。bFGF 群 ($45 \pm 45\%$) と自家筋膜移植群 ($99 \pm 12\%$) は、健側に比べて低下していた。一方、bFGF + 自家筋膜移植群 ($173 \pm 74\%$) は、健側より上回っていた。新生再生にかかわるシュワン細胞の分布が多いことは、bFGF + 自家筋膜移植群が、萎縮した筋組織に、新たな神経構築が再建してきているのかもしれない。

(2) 神経線維の分布 (NF 抗体による免疫染色) : 喉頭麻痺は、 $28 \pm 21\%$ と低下している。bFGF 群 ($82 \pm 66\%$) と、自家筋膜移植群 ($51 \pm 6\%$) と、喉頭麻痺群よりは高いが、 100% には満たない。その中で、bFGF+自家筋膜移植群は 101.38% と高い結果であった。

治療症例は、喉頭麻痺群より NF 抗体の陽性部位が多いことが分かった。このことは、麻痺側喉頭で治療介入により、神経構築の再建が起こってきている可能性を示唆する。

麻痺側喉頭の神経支配中枢の検討

現在、治療介入が終了し、脊髄・脳組織を摘出した症例は、自家筋膜移植群が 2 例、bFGF 群が 3 例、bFGF+自家筋膜移植群は 4 例である。また、治療介入後の FB 投与で評価するまでの待機症例が、自家筋膜移植群が 2 例、bFGF 群が 2 例、喉頭麻痺群が 6 例である。

治療介入後の待機期間や、治療後の影響を観察するのに時間がかかるため、この実験系は、この研究期間内では終了できなかった。しかし、現在も継続中であり、その結果は、論文発表という形で、公表するつもりである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

永井浩巳、他。喉頭麻痺に対する塩基性線維芽細胞増殖因子を徐放させた自家筋膜移植群の検討 血管と神経分布について . 第 17 回日本再生医療学会. 2018

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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。