

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16889

研究課題名（和文）声帯麻痺に対する高濃度脂肪由来再生細胞含有自家脂肪注入

研究課題名（英文）Adipose-derived stromal cell-rich lipotransfer for vocal fold

研究代表者

森崎 剛史（MORISAKI, Tsuyoshi）

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30817812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：我々は声帯体積増量、維持を目指した。小動物声帯に脂肪を注入するためには細い針の使用が求められるが、脂肪は18Gなど太径針でなければ針内を通過しないことを確認した。ラット声帯内への脂肪注入は断念せざるを得ず、移植先臓器を声帯から舌へと変更することとした。脂肪のみ、または抽出したADSC（脂肪由来再生細胞）を脂肪に添加したものをラット舌に注入して1日後、7日後での脂肪残存率を確認した。7日後における脂肪残存率はむしろADSC添加がない方が高かった。これはADSC抽出のために足場となる脂肪が半減したことで注入物の質が低下したことが要因として考えられ、結論を出すにはさらなる検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発声や嚥下を行う臓器は咽喉頭の空間を狭くして圧をエネルギーに変換する働きがある。手術などで臓器が欠損すると空間を狭くするための体積が確保できず発声・嚥下機能の障害が起こる。欠損臓器の体積を補充するために自家脂肪移植は安全かつ新たな機能障害を起こさない点で有利である。本研究は舌に自家脂肪を移植する新しい試みとなった。移植した脂肪組織は生着しなければ数日で壊死、吸収されるが、結果は7日後にも細胞膜を維持した脂肪細胞が塊となって体積を維持していることが確認できた。脂肪由来再生細胞による残存率の上乗せ効果を確認するには追加研究を要する。

研究成果の概要（英文）：We must use small needle for vocal fold injection. In current study, we confirmed that fat graft did not through small needle. We abandoned fat injection in rat vocal fold and changed the target organ to tongue.

We injected fat or fat plus ADSC to rat tongue and confirmed exist of fat graft at a day and seven days later. At day 7, graft survival amount is bigger without ADSC. Further study is needed for confirm this result because scaffold fat was decreased the amount and quality in ADSC group due to isolating ADSC.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：嚥下 脂肪幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

発声や嚥下を行う臓器は咽喉頭の空間を狭くして圧をエネルギーに変換する働きがある。手術などで臓器が欠損すると空間を狭くするための体積が確保できず発声・嚥下機能の障害が起こる。欠損臓器の体積を補充するために自家脂肪移植は安全かつ新たな機能障害を起こさない点で有利である。

術後性、特発性の反回神経麻痺は声門閉鎖不全を招き、その結果氣息性嘔声をきたして社会生活を困難にする。反回神経麻痺による声門閉鎖不全の治療として喉頭枠組み手術、声帯注入術がある。喉頭枠組み手術は大きな治療効果が期待できるが、外切開が必要なこと、手技に熟練を要することから患者、医療者に共に受け入れられないことがある。一方、声帯注入術は整容面に優れ手技も簡便であることから、声帯のレベル差が少なく声門閉鎖不全が比較的軽度な反回神経麻痺の治療として第一選択となる。声帯への注入物としては自家脂肪、コラーゲン、ヒアルロン酸などがあるが、異物反応の観点からは自家脂肪が最も安全性に優れている。しかし、注入物の吸収によって治療効果が持続しないという問題がある。

乳房再建や顔面軟部組織再建など、自家脂肪注入が行われる領域でも注入物の吸収による治療効果消失が問題であったが、近年、脂肪組織由来再生細胞 (ADRCs: Adipose-Derived Regenerative Cells) を用いることで治療効果の消失を防ぐことが可能となった。ADRCs は間葉系幹細胞、血管内皮前駆細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、周皮細胞、マクロファージ、血球などから構成される細胞群であり、西尾らはブタ反回神経麻痺モデルを用いて ADRCs 濃度の高い自家脂肪声帯注入を行なうことで、自家脂肪のみよりも長期間の注入物体積維持が可能であったことを報告した。統計学的な有意差については不明であるので、当初われわれは小動物モデルを使用して ADRCs を添加した自家脂肪移植の体積維持効果を検証する方向で実験計画を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は反回神経麻痺モデル動物を用いて高濃度脂肪組織由来再生細胞 (ADRCs) 含有自家脂肪が、声帯注入後の体積維持に効果をもつのかを統計学的に検討することであった。後述する手術機器のセットアップや制作の後、脂肪吸引による自家脂肪採取の手技確立にとりかかったが、モデル動物の薄い皮下脂肪からの吸引による採取は困難であり、皮下脂肪体を外科的に切離してから注入できるように加工する工夫が必要となった。この時点で、吸引脂肪から ADRCs を分離するための機器を使用することが困難となり、ウサギで研究を継続する困難性を認め、モデル動物を、切除脂肪から ADRCs 分離手技が確立しているラットへと変更する大幅な計画の見直しを要した。また、ラットへの声帯注入を各種の針で実験した結果、小動物の声帯内への注入には 26G よりも細いものでなければ針のカット面が声帯を容易に貫通して声帯内に注入物を留められないことがわかった。採取した脂肪組織を細切し細径針で注入するために様々な方法を試験したが脂肪体の結合組織に阻まれてどうしても 18G の太径針でないと通過しないことがわかった。小動物モデルにおける声帯内への脂肪注入は断念せざるを得ず、注入臓器を声帯から舌へと変更することとした。

舌へ自家脂肪を移植して嚥下機能のための体積を維持させる意義について記載する。舌は嚥下機能に大きく関わり、舌の加齢性変化が嚥下機能低下の一因となることが知られている。加齢によって舌筋繊維が減少し舌が萎縮することで口蓋に対する舌圧が低下し嚥下時の舌圧形成に時間を要するようになることで嚥下機能の低下をきたす。また、口腔癌の切除により舌の欠損が生じると嚥下が困難となることが知られている。このように舌の体積の減少が嚥下機能に悪影響を及ぼすことから、舌萎縮や欠損に対する体積の再建が嚥下機能改善に有用であることは大いに期待できる。

舌の再建方法については口腔癌切除後には一般的に遊離皮弁の作成移動術が行われるが、今後増加すると思われる加齢性の舌萎縮に対しての治療としては侵襲が高く忍容性がない。自家脂肪の注入による舌の体積増加が得られれば比較的手軽に行える治療として有望である。乳房再建や顔面軟部組織再建など、自家脂肪注入が行われる領域では注入物の吸収による治療効果消失が問題であり、舌への脂肪移植も同じ課題に直面する。ADRCs 濃度の高い自家脂肪声帯注入を行なうことで、自家脂肪のみよりも長期間の注入物体積維持が期待できる。

## 3. 研究の方法

13 週齢の SD ラット計 12 匹を用いた (COVID-19 感染拡大により成果報告時点では計 3 匹での途中経過の報告となった)。ラットを同数ずつ 2 群に分け、一方は自家脂肪に ADRCs を混合したも

のを注入する群 (ADRC 群) もう一方は自家脂肪に ADRCs 添加と同量の PBS のみを混合したものを注入する群 (sham 群) とした。いずれの群でも皮膚を切開して鼠径部皮下脂肪を採取し創部を縫合閉鎖した。脂肪は剪刀で細切し、漏出したオイル成分や血球成分を除去するためにメッシュ上で PBS で洗浄し、注入材の基材とした。ADRC 群では採取した脂肪の半量をコラゲナーゼ溶液 (40 mg/PBS 40 ml) に入れて 60 分間 40 °C の恒温槽内で振盪し、遠沈と 100 μm のセルストレーナーを使用して ADRCs を抽出し、 $1 \times 10^6$  cell / 0.1 ml PBS の細胞懸濁液として 0.3 ml の基材に混合した。Sham 群では ADRC 懸濁液の代わりに 0.1 ml の PBS を 0.3 ml の基材に混合した。両群ともに注入量は 50 μL とし、舌背右側に注入した。Sham 群の 1 日後、両群の 7 日後でラットを安楽死させたうえで舌を採取し、舌の長軸断の凍結薄切切片を作成して Oil Red O 染色を行い脂肪残存量を確認した。

#### 4. 研究成果



図 1 ウサギ用喉頭直達鏡

当初の計画の準備段階での成果について：ウサギの喉頭展開用に特注で金属製の喉頭直達鏡を作成した (図 1)。

3 種混合麻酔の筋注による全身麻酔下でウサギの喉頭展開と内視鏡による経口的な声帯観察、声帯注入の手技を自施設において可能とした。本研究ではその後この成果を使用することはなかった。

自施設においてラットの喉頭直達鏡の作成、声帯への注入手技の確立、反回神経麻痺モデルの作成、皮下脂肪採取の手技確立を行った。経口的に硬性内視鏡明視下に声帯注入手術を行う手技を確立した。

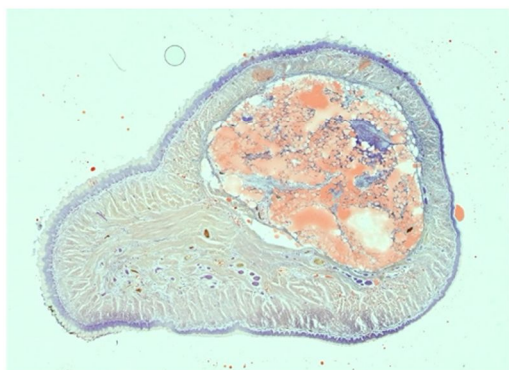


図 2 注入 1 日後のラット舌 (Oil Red O 染色)

標的臓器を舌に変更した後の成果について：

注入 1 日後には、舌筋内に脂肪塊が十分に移植され、舌の体積が明らかに増加していることを確認できた (図 2)。移植した脂肪組織は生着しなければ数日で壊死、吸収されるが、結果は 7 日後にも細胞膜を維持した脂肪細胞が塊となって体積を維持していることが確認できた (図 3)。注入 7 日後における脂肪残存量はむしろ ADRC 群の方が少なかった (図 4)。これは ADRCs 抽出のために基材となる脂肪が半減したことで注入物の質が低下したことが要因として考えられ、結論を出すにはさらなる検証が必要である。今後このエラーを防ぐために皮下脂肪の採取量自体を増加させる必要があり、これまで片側の鼠径部皮下脂肪の採取にとどめていたところを両側鼠径部より採取するべきことがわかった。移脂肪由来再生細胞による残存量の上乗せ効果を確認するには追加研究を要する。COVID-19 感染拡大の影響で成果報告には掲載が叶わなかったが、今後まもなく手技の小変更をおこなった上で計画の個体数の手術および評価を行う予定である。

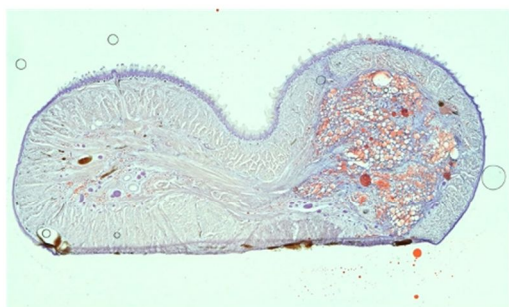


図 3 注入 7 日後の sham 群ラット舌 (Oil Red O 染色)

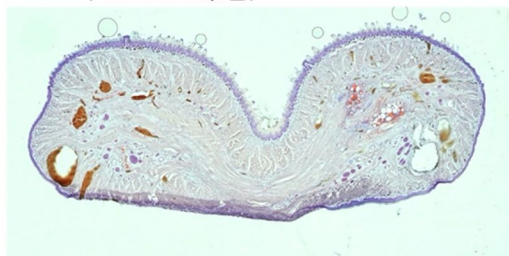


図 4 注入 7 日後の ADRC 群ラット舌 (Oil Red O 染色)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Morisaki Tsuyoshi、Fukuhara Takahiro、Matsuda Eriko、Moritani Sueyoshi、Miyake Naritomo、Koyama Satoshi、Fujiwara Kazunori、Takeuchi Hiromi	4. 巻 1
2. 論文標題 Ultrasonography findings in immunoglobulin G4-related lymphadenopathy: a report of two cases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Ultrasonography	6. 最初と最後の頁 105 ~ 105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11152/mu-1854	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------