

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19591998
研究課題名 (和文) 声帯の細胞および細胞外マトリックスの形態学的研究 -声帯黄斑と星型細胞の機能-
研究課題名 (英文) Morphological Investigations of cells and extracellular matrices of the human vocal fold. Functions of maculae flavae and cells in the human vocal fold mucosa.
研究代表者 佐藤 公則 (SATO KIMINORI) 久留米大学・医学部・准教授 研究者番号：70196228

研究成果の概要：

ヒト声帯の黄斑の機能と黄斑内のビタミン A 貯蔵星型細胞の機能を研究した。

1) ヒト声帯黄斑のビタミン A 貯蔵星型細胞を細胞培養し継代培養に成功した。

2) ヒト声帯黄斑に密に分布するビタミン A 貯蔵星型細胞の機能は、声帯粘膜固有層に分布する通常の線維芽細胞と機能的に違うのかを放射線感受性の観点から研究した。

3) 未熟な新生児の声帯黄斑内のビタミン A 貯蔵星型細胞がどのような要因により活性化され、ヒト固有の声帯粘膜の層構造を構築し、ヒト声帯粘膜の成長・発達に関与しているかを研究した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：声帯、喉頭、細胞、細胞外マトリックス、黄斑、ビタミン A 貯蔵星型細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒトの声帯のみが哺乳類の中で特徴的な構造を持っており、この声帯を用いてヒトは会話をしたり歌ったりできる。

我々の研究から、ヒト声帯膜様部粘膜固有層の前端と後端に存在する黄斑がヒト固有

の声帯粘膜の層構造を構築し、ヒト声帯粘膜の成長・発達・老化に関与していることが示唆されている。またヒト声帯の黄斑が声帯振動に不可欠な声帯粘膜の細胞外マトリックスの代謝に関与し、声帯振動に必要な物性

(粘弾性)を維持していることが示唆されている。

2. 研究の目的

今回の研究目的は、ヒト声帯膜様部粘膜固有層の前端と後端に存在する黄斑と黄斑内のビタミンA貯蔵星型細胞の機能を研究することにある。

3. 研究の方法

1) ヒト声帯黄斑内のビタミンA貯蔵星型細胞の継代培養

ヒト声帯黄斑のビタミンA貯蔵星型細胞を細胞培養し、継代培養を行った。

方法は光学顕微鏡下にヒト声帯の声帯黄斑とラインケ腔を摘出した。声帯黄斑とラインケ腔を抗生物質入りのリン酸緩衝液に浸した後、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)培地で単層静置培養を行い、ビタミンA貯蔵星型細胞と線維芽細胞の継代培養を行った。

2) ヒト声帯黄斑内のビタミンA貯蔵星型細胞の放射線感受性

放射線照射後のヒト声帯を組織学的に研究した。

研究方法は声帯膜様部の黄斑部と粘膜固有層の細胞外マトリックスの分布と構造、およびこれらの細胞外マトリックスを産生する声帯黄斑内のビタミンA貯蔵星型細胞を光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡で観察した。

標本の作製方法は以下のごとくである。

(光学顕微鏡用標本)

10%ホルマリンに固定されている標本を脱水、パラフィン包埋した後に、銀染色、PAS染色、アルシヤンブルー染色、エラスティカ・ワンギーソン染色などを行ない観察した。

(透過型電子顕微鏡用標本)

2.5%グルタルアルデヒドによる固定と

2%オスミウム酸緩衝液で後固定の後、脱水、エポン包埋、超薄切片の作製を行ない、ウラニル鉛染色、タンニン酸染色などを行ない透過型電子顕微鏡用標本を作製し観察した。

3) 生後の発声および声帯振動がヒト声帯黄斑内のビタミンA貯蔵星型細胞に与える影響

生後発声が行われていない重症心身障害者の成人と小児男女の喉頭を組織学的に研究した。

研究方法は声帯膜様部の黄斑部と粘膜固有層の細胞外マトリックスの分布と構造、およびこれらの細胞外マトリックスを産生する声帯黄斑内のビタミンA貯蔵星型細胞を光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡で観察した。

光学顕微鏡用標本と透過型電子顕微鏡用標本の作製方法は2)と同様である。

4. 研究成果

ヒト声帯黄斑の機能と黄斑内のビタミンA貯蔵星型細胞の機能を研究した。

1)ヒト声帯黄斑のビタミンA貯蔵星型細胞を細胞培養し継代培養に成功した。継代培養されたビタミンA貯蔵星型細胞は *in vitro* で通常の線維芽細胞と形態学的に異なり増殖形式が異なっていた。

2) ヒト声帯黄斑に密に分布するビタミンA貯蔵星型細胞の機能は、声帯粘膜固有層に分布する通常の線維芽細胞と機能的に違うのかを放射線感受性の観点から研究した。今回の研究ではビタミンA貯蔵星型細胞は、声帯粘膜固有層に分布する通常の線維芽細胞に比較してより放射線感受性が高く、より未分化な細胞であることが示唆された。

3)未熟な新生児の声帯黄斑内のビタミンA貯蔵星型細胞がどのような要因により活性化され、ヒト固有の声帯粘膜の層構造を構築し、ヒト声帯粘膜の成長・発達に関与してい

るかを研究するために、生後発声が行われていない重症心身障害者の成人と小児男女の喉頭を形態学的に研究した。今回の研究では生後発声を行っていない声帯黄斑部の構造に関しては、ビタミンA貯蔵星型細胞の形態、細胞外マトリックスの分布と構造が正常とは異なっていた。ラインケ腔、声帯靭帯の構造に関しては、線維芽細胞の分布と構造に変化はなかったが、同部の細胞外マトリックスの分布と構造が正常とは異なっており、ヒト固有の声帯粘膜の層構造は構築されていなかった。発声による声帯振動と声帯振動による声帯黄斑と黄斑内のビタミンA貯蔵星型細胞に加わる張力が、声帯黄斑内のビタミンA貯蔵星型細胞を活性化し、ヒト固有の声帯粘膜に必要な細胞外マトリックスを産生しヒト声帯の層構造を構築し、ヒト声帯粘膜の成長・発達に関与しているという仮説が支持された。

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 5 件)

- ① SATO Kiminori, NAKASHIMA Tadashi: Stellate Cells in the Human Child Vocal Fold Macula Flava. Laryngoscope 119: 203-210, 2009. 査読有
- ② SATO Kiminori, NAKASHIMA Tadashi, NONAKA Satoshi, HARABUCHI Yasuaki: Histopathologic Investigations of the Unphonated Human Vocal Fold Mucosa. Acta Oto-Laryngologica 128: 694-701, 2008. 査読有
- ③ SATO Kiminori, Yoshimi MIYAJIMA, Shinsuke Izumaru, NAKASHIMA Tadashi: Cultured Stellate Cells in Human Vocal Fold Mucosa. The Journal of Laryngology &

Otology 122: 1339-1342, 2008. 査読有
④ SATO Kiminori, SHIROUZU Hidetaka, NAKASHIMA Tadashi: Irradiated Macula Flava in the Human Vocal Fold Mucosa American Journal of Otolaryngology 29: 312-318, 2008. 査読有

⑤ SATO Kiminori, NAKASHIMA Tadashi: Effect of Irradiation on the Human Laryngeal Glands. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology 117: 734-739, 2008. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① SATO Kiminori, NAKASHIMA Tadashi: Stellate Cells in the Human Child Vocal Fold The 129th Annual Meeting of the American Laryngological Association (May 1, 2008, Orlando, Florida)
- ② 佐藤公則、中島 格: 小児声帯の黄斑と星型細胞 第20回日本喉頭科学会 (2008年3月13日、佐賀)
- ③ 佐藤公則: 人はなぜ一生発声できるのか—声帯粘膜の細胞と細胞外マトリックスの観点から— 第19回福岡県耳鼻咽喉科専門医会講演会 (2007年10月27日、福岡)
- ④ SATO Kiminori, MIYAJIMA Yoshimi, IZUMARU Shinsuke, NAKASHIMA Tadashi: Cultured Stellate Cells in the Human Vocal Fold Mucosa. The 128th Annual Meeting of the American Laryngological Association (April 27, 2007, San Diego, California)
- ⑤ SATO Kiminori, NAKASHIMA Tadashi, NONAKA Satoshi, HARABUCHI Yasuaki: Histopathologic Investigations of the Unphonated Human Vocal Fold Mucosa. The 87th Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association

(April 27, 2007, San Diego, California)

⑥ SATO Kiminori, SHIROUZU Hidetaka,
NAKASHIMA Tadashi: Irradiated Macula
Flava in the Human Vocal Fold Mucosa. The
128th Annual Meeting of the American
Laryngological Association (April 27,
2007, San Diego, California)

[図書] (計 2 件)

- ① 佐藤公則：声帯の構造 新編 声の検査
法 医歯薬出版、東京：9～15、2009.
- ② 佐藤公則：声帯は楽器 新編 声の検査
法 医歯薬出版、東京：129、2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 公則 (SATO KIMINORI)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：70196228

(2) 研究分担者

伊豆丸 慎介 (IZUMARU SHINSUKE)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：80352178

中島 格 (NAKASHIMA TADASHI)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：70117083

(3) 連携研究者