

ラット反回神経切除モデルに対する
脱分化脂肪細胞（DFAT）声帯内移植の効果

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系耳鼻咽喉科学専攻

御子柴 郁夫

修了年 2022 年

指導教員 大島 猛史

目次

第1章	概要	1
第2章	緒言	3
	1. 背景	
	2. 反回神経の解剖	
	3. 反回神経の機能	
	4. 反回神経麻痺	
	5. 反回神経麻痺の治療	
	6. 脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell : DFAT)	
	7. 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF)	
	8. 本研究の目的	
第3章	研究対象と方法	13
	1. 実験動物	
	2. DFATの調整	
	3. 一側性反回神経麻痺ラットの作成法	
	4. 声帯内注入法	
	5. 実験プロトコール	
	6. 喉頭内視鏡検査	
	7. 組織学的検討	
	8. 免疫組織染色	
	9. 統計学的評価	
第4章	結果	20
	1. 声帯内注入手技の検討	
	2. 声門間隙の改善効果	
	3. 声帯筋萎縮に対する効果	
	4. 萎縮声帯筋組織のアポトーシスと細胞増殖に対する効果	
第5章	考察	22
第6章	まとめ	26
	謝辞	27
	図表	28
	引用文献	42
	業績	50

略語表

略語	正式表記
ASC	adipose-derived stem cells
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMSC	bone marrow-derived stem cell
DFAT	dedifferentiated fat cell
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FAP	fibro-adipogenic progenitors
FBS	fetal bovine serum
GFP	green fluorescent protein
H-E stain	hematoxylin & eosin stain
HGF	hepatocyte growth factor
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MHC	major histocompatibility complex
MSC	mesenchymal stem cell
NS	not significant
One-way ANOVA	One-way analysis of variance
PBS	phosphate-buffered saline
SD	Sprague-Dawley
TGF- β	transforming growth factor- β
TIMP-1,2	tissue inhibitor of metalloproteinase-1,2
VEGF	vascular endothelial growth factor

第1章 概要

反回神経は頸胸部の外科手術や、悪性腫瘍、特発性疾患などにより障害されることがある。反回神経が障害されると半永久的に嗄声や嚥下障害、息切れなどを生じることとなり患者の QOL は著しく低下する。さらに、反回神経麻痺により声帯筋萎縮が起こることで声門閉鎖不全が悪化し、これらの症状はさらに進行し得る。これまで、声帯萎縮に対してはいくつかの手術以外に、萎縮した声帯内にアテロコラーゲンや自家脂肪を注入する方法が試みられてきたが、安全で永続的な声帯萎縮に対する確立した治療はなく、再生医療などに期待が持たれている。そこで我々は今回、成熟脂肪細胞に由来する人工多能性細胞である脱分化脂肪細胞 (DFAT) や線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 投与による声帯の再生治療の可能性を検討した。本研究では、ラットに対して一側反回神経切除を行い、萎縮した声帯筋に DFAT および bFGF を注入することによって声帯筋の再生が誘導されるか、主に組織学的検討により評価した。

8 週齢の SD ラット (n=34) を用いて動物実験を行った。左側の反回神経を切除後、断端を結紮し一側反回神経麻痺を作成した。反回神経切除 5 週間後に萎縮した声帯筋に対して、コントロール (生理食塩水) 群 (n=12)、DFAT 群 (n=11)、DFAT+bFGF 群 (n=11) の計 3 群に分けて、それぞれ生理食塩水、DFAT、DFAT+bFGF を経口的に声帯内注入を行った。処置後 2 週に各群 n=3 で喉頭を摘出して、声帯筋の組織切片標本を作製後、TUNEL 染色及び Ki-67 の免疫組織染色を行い、アポトーシス細胞と細胞増殖細胞を評価した。処置後

4週に各群 n=8-9 で喉頭を摘出し、H-E 染色と Masson's Trichrome 染色で声帯筋断面積およびコラーゲン産生について正常側 (uninjured side) に対する処置側 (injured side) の断面積割合 (I/U 比) を組織学的に評価した。また処置直前と処置後 4 週間での喉頭内視鏡での肉眼的な声門間隙の評価を行った。

声門間隙の評価では、コントロール群と比較して DFAT 群及び DFAT+bFGF 群で内転偏位角度および内転偏位角度改善率が有意に高くなっており、声門閉鎖不全の改善が認められた。組織学的評価では声帯筋内のコラーゲン発現量の I/U 比はコントロール群と比較して DFAT 群及び DFAT+bFGF 群で有意に増加を認めた。また、声帯筋断面積 I/U 比はコントロール群と比較して DFAT+bFGF 群では有意に増加した。処置後 2 週間での処置側の TUNEL 陽性細胞数は DFAT 群及び DFAT+bFGF 群と比較してコントロール群で有意に高く、DFAT 移植によるアポトーシスの抑制が示唆された。Ki-67 陽性細胞数は 3 群間で有意な差は見られなかったが、コントロール群と比較して DFAT 群及び DFAT+bFGF 群で多い傾向にあった。

これまでに、声帯筋内へ DFAT を注入し、その治療効果を検討した報告はなく、本研究は、反回神経麻痺によって萎縮した声帯筋へ DFAT を注入することで筋肉の再生を促し、声門閉鎖不全の改善効果を示した初めての報告である。今後新たな治療法を検証していく上で、DFAT 単独または DFAT と bFGF の併用による萎縮声帯筋への注入は、反回神経麻痺に伴う声門閉鎖不全に対する新たな治療法として期待できる。

第2章 緒言

1. 背景

超高齢化社会に向かっている本邦において、死因の第1位は悪性腫瘍であり[1]、本邦では過去40年にわたり、甲状腺がんや、咽頭がん、喉頭がんの罹患率が上昇傾向にある[2]。これらの悪性疾患の代表的な根治的治療は手術による切除であるが、術後合併症として反回神経麻痺が問題となっている。また、腫瘍の直接浸潤や圧排、中枢性病変、特発性疾患などによっても反回神経が障害されることがある。反回神経は声帯筋を支配しており、反回神経麻痺により声帯筋の運動障害および萎縮が生じる。声帯筋では主に甲状披裂筋が萎縮することが知られている。反回神経が麻痺すると、麻痺した側の声帯は運動を失い固定することで、声門間隙が生じ、声門閉鎖不全が起こることによって、嗄声や嚥下困難、誤嚥などを来す。また、さらに時間経過とともに声帯筋萎縮が進み声門間隙が大きくなることで、症状のさらなる悪化も起こり得る。これまで、声帯萎縮に対しては頸部切開を伴う外科的治療や、萎縮した声帯の組織容量を増加させ声門間隙を減らす目的で声帯注入術などが試みられてきたが、声帯萎縮に対する安全で永続的な確立した治療はなく、新たな治療法の確立が求められている。

2. 反回神経の解剖

反回神経は迷走神経から分枝し、運動枝、知覚枝および副交感神経枝を含む混合神経である[3]。迷走神経は舌咽神経および副神経とともに、延髄の後外側

溝より出て、頸静脈孔を出たのちに上喉頭神経を分枝し、胸腔まで下降した後、に反回神経を分枝する。反回神経は、左側は大動脈弓を、右側は鎖骨下動脈を前方から後方に回り、気管と食道の間溝を知覚神経線維である気管枝、食道枝を分枝しながら上行し、下喉頭神経として喉頭に達する。その際、右側の反回神経は気管食道溝やや外側を、左側は気管よりを走行している[4]。下喉頭神経は上喉頭神経との吻枝である Galen 吻合枝を出したのちに喉頭内へ進入する。進入した神経は運動神経線維からなり、輪状甲状筋を除くすべての内喉頭筋の運動を支配する。

3. 反回神経の機能

喉頭の筋肉には喉頭を支持し、嚥下や発声の際に喉頭の上下運動を行う外喉頭筋と、喉頭内部にあり声帯の運動や発声に大きく関与する内喉頭筋とがある。内喉頭筋は声帯を内転させることで声門を閉鎖する内転筋と、外転させることで声帯を開大する外転筋に分けられる。内転筋には甲状披裂筋、外側輪状披裂筋、披裂筋があり、外転筋は後輪状披裂筋があり、反回神経は内転筋と外転筋の全ての筋肉を支配している。その他の内喉頭筋として声帯の緊張を調節する輪状甲状筋があるが、これは迷走神経から直接分枝した上喉頭神経外枝によって支配される。このことから、反回神経は、声帯運動において声門の閉鎖と開大という拮抗する作用を支配していることとなる。

4. 反回神経麻痺

一側の反回神経が障害されると片側の声帯の運動機能が失われ、十分な声門閉鎖ができなくなることによる声門間隙が生じ、嘔声や嚥下障害、息切れなどを生じることになる。一側性反回神経麻痺では、麻痺した片側の喉頭運動が障害されるため、発声時に本来対称的に接するべき声帯間に間隙ができることで声門閉鎖不全の状態となり声帯振動が妨げられて氣息性の嘔声となる。氣息性嘔声では発声時呼気量が増加するため発声持続時間が低下する他、長時間の発声が困難であり、患者にとって会話を続けること自体が大きな負担となる。嚥下時においても本来嚥下時に起こる声門閉鎖ができないため、誤嚥のリスクも上昇する[5,6]。また反回神経の運動枝の麻痺により声帯筋の緊張がなくなり徐々に萎縮するため、声門間隙はさらに増大し、これらの症状は徐々に悪化する。反回神経は前述のように長く複雑な走行経路を持っており、反回神経麻痺はそのどの部位の障害でも起こりうる。反回神経麻痺をきたす原因として、甲状腺、食道、肺、縦隔における悪性腫瘍や大動脈疾患、またはそれらに対する外科手術や手術の際の挿管性、特発性疾患などがある[7,8]。これらの原因の中で、最も頻度が高いものは外科手術による術後性の反回神経麻痺であり、これが全体の40%程度を占めるとされている[9]。前述した甲状腺がんや咽頭がん、喉頭がんの罹患率の増加傾向に加え、さらに近年では、以前には外科的治療が困難であった手術適応の範囲拡大により、術後反回神経麻痺の原因となり得る心臓大血管、食道、肺・縦隔腫瘍の手術可能症例の割合が増加していることが示されており[10]、今後も反回神経麻痺患者の増加が予想される。

5. 反回神経麻痺の治療

一側性反回神経麻痺に対しての治療法は、音声改善手術として幾つかの治療法がある。共通する目的としては声門間隙を減らすことである。そのアプローチ方法に従って、(1) 神経支配を再建することで声帯の萎縮の防止と声帯固定位置の矯正を行うもの、(2) 麻痺して固定した声帯を外科的に内転させるもの、(3) 麻痺により萎縮した声帯のボリュームを増加させるもの、に大別される。それぞれの治療はアプローチや施行するタイミングが異なる。代表的な術式として、(1) には神経縫合術、神経移植術、神経移行術、神経筋弁移植術がある。これらは手術などで神経切除をした際に即時行われることが多い。神経縫合術は、手術などで切除した反回神経の断端同士を縫合するものであり、神経切除距離が短く、断端距離が近い場合に選択される。神経移植術は、断端に距離がある場合に行われ、他の神経を採取しグラフトとして用い、断端同士を縫合し置換するものである。神経移行術は反回神経中枢側を利用できない場合に、他の神経と反回神経末梢側を縫合するものであり、反回神経の場合は頸神経ワナがよく用いられる。神経筋弁移植術は反回神経末梢側が利用できない時に、頸神経ワナを用いた神経筋弁を喉頭内筋に移植するものである。これらの方法は甲状腺癌の手術時によく用いられ、有効な成績が報告されている[11,12,13]。しかし、神経縫合術や神経移植術は切断した神経の再生を促すが、前述したように混合神経であるため、再生の過程において切断した神経線維が本来の標的と異なる神経に伸長する過誤再生を起こすため、声帯運動の回復は得られないとされる[14]。また、神経移行術についても内喉頭筋への神経再支配は起こる

が、反回神経としての働きは得られないとされる。(2)には甲状軟骨形成術 I 型[15]、披裂軟骨内転術[16]があり、音声外科の分野では一般的に行われている術式であり、麻痺した声帯を外科的に内転させることによって声門間隙を小さくすることで機能改善を図る方法である。どちらの術式も、麻痺側の声帯位置を内転させることにより声門間隙を改善することによって誤嚥リスクや嗄声などの症状を改善できる一方で、外切開によるアプローチのため局所あるいは全身麻酔を必要とし、頸部に切開を加える必要もあるため侵襲性や美容面のデメリットを伴う。これらの方法は基本的には一側性反回神経麻痺に対して行われる。両側性反回神経麻痺の場合には、声帯固定の位置により治療選択が異なる。両側の声帯が外側固定し、声門閉鎖不全が生じている状態であれば、前述の一側性反回神経麻痺の治療を検討するが、両側の声帯が正中あるいは傍正中固定し、声門閉鎖をした状態であれば著しい呼吸困難・窒息リスクとなる。その場合には、声門開大手術が行われる。代表的なものとして Woodman 法 [17]、Ejnell 法 [18]、内視鏡下披裂軟骨摘出術[19]などがある。これらの手術は、呼吸機能の改善を優先とするため、術後の発声機能の改善は見込めない。

(3)は声帯内注入術と呼ばれ、萎縮した声帯へシリコン[20]、アテロコラーゲン[21]、自家脂肪[22]などを注入して声帯のボリュームを増すことで声門間隙の改善を図る方法であり、音声外科の分野で良好な成績を残している。声帯内注入術の問題点としては、シリコンやアテロコラーゲンでは氣息性嗄声は改善するものの、声帯粘膜固有層の性質と異なるため、声帯粘膜振動を障害することで音声機能としては改善が期待できないとされている。また、自家脂肪細胞

では注入後の自然吸収による音声機能の再悪化が起こるため、10.5%の患者に再注入が必要となることが報告されている[23]。さらにアテロコラーゲンでは抗原性が強くアレルギー反応が起こりやすいことが問題となっており[24]、術前の皮内テストが必要となる。理想的な注入材料として、組織反応性が低く調整や注入手技が簡便であり、吸収されずその場に長くとどまり、声帯粘膜の運動を妨げない性質のものが望ましいと考えられているが、このような安全性、簡便性、永続性、機能性の全てを満たすような注入材料は現在までに確立していない。

6. 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF)

近年、創傷治癒促進や組織再生効果を有する細胞増殖因子の局所注入療法が多くの疾患で行われている。声帯萎縮に対しては、bFGF[25][26]やHGF[27][28]といった細胞増殖因子の局所注入の有効性が動物実験で確認されている。特にbFGFは作用機序を含む多くの研究が行われており、声帯萎縮や声帯溝症の患者に対する局所注入療法が臨床応用されるに至っている。

bFGFは1974年に、線維芽細胞の増殖を促進する蛋白質として牛の脳下垂体からGospodarowiczにより発見された[29]。bFGFは、線維芽細胞、血管内皮細胞、角化細胞の増殖や新生血管作用を有し、良性肉芽を形成させ創傷治癒を促進する[30]。これまでにヒトリコンビナントbFGF製品(トラフェルミン)が製造販売されており、本邦では皮膚潰瘍や褥瘡などに保険適用されている。反回神経麻痺に伴う声帯萎縮に関して、一側性反回神経麻痺ラットの声帯筋の一

つである甲状披裂筋に対して、bFGF 200 ng を週一回複数回投与することで甲状披裂筋の萎縮を抑制し、注入後 4 週時点での神経筋接合部および衛星細胞の数を有意に増加させたとの報告がある[25]。また bFGF 200 ng または 2000 ng を声帯筋内に単回注入することで、両群で注入後 4 週の時点で甲状披裂筋の萎縮が抑制され、2000 ng 投与群では細胞増殖マーカーである Ki-67 や衛星細胞のマーカーである Pax7 が誘導されるとともに、MyoD 陽性細胞が増加することが報告されている [26]。また Hirano らは、声帯萎縮や声帯溝症の患者にトラフェルミンを週一回、計 4 回の粘膜固有層浅層へ注入することで一定の音声改善効果が得られることを報告している[31]。このように、bFGF は声帯萎縮に対する頻回複数回投与の治療効果が示されている。

7. 脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell : DFAT)

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) は間葉系細胞への多分化能を持つ細胞で細胞再生医療の分野で注目されている[32]。脂肪組織に含まれる MSC は特に脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cell : ASC) と呼ばれ、脂肪吸引により比較的 low 侵襲に大量採取ができる点でも注目されている。ASC や MSC は骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などへの分化能を持つ他、優れた自己増殖能を持ち、様々なサイトカインや増殖因子を分泌することで組織の再生・修復能への期待も持たれている[33][34]。また、MSC はヒト主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) class II である HLA-DR の発現が低いため、他家移植も可能とされている[35]。これまでに一側反回神経麻痺の細胞治療としては、ミニブ

タに対する脂肪細胞と ASC を含む間質血管分画細胞の甲状披裂筋注入において注入部位周囲の甲状披裂筋の肥大を示した報告がある[36]。また、声帯癬痕に対しては、ラットやウサギにおける ASC の粘膜下注入による治療効果についての報告などがある[37-39]。一方、ASC や MSC はヘテロな細胞集団であり、間質血管分画に微量に含まれる幹細胞を培養しているため、リンパ球などの炎症細胞を含んだ異種細胞の混入を伴い、純度を高めるには数回の培養が必要とされている。また、糖尿病患者から調製した MSC の性能が低下するといった報告[40]もあるように、ドナーの基礎疾患や年齢によって細胞品質の低下が懸念されている。

Matsumoto ら[41]は脂肪細胞から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養することによって得られる脱分化脂肪細胞 (DFAT) が、MSC に類似した高い増殖能と多分化能を持つことを報告した。DFAT は成熟細胞を単離した後には培養を行うため、ASC に比べ異種細胞の混入が少なく、純度の高い細胞が得られるという利点を持ち、少量 (約 1g) の吸引脂肪から大量の細胞調製が可能であり、患者の年齢や基礎疾患に影響されず安定した治療活性を保持した細胞が得られるため、安全性や有効性に優れた実用性の高い治療用細胞として期待されている。MSC とほぼ同等の多能性を持ち、これまで脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞などへの分化能が確認されている[42-46]。また、骨髄 MSC や ASC とほぼ一致したサイトカインや増殖因子の分泌パターンを示し、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) や肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth

factor : HGF) などの血管新生因子を分泌するとともに、血管内皮細胞やペリサイトといった血管構成細胞に直接分化することにより、高い血管新生能を示す[47]。また、ラット皮膚全層欠損モデルにおける人工真皮を用いた皮膚再生研究において、DFAT と bFGF 併用投与が、真皮組織の血管新生誘導を増強し、コラーゲン増生を伴う真皮再生を促進させることが報告されている[48]。

8. 本研究の目的

これまでに一側反回神経麻痺による声帯萎縮に対しては頸部切開を伴う外科的な手術以外に、萎縮した声帯内に様々な材料を注入することで組織容積を増加させ声門間隙を減らす方法が試みられてきた。しかしながら、これまでに声帯萎縮に対する安全で永続的な確立した治療はなく、再生医療などの新たな治療戦略に期待が持たれている。DFAT は MSC や ASC に比べ純度が高く、患者の状態によらず安定した治療活性を示し、少量の脂肪組織から低侵襲性に大量調製できるため、自家脂肪といった既存の細胞療法に比べて高い安全性と安定した治療効果が期待できる。また bFGF の併用投与は、DFAT の血管新生作用や、コラーゲン産生能を増強させることが予想され、より安定的、長期的な声帯筋萎縮の抑制や bulking effect による声門間隙の改善効果が期待される。一方、反回神経麻痺による声帯萎縮に対する DFAT 単独あるいは bFGF 併用での移植の治療効果についてこれまでに報告はない。

本研究は、ラット反回神経切除モデルにおいて萎縮した声帯筋に DFAT 単独または bFGF との併用で筋肉内注入することにより、声帯筋の萎縮の抑制や声

門閉鎖不全の改善が誘導されるかどうかを検討した。

第3章 研究対象と方法

1. 実験動物

オリエンタル酵母工業より購入した雄性8週齢のSprague-Dawley (SD) ラットを実験に用いた。動物実験は日本大学動物実験委員会（承認番号: AP20M011-1）および日本大学遺伝子組換え実験安全委員会（承認番号: 2019 医 22）の承認を得て行った。

2. DFATの調整

この研究には、緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP) トランスジェニックラットから精製されたGFP標識DFATを用いた [49]。DFAT調製法の概要を図1に示す。GFPトランスジェニックラットから採取した腹腔内脂肪組織約1gを細かく切り刻み、0.1%コラゲナーゼ溶液 (KOKEN) を用いて37°Cで1時間穏やかに攪拌しながら消化処理を行った。溶液を濾過し3分間遠心分離した後に浮遊層 (成熟脂肪細胞分画) を回収しPhosphate-buffered saline: PBS (Gibco) で洗浄した後、細胞を20%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) (SAFC Biosciences) を添加したDulbecco's modified Eagle's medium: DMEM (Invitrogen) で満たされた25 cm²培養フラスコに播種した。細胞は5%CO₂中37°Cの条件下で培養した。脂肪細胞が浮遊しフラスコの上部内側の天井面に付着した状態で培養し、7日後に培地を除去してフラスコを逆さにして細胞がフラスコ底にくるようにした。細胞増殖がコンフルエントに達するまで、培地を4日ごとに交換した。80-90%コンフルエントに到達後、トリ

プシンEDTAを用いて細胞を剥離し、細胞懸濁液とした後、凍結保存した。凍結保存細胞を解凍し付着培養にて増殖させた後、実験に使用した。GFP陽性細胞の観察および写真撮影は蛍光顕微鏡（BZ-X710, KEYENCE）を用いて行った。

3. 一側性反回神経麻痺ラットの作成法

SDラットに対し、塩酸メドトミジン（0.15 mg/kg）、ミダゾラム（2 mg/kg）、酒石酸ブトルファンール（2.5 mg/kg）腹腔内投与による全身麻酔を施行した。皮膚切開部周囲を除毛し、仰臥位にて前頸部を正中で切開し、前頸筋群を左右に分け両側反回神経を明視下に置いた。神経処置は実体顕微鏡（SZ2-ILST; OLYMPUS）下に行った。両側の反回神経が確認されるよう気管周囲の結合織を剥離した後、左反回神経を第7気管輪の高さで10 mm切除して、神経の両断端を5-0 バイクリルにて結紮し閉創した（図2）。処置後、硬性内視鏡（TrueView II; OLYMPUS）を用いてラットの喉頭を観察し、左側の声帯運動が消失し左反回神経切除が適切に行われたことを確認した。

4. 声帯筋注入法

一側反回神経麻痺ラットに対する萎縮声帯筋移植を行うため、声帯筋注入手技の確認として声帯注入に使用する注入針とマイクロシリンジを設計した（Ito works）。注入針はラットにより喉頭の個体差があるため、対応できるよう先端を30°、45°の二種類の弯曲したものをデザインし、注入時の内視鏡との干渉を考慮して途中までが24Gと太く、先端のみが30Gと細くなっているテーパリ

ング針をデザインした (図 3)。SD ラットに対し、全身麻酔を施行したのち、硬性内視鏡 (TrueView II; OLYMPUS) 観察下で特注の注入針とマイクロシリンジを用いて、左披裂軟骨の前外側の粘膜下に穿刺し粘膜下まで針を進め、ピオクタニンを含浸したコラーゲン 10 μ l を注入した。直後に CO₂ ガスによる安楽死処置を行い、喉頭を摘出して肉眼的評価を行った。その結果、肉眼的に甲状軟骨外側面から声帯筋の高位にピオクタニンが透見され、ピオクタニンが漏出することなく注入が行われたことを確認した (図 4)。次に、調製した GFP 標識 DFAT (1.0 \times 10⁶ cells / 10 μ l) (図 5A) を含浸させた生理食塩水 10 μ l を同様の手技で左披裂軟骨の前外側の粘膜下に注入し、喉頭組織では声帯筋内に GFP 陽性細胞の集簇所見により、DFAT が声帯筋に適切に注入されていることを確認した (図 5B)。

5. 実験プロトコール

声帯内注入による DFAT 移植実験のプロトコールの概略を図 6 に示す。雄性 8 週齢の SD ラット (n=34) を前述の作成法で左反回神経切除を行い一側反回神経麻痺ラットを作成した後、コントロール群 (生理食塩水) (n=12)、DFAT 群 (n=11)、DFAT+bFGF 群 (n=11) の 3 群に群分けした。神経切除後 5 週のタイミングで、コントロール群は生理食塩水 10 μ l、DFAT 群は DFAT 1.0 \times 10⁶cells / 生理食塩水 10 μ l、DFAT+bFGF 群は DFAT 1.0 \times 10⁶cells + bFGF 500 ng / 生理食塩水 10 μ l を投与した。bFGF の投与量に関しては、ラットを用いた既報で 200 ng - 2000 ng / 頭の投与により、声帯筋萎縮の抑制が認

められたという報告や、ヒトを対象とした声帯内注入において、50 µg の bFGF が使用されている[26][50]ことから、ラット（体重約 450 g）への体重換算などを行った結果、本研究では投与量を 500 ng / 頭と設定した。bFGF は、250 µg の凍結乾燥ヒト組換え bFGF を含むフィブラストスプレー250（Kaken Pharmaceutical Co.）を使用直前に、5 mL の生理食塩水に溶解して使用した。注入法として、塩酸メデトミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファノール腹腔内注射による全身麻酔下に、挿管台（KN-1014; Natsume works）上にラットを固定し、上記声帯内注入法を用いて左声帯筋内に注入を行った。

内視鏡的評価は注入処置直前と処置後 4 週の時点で行なった。組織学的評価は、注入処置後 2 週に各群 n=3 で喉頭を摘出し、DFAT 移植の効果が筋組織の生存に作用した可能性について、アポトーシス細胞の評価として TUNEL 染色を行った。また筋新生に作用した可能性について、増殖細胞の評価として Ki-67 染色を行なった。処置後 4 週に各群 n=8-9 で声帯筋萎縮およびコラーゲン蓄積量の評価のため Hematoxylin & Eosin（H-E）染色および Masson's Trichrome 染色を行った。

6. 喉頭内視鏡検査

ラットの喉頭の評価は硬性内視鏡を用いて行った。塩酸メデトミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファノール全身麻酔下に、挿管台にラットを固定し、舌を前方へ牽引しながら、硬性内視鏡を用いて喉頭運動の評価を行った。評価のタイミングは、注入処置直前、処置後 4 週間の時点で行った。ラットの喉頭は

声帯が小さく、披裂軟骨が大きい特徴がある。そのため内視鏡所見については、披裂軟骨の可動性に注目して声帯運動の評価を行った。披裂軟骨の内転角度の評価は、画像解析ソフトウェア（ImageJ）を用いて、声門の正中線と、両側の披裂軟骨の接点から左（処置側）披裂軟骨に引いた接線のなす角度で評価し、注入直前と注入後 4 週間での披裂軟骨の内転偏位角度と内転偏位角度の改善率を評価した（図 7）。

7. 組織学的検討

声帯筋の組織学的検討は、摘出した喉頭を 10% 中性緩衝ホルマリン（Fujifilm）で固定後してパラフィン包埋した。披裂軟骨が認められるレベルで 5 μm の組織切片標本を作成し、H-E 染色及び Masson's Trichrome 染色を施し、蛍光顕微鏡（BZ-x710; KEYENCE）を用いて観察し写真撮影した。左右の披裂軟骨の形状が最も対称に近い切片を選択し、萎縮声帯筋の断面積およびコラーゲン蓄積量の評価を行った。声帯筋断面積の評価は、H-E 染色サンプルの光学顕微鏡写真を画像解析ソフトウェア（ImageJ）を用いて、声帯筋の外周をトレースして 2 色化を行い、筋層部分の断面積を正常側（uninjured side）に対する処置側（injured side）を計測後、断面積割合（I/U 比）を算出した（図 8A）。コラーゲン蓄積量の評価は、Masson's Trichrome 染色サンプルの光学顕微鏡写真を ImageJ で声帯筋の外周をトレース後、筋層内における青色染色されたコラーゲン部分を抽出し、その面積割合 I/U 比を算出した（図 8B）。

8. 免疫組織染色

声帯筋の免疫組織学的検討は、摘出した喉頭を 10%中性緩衝ホルマリンで固定させ、パラフィン包埋し、披裂軟骨が認められるレベルで 5 μm の組織切片標本を作成した。脱パラフィン処理後、抗原賦活処理としてサンプルを target retrieval solution (Dako Cytomation) に浸透しオートクレーブを 15 分間行った。復温後、ブロッキングバッファー (1%BSA, 0.5% TritonX 含有 PBS) を用いて 1 時間反応させ、非特異的反応阻害処置を行った。PBS で洗浄後、一次抗体として、Goat anti-GFP antibody (1:100; Abcam)、細胞増殖マーカーとして Rabbit anti-Ki67 antibody (1:100; Abcam) を用いて 4°Cで一晩反応させた。翌日、PBS で 2 回洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor 647 Donkey anti-goat IgG (H+L) antibody (1:400; Invitrogen)、Alexa Fluor 488 Donkey anti-rabbit IgG (H+L) antibody (1:400; Invitrogen) を用いて室温で 1 時間反応させた。その後 PBS で洗浄後、Hoechst 33342 (1:1000; Invitrogen) を用いて室温で 15 分間反応させた。蒸留水で洗浄し、ProLong™ Gold antifade mountant (Invitrogen) を用いて封入した。アポトーシスマーカーである TUNEL 陽性細胞の検出は DeadEnd™ Fluorometric TUNEL system (Promega) を用いた。キットのプロトコールに従って染色標本を作成した。作成した全ての染色標本は蛍光顕微鏡または共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; OLYMPUS) で観察して撮影を行った。TUNEL 陽性細胞および Ki67 陽性細胞は、声帯筋断面全域を合成画像で撮影し、ImageJ を用いてカウントし、単位断面積あたりの各陽性細胞数 (cells / mm²) を算出した。

9. 統計学的評価

得られた定量データは One-way analysis of variance (One-way ANOVA) 試験を用いて統計解析し、Post-hoc test として Tukey's multiple comparisons test を使用した。 $p < 0.05$ の場合に統計学的に有意であると判定した。

第4章 結果

1. 声門間隙の改善効果

各群の声門間隙の改善効果を比較するため、喉頭内視鏡を用いて披裂軟骨の内転偏位角度と内転偏位角度の改善率を評価した。各群における注入直前と注入4週後の代表的な喉頭内視鏡写真を図9に示す。注入直前と注入4週間後での内転偏位角度の差（平均値±標準偏差）は、コントロール群（ $0.06 \pm 0.45^\circ$ ）と比較して、DFAT群（ $2.70 \pm 1.52^\circ$ ）、DFAT+bFGF群（ $2.55 \pm 1.30^\circ$ ）で有意（ $p < 0.001$ ）に大きかった（図10A）。また、内転偏位角度の改善率はコントロール群（ $0.80 \pm 6.36\%$ ）と比較して、DFAT群（ $25.07 \pm 9.10\%$ ）、DFAT+bFGF群（ $28.20 \pm 13.76\%$ ）で有意（ $p < 0.001$ ）に高かった（図10B）。DFAT群とDFAT+bFGF群間では、内転偏位角度と内転偏位角度の改善率に有意差は認められなかった。以上の結果より、萎縮声帯筋内へのDFAT単独注入およびDFATとbFGFの併用注入は、声門間隙の縮小による声門閉鎖不全の改善効果を示すことが明らかになった。

2. 声帯筋萎縮に対する効果

各群における声帯筋萎縮に対する効果を比較するため、声帯内注入後4週時点における処置側声帯筋の萎縮の程度をH&E染色像にて評価した。各群の声帯筋断面積のI/U比（平均±標準偏差）は、コントロール群（ 0.690 ± 0.141 ）に対してDFAT+bFGF群（ 0.809 ± 0.108 ）で有意（ $p < 0.05$ ）に高値を示した（図11）。DFAT群（ 0.906 ± 0.184 ）はコントロール群と比較して声帯筋断面積のI/U比は高い傾向にあったが、有意な差は認められなかった。

各群における声帯筋内のコラーゲン蓄積効果を比較するため、声帯内注入後4週時点での処置側声帯筋内のコラーゲン量をMasson's Trichrome染色像にて

評価した。各群の声帯筋内コラーゲン蓄積量の I/U 比（平均値 ± 標準偏差）は、コントロール群（ 1.663 ± 0.822 ）と比較して、DFAT 単独群（ 3.716 ± 1.695 ）、DFAT + bFGF 群（ 3.432 ± 0.960 ）では有意（ $p < 0.05$ ）に高値を示した（図 12）。DFAT 群と DFAT + bFGF 群の間では有意差は見られなかった。

3. 萎縮声帯筋組織のアポトーシスと細胞増殖に対する効果

各群における萎縮声帯筋組織のアポトーシスと細胞増殖を比較するため、処置後2週時点の声帯筋組織におけるTUNEL陽性細胞およびKi-67陽性細胞の評価を行った。処置側声帯筋内のTUNEL陽性細胞数（平均値 ± 標準偏差）はコントロール群（ 68.7 ± 15.0 ）と比較してDFAT群（ 24.2 ± 17.0 ）およびDFAT+bFGF群（ 20.5 ± 7.6 ）では有意（ $p < 0.05$ ）に低かった（図13）。一方、DFAT群とDFAT+bFGF群との間には有意な差は認められなかった。また、処置側声帯筋内のKi-67陽性細胞数は3群間に明らかな有意差は認められなかったが、コントロール群とDFAT群と比較して、DFAT+bFGF群では高い傾向にあった（図14）。

第5章 考察

本研究ではラット反回神経切除により萎縮させた声帯筋に DFAT 単独または bFGF との併用で注入することにより、声帯筋萎縮の抑制や声門閉鎖不全の改善が誘導されるかを評価した。その結果、DFAT 群および DFAT+bFGF 群では声門間隙の縮小による声門閉鎖不全の改善効果が認められた。DFAT 群と DFAT+bFGF 群では声帯筋内のコラーゲン蓄積量の増加を認め、さらに DFAT+bFGF 群では声帯筋萎縮の抑制効果を認めた。免疫組織学的検討では DFAT によるアポトーシスの抑制効果が示唆された。

内視鏡を用いて行った声門間隙の評価では、DFAT 群と DFAT+bFGF 群で声帯内注入による声門間隙の縮小による声門閉鎖不全の改善効果が示された。これまで声門閉鎖不全に対する治療として声帯内注入術が行われ、様々な材料が使用されてきた。アテロコラーゲンやヒアルロン酸では効果は一時的であり頻回な投与が必要とされ[24]、細胞移植としては自家脂肪細胞注入が行われているが、注入後早期に脂肪細胞が吸収されることにより、効果の持続性が乏しいことが報告されている [51]。また、臨床応用されているアテロコラーゲンはその抗原性からアレルギー反応にも注意が必要となる。このように声帯内注入の効果の減弱の原因には、注入材料の吸収、漏出、拡散などが挙げられ、理想的な注入材料には局所へ長期的に留まること、効果の持続性、アレルギーや拒絶反応などの副作用がないこと、材料の調達が容易であることなどが求められる。本結果では DFAT 群および DFAT + bFGF 群で声門間隙の縮小が認められたことより、DFAT が注入された声帯内に生着し生存し続けることによって萎縮声

帯筋に持続的な bulking effect をもたらし、その結果、声門間隙の縮小が維持されたことが考えられる。

組織学的検討では、DFAT+bFGF 群では声帯内注入による声帯筋萎縮の抑制効果が示された。DFAT からは VEGF、HGF、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、tissue inhibitor of metalloproteinase-1,2 (TIMP-1,2)、transforming growth factor- β (TGF- β) などが分泌され、創傷治癒促進作用、や血管新生作用を有することが報告されている[52]。本実験では DFAT の分泌する液性因子によるパラクライン効果に加え、bFGF の血管新生作用や組織修復作用による効果、さらには bFGF が DFAT に作用し、治療活性を高めた結果、声帯筋萎縮を抑制した可能性が考えられる。一方、本研究では血管新生や筋新生の評価は行なっておらず、今後もさらなる免疫組織学的検討などが望まれる。

萎縮声帯筋内のコラーゲン定量を行った結果、DFAT 群および DFAT+bFGF 群ではコラーゲン蓄積効果が示された。臨床ではアテロコラーゲンが声帯内注入の材料としても用いられているが、その成分は I 型コラーゲンと III 型コラーゲンが含まれ、I 型コラーゲンが主成分であることが知られている。声帯粘膜固有層浅層には細くて柔軟性のある III 型コラーゲンが多く分布しており、発声時の滑らかな声帯粘膜波動に必要である。一方で I 型コラーゲンは線維性コラーゲンであり、声帯粘膜固有層浅層に増えることで声帯振動を阻害する可能性が報告[24]されているが、強度と弾性を持っており細胞外マトリックスとして支持組織として適している。Soejima ら[53]は、全層開放創に対する DFAT 移植により、基底膜の構成に関与する IV 型コラーゲンとラミニン-5 の合成が増強

されたことを示している。骨格筋の間葉系前駆細胞である **fibro-adipogenic progenitors (FAP)** は衛星細胞を調節して筋肉の再生や恒常性に関与するが、脱神経下では筋萎縮と線維化を促進することが報告されている[54]。DFAT が誘導する HGF は、創傷治癒過程において線維芽細胞を誘導し、コラーゲン合成への関与が知られている。bFGF 自体も線維化への影響が知られており、コラーゲン合成の調節に関与する。本研究ではコントロール群と比較して DFAT 単独群および DFAT+bFGF 群でコラーゲン蓄積量の増加を認めており、脱神経下の萎縮筋において HGF や bFGF などの因子が線維化の促進に関与してコラーゲン合成が促進した可能性が考えられる。一方、今回コントロール群においても処置側のコラーゲン蓄積量の増加が認められた。この理由として脱神経下における声帯筋が萎縮する過程で、線維化によるコラーゲン蓄積が生じた可能性が考えられる。実際、ラット坐骨神経切除モデルの萎縮ヒラメ筋においてコラーゲン合成の促進が認められたことが報告されている[55]。一方、生理食塩水を注入した際の針の侵襲により線維化が誘導された可能性も否定できない。今後、脱神経のみで針刺入をしない群や、針刺入のみの群でのコラーゲン増殖の有無を検証することも必要と思われる。

免疫組織染色での検討では DFAT による抗アポトーシス作用や、bFGF による増殖細胞の誘導の影響が示唆された。脱神経における筋肉ではミトコンドリアの減少と筋合成の低下、タンパク分解の促進が起こり、さらにアポトーシスの誘導により筋核が減少し筋萎縮が起こる [56] [57]。HGF は前述した血管新生、抗線維化作用の他、細胞増殖作用や Bcl-2 を介した抗アポトーシス作用な

どの生理活性が知られている[58][59]。bFGFには血管新生や細胞増殖能があり、アポトーシス抑制に関与することも知られている。これらを踏まえると、本結果では脱神経下で誘導された声帯筋のアポトーシスが DFAT より分泌された HGF によりアポトーシスが抑制された可能性が示唆される。

細胞増殖の評価では、コントロール群と比較して DFAT+bFGF 群で Ki-67 陽性細胞が増加傾向であったが有意差は得られなかった。Ki-67 陽性を示した細胞は各群とも筋組織周囲や間質に多く、筋肉細胞や線維芽細胞である可能性が高いと考えられた。

本研究のリミテーションとして以下の事項がある。①今回、細胞移植の効果を 4 週間の時点でのみ評価している。今後より長期に観察することにより移植細胞の長期的な生着性やどのような細胞に分化しているか、さらには持続的な治療効果が得られるか確認することが望まれる。②今回、bFGF 単独の治療効果を評価していない。DFAT+bFGF 併用の治療効果の高さを明確にするためにも、bFGF 単独投与の治療効果や、異なった bFGF 投与量による効果の違いを検討する必要がある。

反回神経麻痺による声帯筋萎縮患者は今後も増加すると考えられる。またその患者層も高齢化が予想される。DFAT は少量の脂肪細胞から短期間で大量の高純度な細胞の調製が可能であり、痩せている、あるいは ADL の悪い患者など、充分量の脂肪細胞が採取困難な患者からも比較的 low-injury で安定して調達が可能であると考えられ、今後の声帯筋萎縮に対する新たな細胞治療として期待できる。

第6章 まとめ

本研究ではラット反回神経切除により萎縮させた声帯筋に DFAT 単独または bFGF との併用で注入することにより、萎縮した声帯筋の再生や声門閉鎖不全の改善が誘導されるかを評価した。その結果、DFAT 群および DFAT+bFGF 群では声門間隙の縮小による声門閉鎖不全の改善効果が認められた。DFAT 群と DFAT+bFGF 群では声帯筋内のコラーゲン蓄積量の増加を認め、さらに DFAT+bFGF 群では声帯筋萎縮の抑制効果を認めた。免疫組織学的検討では DFAT によるアポトーシスの抑制効果が示唆された。声門閉鎖不全現在臨床では萎縮声帯に対して様々な材料を用いた声帯内注入治療は行われているが、安全性、簡便性、永続性、機能性のある治療は確立されていない。本研究は、反回神経麻痺によって萎縮した声帯筋へ DFAT を注入することで筋肉の再生を促し、声門閉鎖不全の改善効果を示した初めての報告である。今後新たな治療法を検証していく上で、DFAT 単独または DFAT と bFGF の併用による萎縮声帯筋への注入は、反回神経麻痺に伴う声門閉鎖不全に対する新たな治療法として期待できる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なるご指導を賜りました日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 松本太郎教授に深謝いたします。そして研究全般にご支援いただきました、日本大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野 大島猛史教授、松崎洋海准教授に深謝いたします。研究を支えていただいた日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 萩倉一博先生、風間智彦先生、松尾麻梨江氏、並びにスタッフの皆様、日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野 羽尾裕之教授、鈴木真由美氏、並びにスタッフの皆様、日本大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科分野 野村泰之先生、研究助手 前田美代子氏、医学研究支援部門 地家豊治氏にも心から厚く御礼申し上げます。

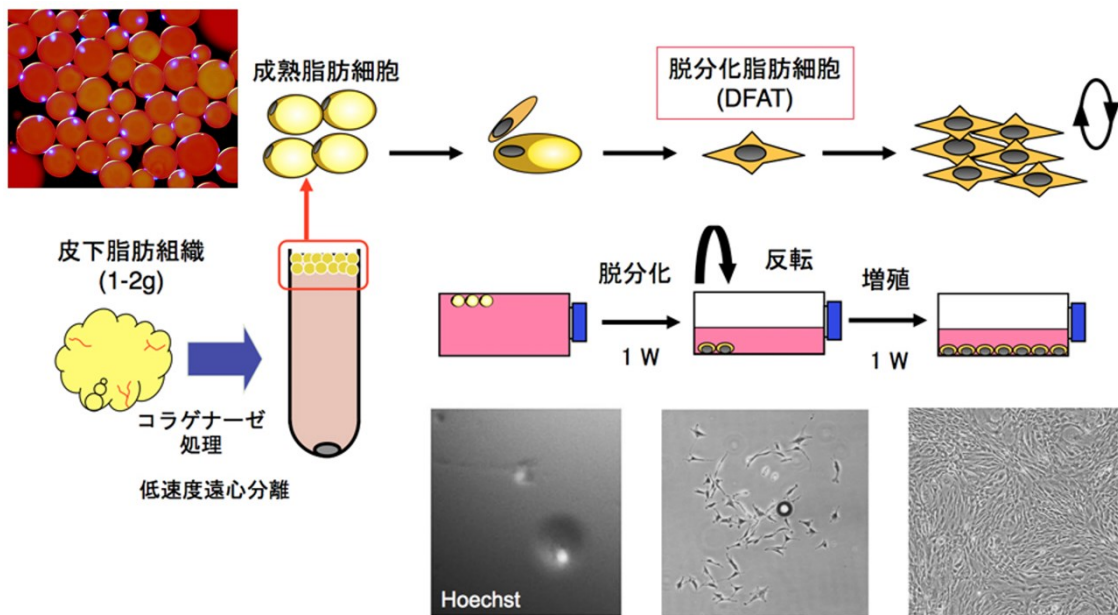


図 1 . DFAT の調整法

ラット皮下脂肪を 1～2 g 摘出し、コラゲナーゼ処理を行い低速遠心分離を行う。表層へ浮遊した成熟脂肪細胞を採取し、20% FBS 含有 DMEM を満たした T-25 細胞培養フラスコ内で天井培養する。天井に付着した脂肪細胞が非対称分裂を起こし、線維芽細胞様の形態を示す DFAT が産生される。7 日後にフラスコを上下反転させ、通常の付着培養を行うことで DFAT は急激に増殖する。

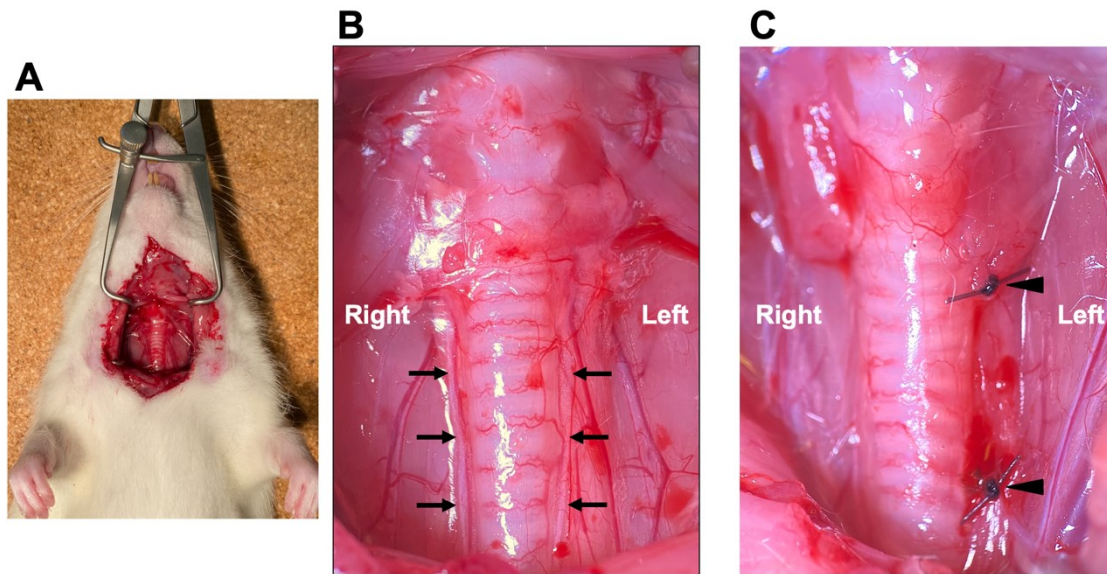


図 2. ラット反回神経麻痺モデル作成法

前頸部を縦切開し、前頸筋群を左右に分けて、両側反回神経（矢印）を露出した。左反回神経を周囲から剥離して切除して、両側断端を結紮した。A: 肉眼像
 B: 実体顕微鏡像 反回神経切除前（矢印: 反回神経）（C: 実体顕微鏡像 反回神経切除後（矢頭: 切除反回神経断端結紮部）

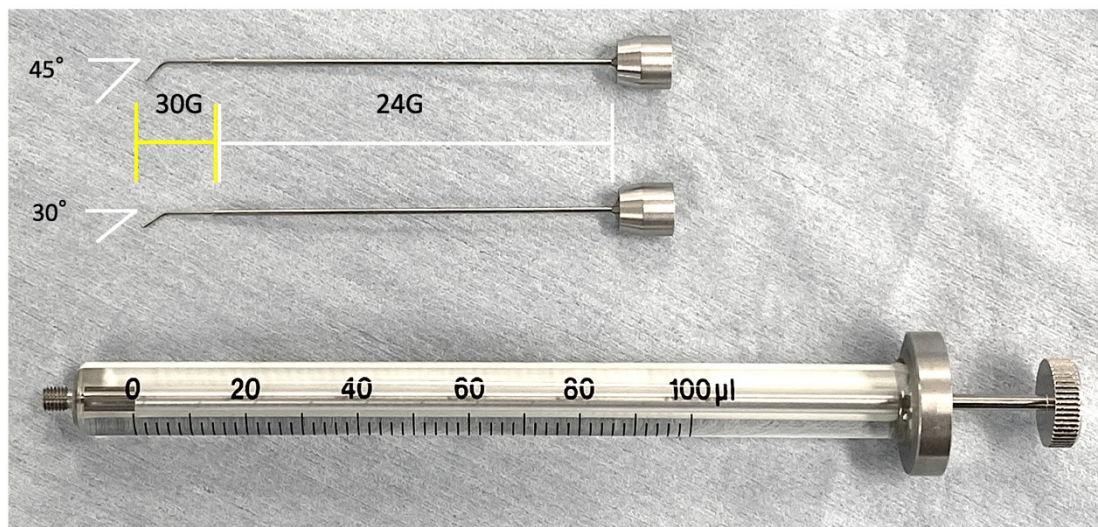


図 3. 声帯注入針の設計

喉頭の個体差があるため、適宜対応できるように先端を 30°、45°の二種類の弯曲したものをデザインし、注入時の内視鏡との干渉を考慮して途中までが 24G と太く、先端のみが 30G と細くなっているテーパリング針をデザインした。

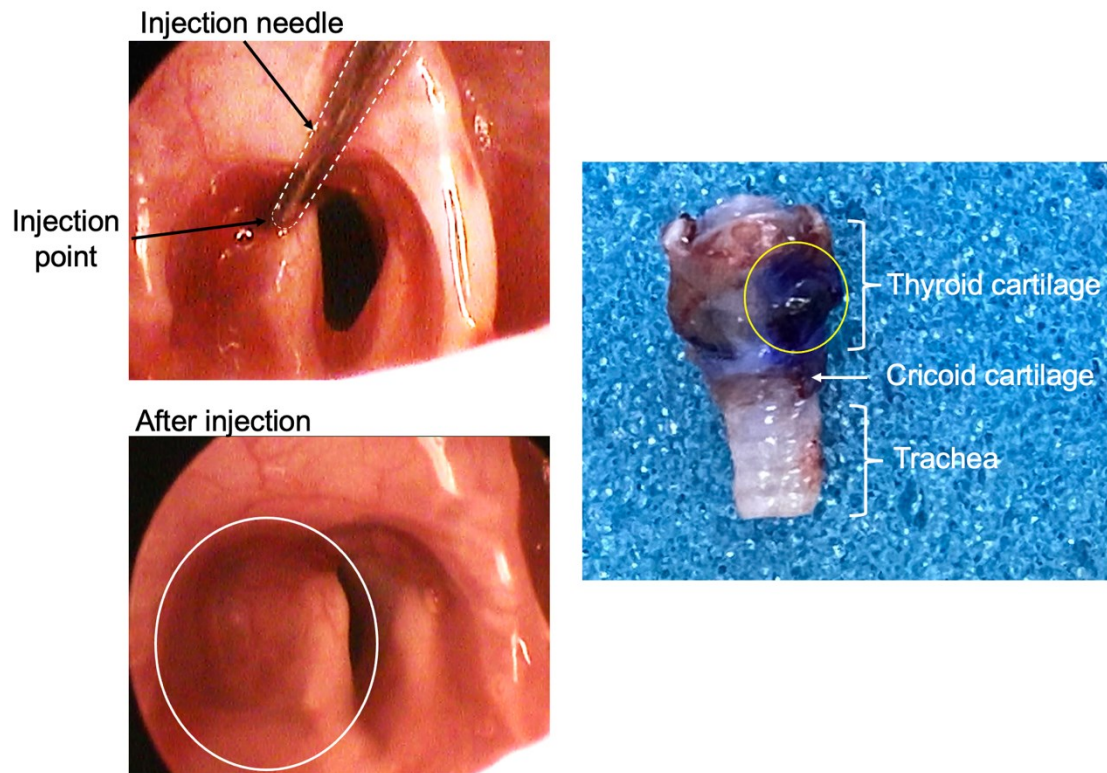
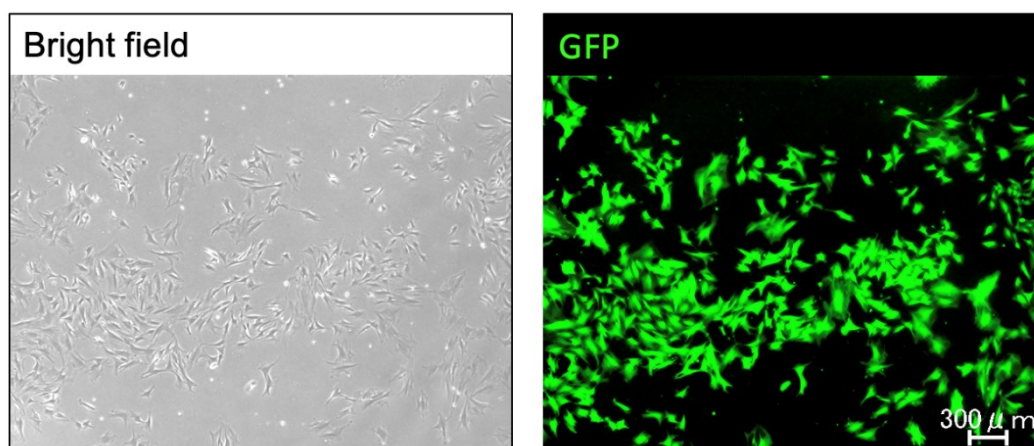


図 4. 声帯内注入手技の検討結果

内視鏡下で経口的に左声帯筋に注入針を穿刺し、ピオクタニン色素を含有したコラーゲンを 10 μ l 注入した結果、声帯周囲の粘膜下にピオクタニンの色素が透見でき、ピオクタニンが漏出することなく目的部位に注入されたことを確認した。

A



B

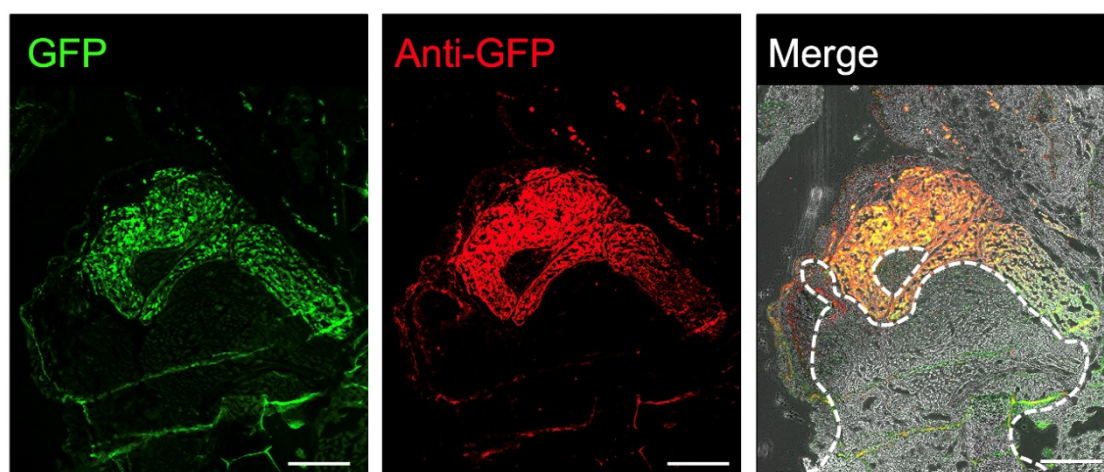


図 5. DFAT 声帯筋移植による局在の確認

内視鏡下で経口的に左声帯筋に注入針を穿刺し、DFAT 細胞懸濁液 (10 μ l) を注入し、直後に摘出した喉頭組織の抗 GFP 抗体による蛍光免疫染色を行った。

A: 培養中の DFAT Scale bar = 300 μ m. B: 移植後の喉頭組織の蛍光免疫染色画像 Scale bar = 200 μ m

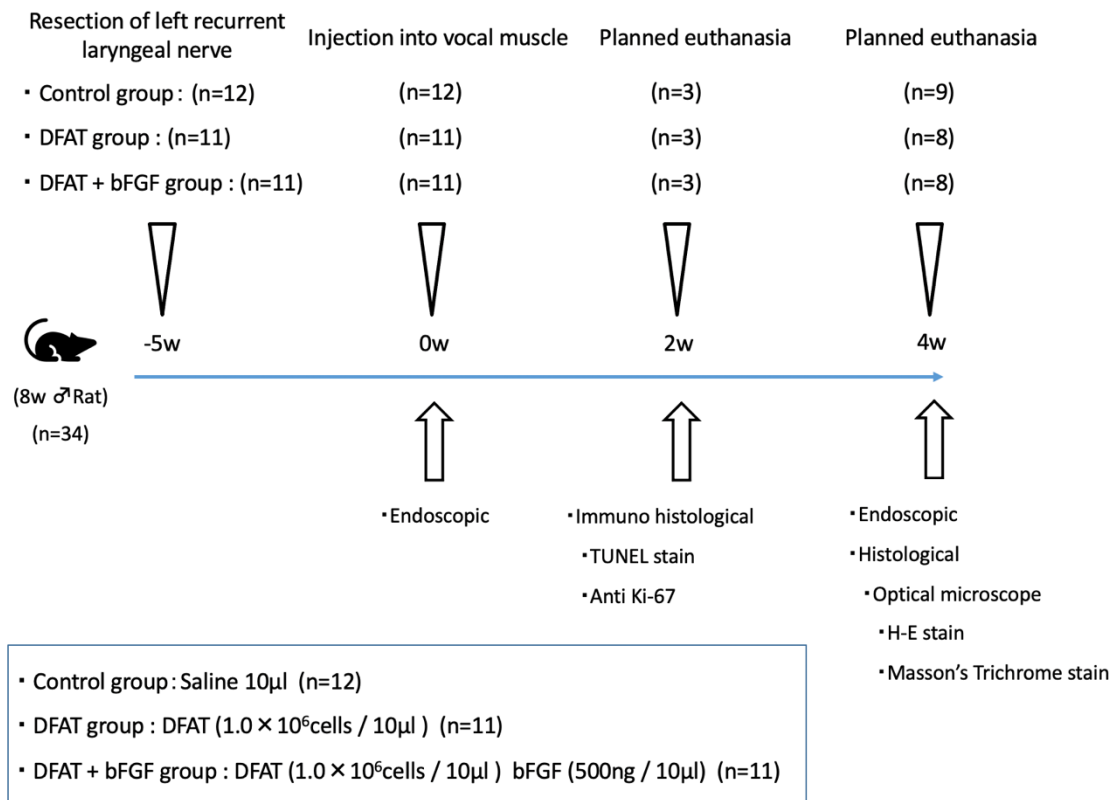


図 6. 実験プロトコール

SD ラット (n=34) を Control 群 (n=12)、DFAT 群 (n=11)、DFAT+bFGF 群 (n=11)に分け、左反回神経切除を行なった 5 週間後に声帯筋内に Control 群 (生理食塩水 10 μ l)、DFAT 群 (DFAT 1 \times 10⁶cells + 生理食塩水 10 μ l)、DFAT+bFGF 群 (DFAT 1 \times 10⁶cells + bFGF 500 ng + 生理食塩水 10 μ l) の注入を行った。評価項目として、処置後 2 週時点で声帯筋の TUNEL 染色及び Ki-67 に対する免疫組織染色を行った (各群 n=3)。処置後 4 週では声帯筋の H-E 染色と Masson's Trichrome 染色による組織学的評価を行なった(各群 n=8-9)。喉頭内視鏡検査は処置直前と処置後 4 週間で行った。

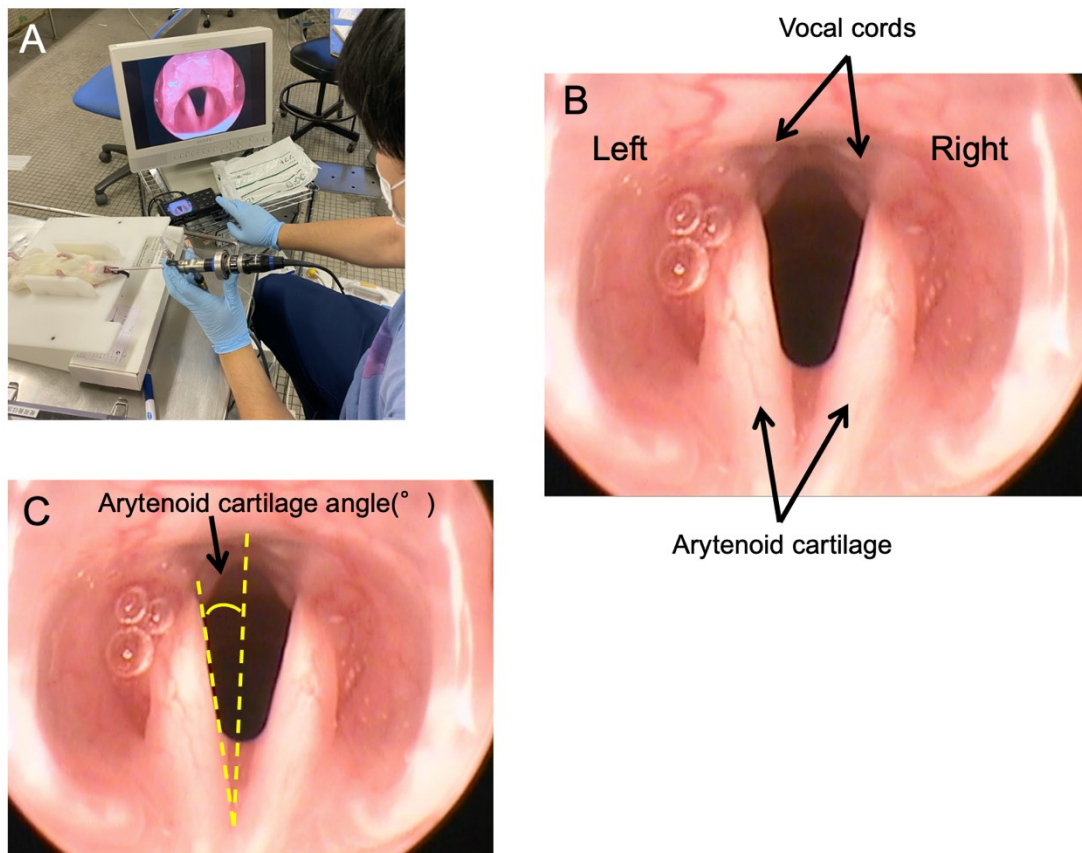


図 7. 喉頭内視鏡検査の方法と声門間隙の評価

(A) 全身麻酔を施したラットを挿管台に固定し、経口腔的に整形外科で用いられる小関節用の内視鏡を挿入しラットの喉頭を観察した。(B) 内視鏡画像所見 (C) 披裂軟骨の内転偏位角度の測定法

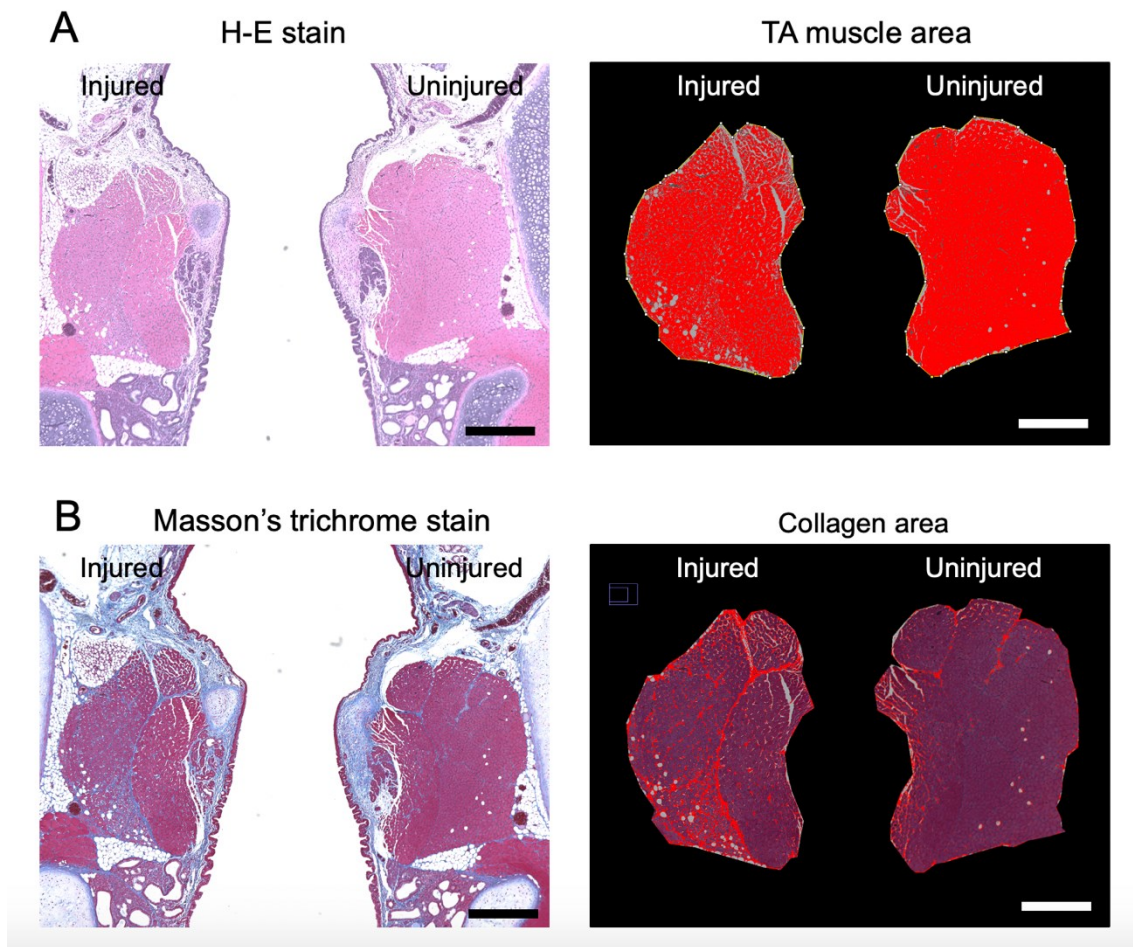


図 8. 声帯筋断面積・声帯筋内コラーゲン量の評価方法

画像解析ソフトウェア (ImageJ) を用いて声帯筋の外周をトレースし、断面内の青色に染色されるコラーゲン領域を抽出し、その面積を測定した。正常側 (untreated side) に対する処置側 (treated side) の割合 (I/U 比) を算出し定量的に評価した。A: H-E 染色での筋断面積の評価法, B: Masson's Trichrome 染色でのコラーゲン蓄積量の評価法 Scale bar = 500 μ m.

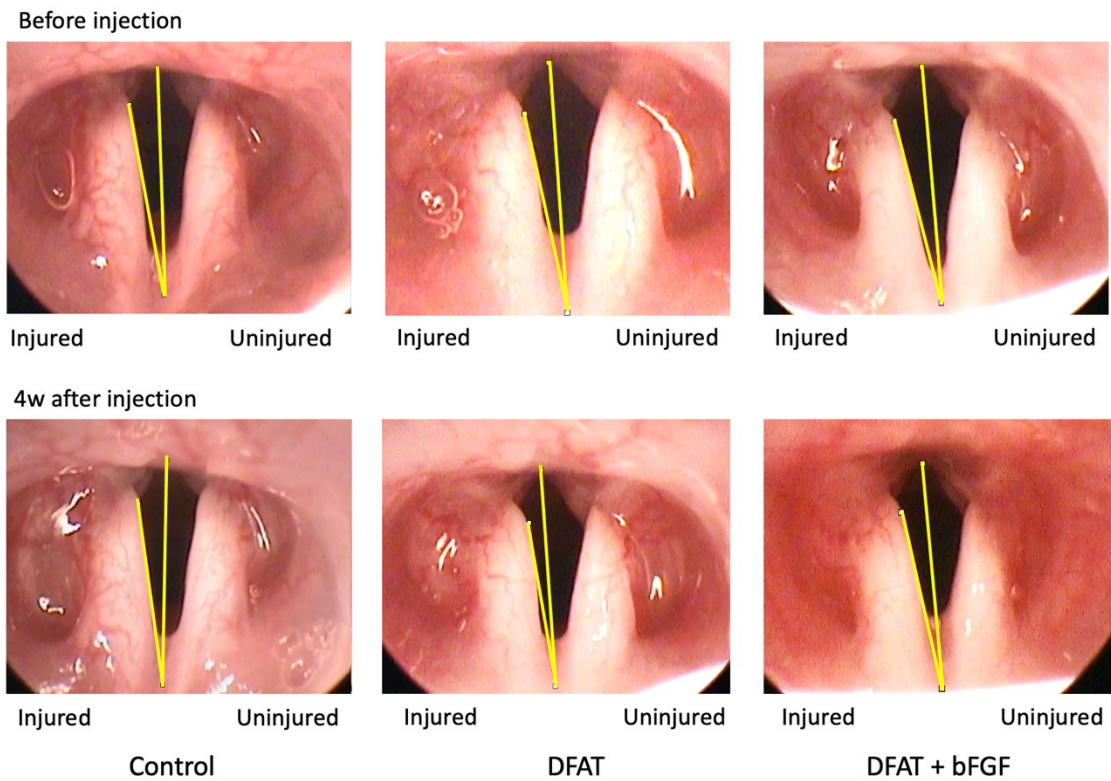


図 9. 各群における声門間隙の改善効果

喉頭内視鏡で観察した声帯の声門正中線に対する処置側の披裂軟骨の接線とのなす角度（内転偏位角度）を、注入直前と注入後 4 週時点で比較した。3 群の代表的な内視鏡画像を示す。

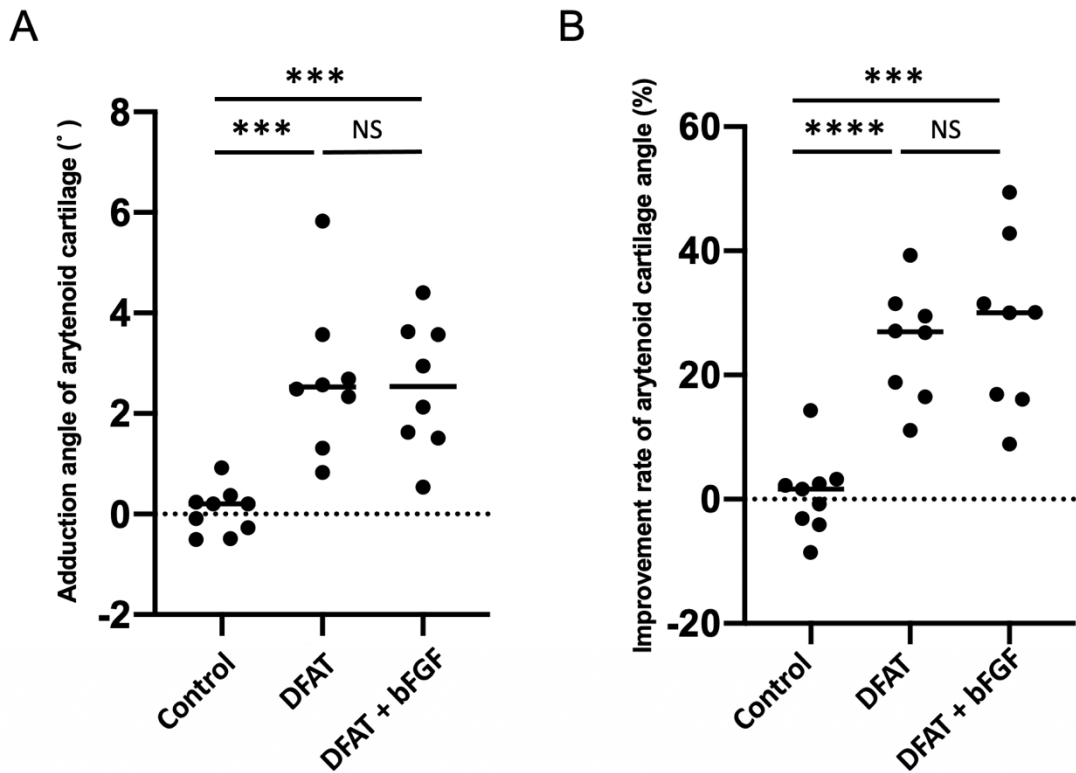
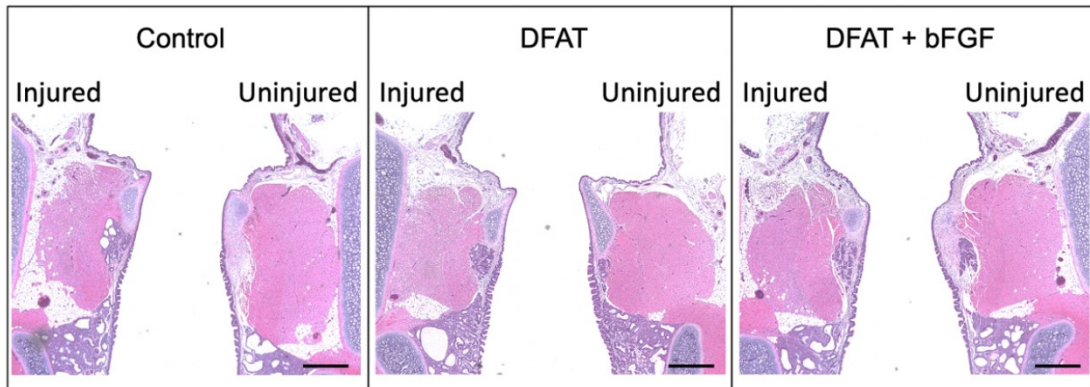


図 10. 各群における声門間隙の改善効果（定量評価）

喉頭内視鏡下で観察した声門正中線と処置側の披裂軟骨の接線とのなす角度を、注入直前と注入後 4 週間で比較した。A: 内転偏位角度 (°), B: 内転偏位角度改善率 (%) *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$ (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test) Bar: mean NS: not significant

A



B

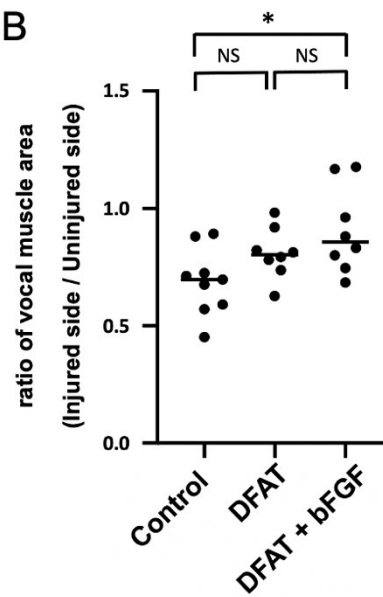
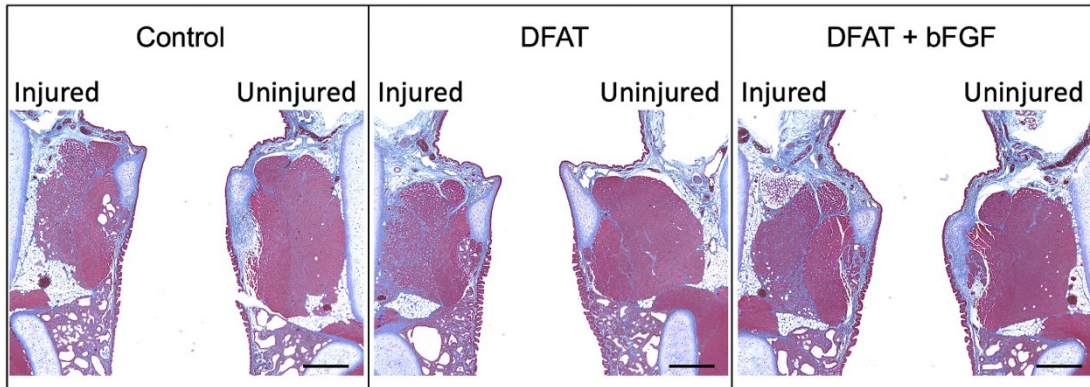


図 11. 各群における萎縮声帯筋の改善効果（定量評価）

各群の処置側声帯筋の萎縮の程度を H-E 染色像にて評価した。声帯筋断面積の I/U 比を比較した。A: 各群における代表的な声帯筋の H-E 染色像 Scale bar = 500 μm . B: 各群での声帯筋断面積の比較 * $p < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test) Bar: mean NS: not significant

A



B

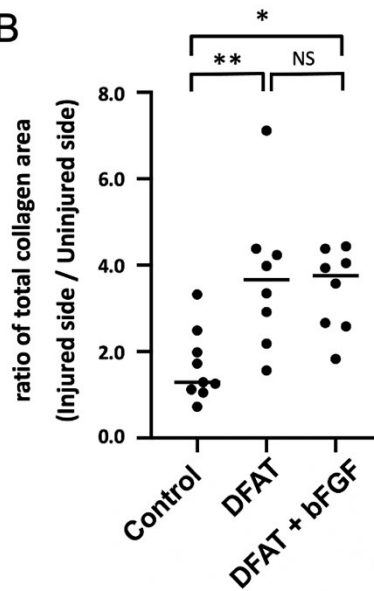


図 12. 各群におけるコラーゲン蓄積量の比較（定量評価）

各群の処置側声帯筋内のコラーゲンの萎縮の程度を H-E 染色像にて評価した。声帯筋断面積内の I/U 比を比較した。A: 各群における代表的な声帯筋の Masson's Trichrome 染色像 Scale bar = 500 μ m. B: 各群での声帯筋断面積の比較 * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test) Bar: mean NS: not significant

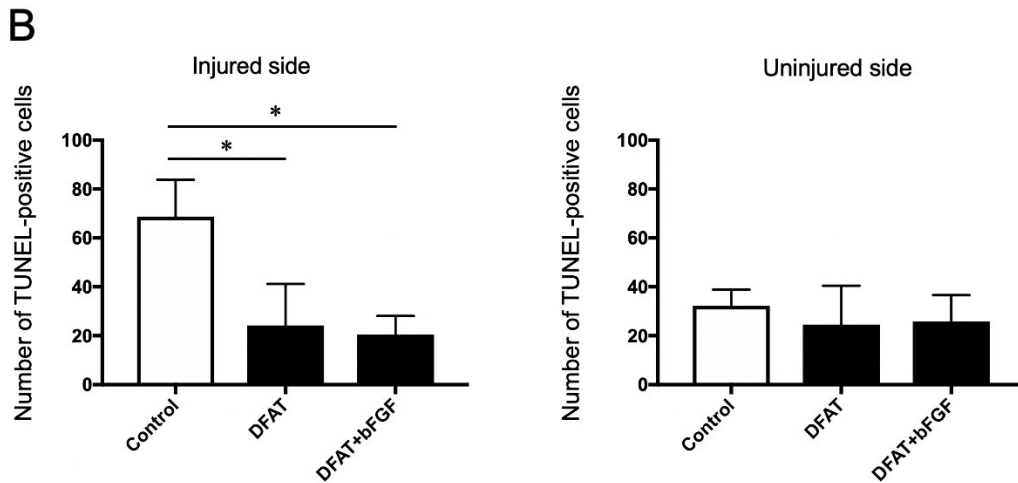
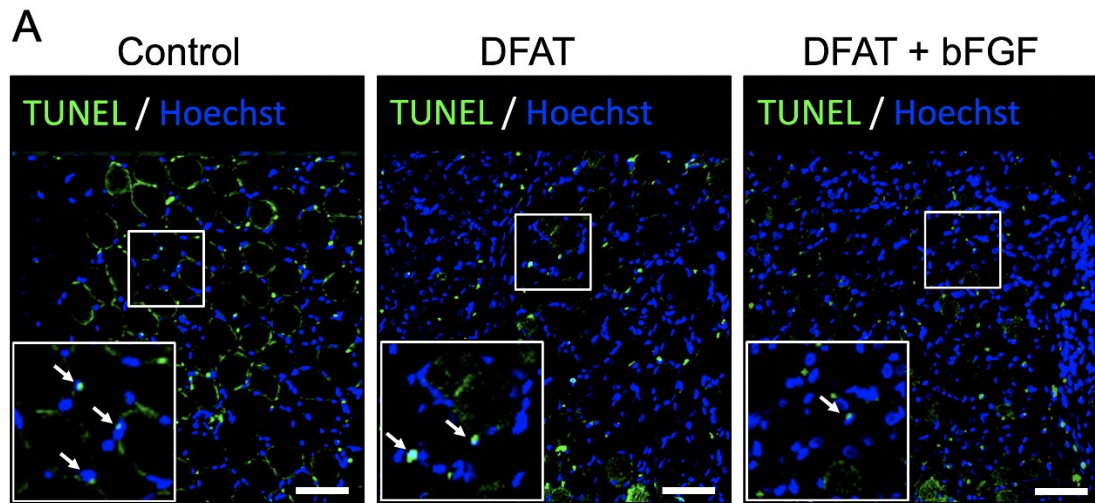


図 13. 各群における声帯筋内アポトーシス細胞の比較

各群の処置側声帯筋内のアポトーシス細胞の数を比較した。A: 各群における代表的な蛍光免疫組織像 (矢印: TUNEL 陽性細胞) Scale bar = 50 μ m.

B: 各群での声帯筋断面内の TUNEL 陽性細胞数の比較 * $p < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test) Bar: mean

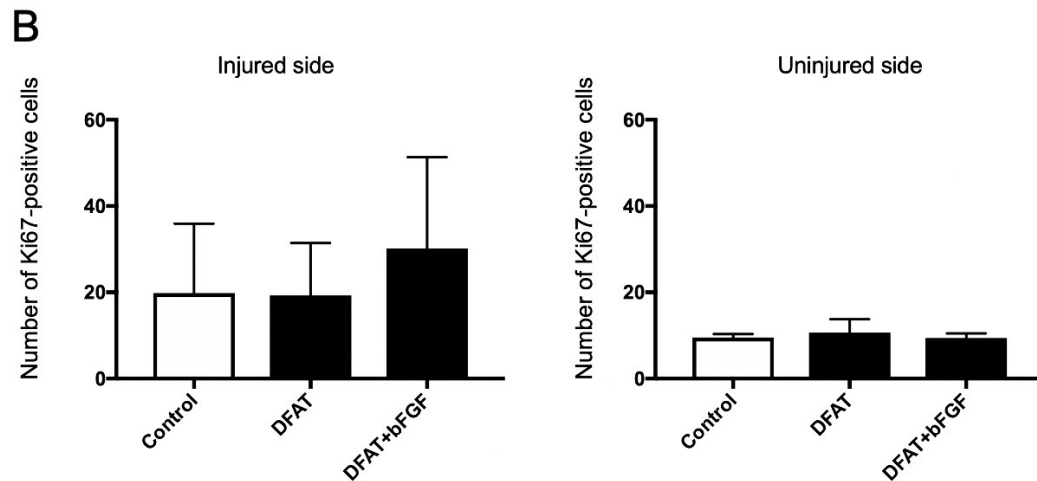
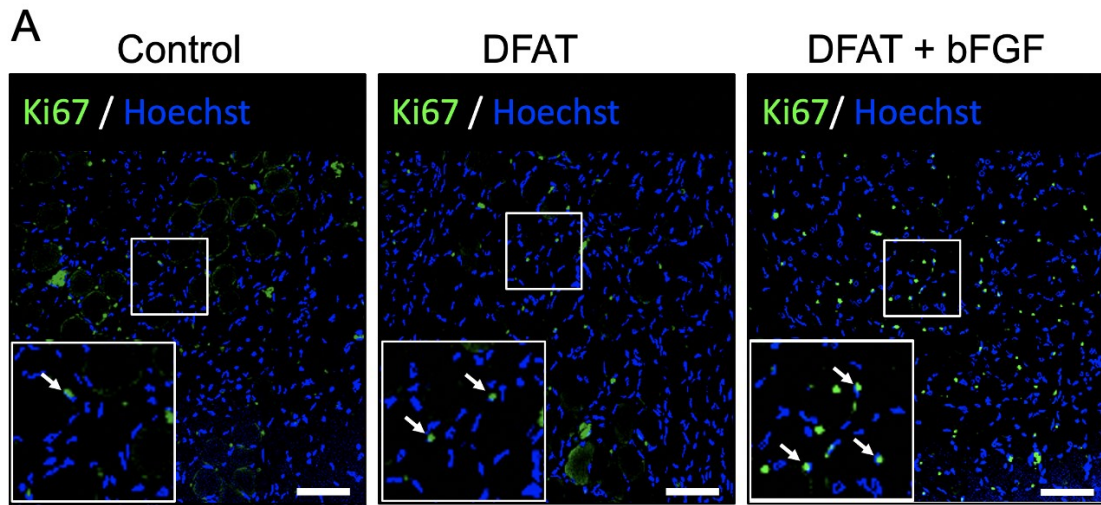


図 14. 各群における声帯筋内増殖細胞の比較

各群の処置側声帯筋内の増殖細胞の数を比較した。A: 各群における代表的な蛍光免疫組織像 (矢印: Ki-67 陽性細胞) scale bar = 50 μ m. B: 各群での声帯筋断面内の Ki-67 陽性細胞数の比較 3 群間で声帯筋断面内の Ki-67 陽性細胞数に有意差は見られなかった。Bar: mean

引用文献

1. 厚生労働省 令和 2 年(2020)人口動態統計(確定数)

<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei20/index.html>
2. 国立がん研究センター がん情報サービス 「がん登録・統計」

https://ganjoho.jp/reg_stat/index.html
3. 廣瀬 肇. 喉頭の末梢神経支配について-その文献的展望-. 耳展 1961; 4: 236-248.
4. 笠 誠一. 反回神経の臨床解剖. 耳鼻臨床 1972; 79: 12.
5. Heitmiller RF, Tseng E, Jones B. Prevalence of aspiration and laryngeal penetration in patients with unilateral vocal fold motion impairment. *Dysphagia* 2000; 15: 184-187.
6. Miyauchi A, Inoue H, Tomoda C, Fukushima M, Kihara M, Higashiyama T, Takamura Y, Ito Y, Kobayashi K, Miya A. Improvement in phonation after reconstruction of the recurrent laryngeal nerve in patients with thyroid cancer invading the nerve. *Surgery* 2009; 146: 1056-1062
7. Rosenthal LH, Benninger MS, Deeb RH. Vocal fold immobility: a longitudinal analysis of etiology over 20 years. *Laryngoscope* 2007; 117: 1864-1870.
8. Kisaki H, Kurokawa H, Nakamura K. Clinical Analysis of 109 Patients with recurrent laryngeal nerve paralysis. 耳鼻臨床 1998; 91 (5) ; 509-513
9. 湯本英二. 喉頭麻痺の病態と治療. 熊本大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室, 熊本, 1-177頁.
10. 高野 真吾, 二藤 隆春, 溜箭 紀子, 木村 美和子, 田山 二郎. 当科における混合性

喉頭麻痺症例の臨床的検討. 日気食会報 2010; 61: 273-281.

11. Miyauchi A, Matsusaka K, Kihara M, Matsuzuka F, Hirai K, Yokozawa T, Kobayashi A, Kuma K. The role of ansa-to-recurrent-laryngeal nerve anastomosis in operations for thyroid cancer. *Eur J Surg* 1998; 164: 927-933.
12. Yumoto E, Sanuki T, Kumai Y. Immediate recurrent laryngeal nerve reconstruction and vocal outcome. *Laryngoscope* 2006; 116:1657-1661.
13. Bhattacharyya N, Kotz T, Shapiro J. Dysphagia and aspiration with unilateral vocal cord immobility: incidence, characterization, and response to surgical treatment. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002; 111: 672-679.
14. Flint PW, Downs DH, Coltera MD. Laryngeal synkinesis following reinnervation in the rat. Neuroanatomic and physiologic study using retrograde fluorescent tracers and electromyography. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991; 100:797-806.
15. Isshiki N, Okamura H, Ishikawa T. Thyroplasty type I (lateral compression) for dysphonia due to vocal cord paralysis or atrophy. *Acta Otolaryngol* 1975; 80: 465-473.
16. Isshiki N, Tanabe M, Sawada M. Arytenoid adduction for unilateral vocal cord paralysis. *Arch Otolaryngol* 1978; 104: 555-558.
17. Woodman D, Pennington GL. Bilateral abductor paralysis : 30 years experience with arytenoidectomy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1976; 85: 437-439.
18. Ejnell H, Mansson I, Hallen O, Bake B, Stenborg R. A simple operation for bilateral vocal cord paralysis. *Laryngoscope* 1984; 94: 954-958.

19. 本吉和美, 佐藤英光, 兵頭政光, 河北誠二, 湯本英二. 仮声帯突出による呼吸困難に対する甲状軟骨形成術IV型の応用. 耳鼻と臨床 2001; 47: 50-53.
20. Henry JR, Beverly HC. Intracordal injection of silicon in selected dysphonias. Arch Otolaryngol 1965;81:604-607
21. Ford CH, Bless DM. A preliminary study of injectable collagen in human vocal fold augmentation. Otolaryngol Head Neck Surg 1986; 94: 104-112.
22. Mikaelian D, Lowry LD, Sataloff RT. Lipoinjection for unilateral vocal cord paralysis. Laryngoscope 1991; 101: 465-469.
23. 望月隆一. 声帯内自家脂肪注入術. 内分泌甲状腺外会誌 2016.33(4):233-238
24. 深堀光緒子, 千年俊一, 佐藤公則, 梅野博仁. 声帯内注入術の治療効果と問題点. 音声言語医学. 2018; 59: 303-310.
25. Kaneko M, Tsuji T, Kishimoto Y, Sugiyama Y, Nakamura T, Hirano S. Regenerative effects of basic fibroblast growth factor on restoration of thyroarytenoid muscle atrophy caused by recurrent laryngeal nerve transection. J Voice 2017; 1997:30311-30319.
26. Goto T, Ueha R, Sato T, Fujimaki Y, Nito T, Yamasoba T. Single, high-dose local injection of bFGF improves thyroarytenoid muscle atrophy after paralysis. Laryngoscope. 2020; 130(1):159-165.
27. Ohno T, French LC, Hirano S, Ossoff RH, Rousseau B. Effect of hepatocyte growth factor on gene expression of extracellular matrix during wound healing of the injured rat vocal fold. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2008 Sep;117(9):696-702.
28. Hirano S, Bless DM, Rousseau B, Welham N, Montequin D, Chan RW, Ford CN. Prevention of vocal fold scarring by topical injection of hepatocyte growth factor in a rabbit model. Laryngoscope. 2004 Mar;114(3):548-56.

29. darowics D, Ferrara N, Schweigerer L: Acceleration of wound healing in diabetic mice by basic fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 1987; 8:95-114.
30. 上村哲司, 渡邊英孝, 上村陽子. 外来通院での小児熱傷創に対するトラフェルミン(フィブラストスプレー)の使用経験. *熱傷* 2006; 32(5):291-297.
31. Hirano S, Mizuta M, Kaneko M, Tateya I, Kanemaru S, Ito J. Regenerative phonosurgical treatments for vocal fold scar and sulcus with basic fibroblast growth factor. *Laryngoscope*. 2013 ;123(11):2749-2755.
32. 中山享之, 加藤 栄史. 脂肪組織由来間葉系幹細胞を利用した細胞療法—現状と展望—. *Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy*,2013; 59(3):450—456.
33. Zhao L, Johnson T, Liu D. Therapeutic angiogenesis of adipose-derived stem cells for ischemic diseases. *Stem Cell Res. Ther.*, 2017;8(1):125
34. Hsiao Y, Okitsu T, Onoe H, Kiyosawa M, Teramae H, Iwanaga S, Kazama T, Matsumoto T, Takeuchi S. Smooth muscle-like tissue constructs with circumferentially oriented cells formed by the cell fiber technology. *PLoS One*; 2015; 10(3): e0119010
35. Le Blanc K. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; 11(5):321-334.
36. Nishio N, Fujimoto Y, Suga K, et al. Autologous fat injection therapy including a high concentration of adipose-derived regenerative cells in a vocal fold paralysis model: animal pilot study. *J Laryngol Otol*. 2016; 130(10):914–922
37. Hong SJ, Lee SH, Jin SM, Kwon SY, Jung KY, Kim MK, Park H, Lee KW. Vocal fold wound healing after injection of human adipose-

- derived stem cells in a rabbit model. *Acta Otolaryngol.* 2011; 131(11):1198-1204.
38. Zerdoum AB, Saberi P, Stuffer AJ, Kelly DJ, Duncan RL, Mongeau L, Jia X. Regulation of Stem Cell Function in an Engineered Vocal Fold-Mimetic Environment. *Regen Eng Transl Med.* 2020 Jun;6(2):164-178.
39. Matsumine H, Takeuchi Y, Sasaki R, Kazama T, Kano K, Matsumoto T, Sakurai H, Miyata M, Yamato M. Adipocyte-derived and dedifferentiated fat cells promoting facial nerve regeneration in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* 2014; 134(4):686-697.
40. Rennert RC, Sorkin M, Januszyk M, Duscher D, Kosaraju R, Chung MT, Lennon J, Radiya-Dixit A, Raghvendra S, Maan ZN, Hu MS, Rajadas J, Rodrigues M, Gurtner GC. Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose-derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations. *Stem Cells Res.* 2014; 5 (3):79
41. Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008; 215:210.
42. Oki Y, Watanabe S, Endo T, Kano K. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can trans-differentiate into osteoblasts in vitro and in vivo only by all-trans retinoic acid. *Cell Struct Funct.* 2008;33(2):211-222.
43. Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, Kano K. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 321(4):967-974.
44. Kazama T, Fujie M, Endo T, Kano K. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can transdifferentiate into skeletal

- myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;377(3):780-785.
45. Sakuma T, Matsumoto T, Kano K, Fukuda N, Obinata D, Yamaguchi K, Yoshida T, Takahashi S, Mugishima H. Mature, adipocyte derived, dedifferentiated fat cells can differentiate into smooth muscle-like cells and contribute to bladder tissue regeneration. *J Urol.* 2009;182(1):355-365.
46. Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama S, Kano K, Kusumi Y, Masuko T, Mitsumata M, Saito S, Hirayama A, Mugishima H, Fukuda N. Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(5):565-575.
47. Watanabe H, Goto S, Kato R, Komiyama S, Nagaoka Y, Kazama T, Yamamoto C, Li Y, Konuma N, Hagikura K, Matsumoto T. The neovascularization effect of dedifferentiated fat cells. *Sci Rep.* 2020 Jun 8;10(1):9211.
48. Soejima K, Kashimura T, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H. Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting. *J Plast Surg Hand Surg.* 2015 Feb;49(1):25-31.
49. Nobusue H, Endo T, Kano K. Establishment of a preadipocyte cell line derived from mature adipocytes of GFP transgenic mice and formation of adipose tissue. *Cell Tissue Res* 2008;332: 435–446.
50. Kanazawa T, Kurakami K, Kashima K, et al. Injection of basic fibroblast growth factor for unilateral vocal cord paralysis. *Acta Otolaryngol* 2017; 137:962–967.

51. Laura M. D, Ricardo V, C Blake S. Voice outcomes of lipoinjection versus medialization laryngoplasty for nonparalytic glottic insufficiency. *Laryngoscope*. 2019;129(5):1164-1168.
52. Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, Kazama M, Kano K, Ryu J, Tokuhashi Y, Matsumoto T. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(15-16):1792-1802.
53. Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H. Effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells on formation of basement membrane after cultured epithelial Autograft on artificial dermis. *Plast Reconstr Surg*. 2019 ;143(5):983-992.
54. Madaro L, Passafaro M, Sala D, Etxaniz U, Lugarini F, Proietti D, Alfonsi MV, Nicoletti C, Gatto S, De Bardi M, Rojas-García R, Giordani L, Marinelli S, Pagliarini V, Sette C, Sacco A, Puri PL. Denervation-activated STAT3-IL-6 signalling in fibro-adipogenic progenitors promotes myofibres atrophy and fibrosis. *Nat Cell Biol*. 2018;20(8):917-927.
55. Ozawa J, Kurose T, Kawamata S, Kaneguchi A, Moriyama H, Kito N. Regulation of connective tissue remodeling in the early phase of denervation in a rat skeletal muscle. *Biomed Res*. 2013;34(5):251-258.
56. Peter JA, Michael FN O'Leary, Beatrice C, Karen LW, David AH. Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 2007;102(3):1143-1151.
57. Menotti. M. The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review. *Eur J Appl Physiol*. 2006;98(1):1-21.
58. Yamamoto K, Morishita R, Hayashi S et al: Contribution of Bcl-2, but not Bcl-xL and Bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth

factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. *Hypertension*, 2001; 37: 1341–1348.

59. Conner EA, Teramoto T, Wirth PJ, Kiss A, Garfield S, Thorgeirsson SS. HGF-mediated apoptosis via p53/bax-independent pathway activating JNK1. *Carcinogenesis*. 1999;20(4):583-590.

研究業績

御子柴 郁夫

I 発表

- | | |
|--------|----|
| ① 一般発表 | 14 |
| ② 特別発表 | なし |

II 論文

- | | |
|--------|----|
| ① 原著論文 | 4 |
| ② 症例報告 | なし |
| ③ 総説 | なし |

- | | |
|--------|----|
| III 著書 | なし |
|--------|----|

以上

I : 発表

①一般発表

1. 御子柴 郁夫, 松本太郎, 木村優介, 原田英誉, 新藤秀史, 大島猛史 : 反回神経切除ラットに対する神経架橋における至適モデルの検討 : 第 122 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 京都, 2021.5
2. 長谷川央, 松崎洋海, 牧山清, 片野博文, 柴崎知生, 御子柴郁夫, 田井道愛, 浅居僚平, 大内俊孝, 三浦怜央, 松崎洋海, 鈴木啓誉, 長谷川央, 牧山清, 大島猛史 : 塩基性線維芽細胞増殖因子の単回声帯内注入術の長期経過 : 第 121 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会, 岡山, 2020.10
3. 御子柴郁夫, 嶋原俊太郎, 野村泰之, 岸野明洋, 木村優介, 斎藤雄一郎, 大島猛史 : 温度刺激試験と vHIT の乖離がみられた慢性めまいの 1 例 : 第 79 回日本めまい平衡医学会総会学術講演会, 横浜, 2020.11.25-27
4. 長谷川 央, 松崎洋海, 牧山 清, 正田悠太, 山本浩之, 仲田杏子, 御子柴郁夫, 田井道愛, 浅居僚平, 大内俊孝, 大島猛史 : 当院における再発性声帯白板症の後ろ向き検討~再発リスクの術前予測とその対策法~ : 第 71 回日本気管食道科学会総会・学術講演会, 栃木, 2019.11
5. 嶋原俊太郎, 野村泰之, 平井良治, 増田 毅, 木村優介, 岸野明洋, 原田英誉, 原 將太, 御子柴郁夫, 大島猛史 : 真珠腫 Canal wall down with canal reconstruction 手術症例の再発の検討. : 第 119 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会, 横浜, 2018.5
6. 野村泰之, 岸野明洋, 木村優介, 御子柴郁夫, 岸田杏子, 三浦正稔, 戸井輝夫, 澤田芙沙子, 増田 毅, 嶋原俊太郎, 大島猛史 : 加齢性平衡障害へのリハビリ治療効果. : 第 119 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会, 横浜, 2018.5
7. 野村泰之, 岸野明洋, 木村優介, 御子柴郁夫, 岸田杏子, 三浦正稔, 戸井輝夫, 澤田芙沙子, 増田 毅, 嶋原俊太郎, 大島猛史 : 加齢性平衡障害へのリハビリ治療効果. : 第 119 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 横浜, 2018.6

8. 嶋原俊太郎, 野村泰之, 平井良治, 増田 毅, 木村優介, 岸野明洋, 原田英誉, 原 将太, 御子柴郁夫, 大島猛史: 真珠腫 Canal wall down with canal reconstruction 手術症例の再発の検討. : 第 119 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 横浜, 2018.6
9. 岸 博行, 野村泰之, 岸野明洋, 木村優介, 御子柴郁夫, 岸田杏子, 河野航, 平野 良, 見澤大輔, 三浦正稔, 嶋原俊太郎, 大島猛史: めまいを伴った顔面神経麻痺の検討. : 第 77 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 山口, 2018.11
10. 河野 航, 野村泰之, 岸野明洋, 御子柴郁夫, 岸田杏子, 平野 良, 見澤大輔, 三浦正稔, 戸井輝夫, 岸 博行, 増田 毅, 嶋原俊太郎, 大島猛史: 当科めまい入院症例 15 年間の検討. : 第 77 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 山口, 2018.11
11. 嶋原俊太郎, 野村泰之, 嶋原じゅん子, 増田 毅, 戸井輝夫, 三浦正稔, 木村優介, 岸野明洋, 御子柴郁夫, 岸田杏子, 荘司政利, 齋藤雄一郎: 上半規管裂隙症候群手術例の VEMP 所見: 第 76 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 長野, 2017.11
12. 野村泰之, 戸井輝夫, 岸野明洋, 木村優介, 御子柴郁夫, 岸田杏子, 三浦正稔, 増田 毅, 嶋原俊太郎, 大島猛史: いま, 日本のめまい薬は?: 第 76 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 長野, 2017.11
13. 戸井輝夫, 野村泰之, 岸野明洋, 木村優介, 御子柴郁夫, 岸田杏子, 三浦正稔, 増田 毅, 嶋原俊太郎, 齋藤雄一郎, 大島猛史: めまいで入院を要した症例 5 年間の検討: 第 76 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 長野, 2017.11
14. 岸田杏子, 野村泰之, 地家真紀, 御子柴郁夫, 岸野明洋, 木村優介, 三浦正稔, 戸井輝夫, 増田 毅, 嶋原俊太郎, 大島猛史: ハンドモデルによる内耳形態の学習効果: 「バンバン, フッ, カチャッ」メソッド. 第 76 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 軽井沢, 2017.11
15. 御子柴郁夫, 野村泰之, 岸田杏子, 岸野明洋, 木村優介, 戸井輝夫, 増田毅, 嶋原俊太郎, 齋藤雄一郎, 大島猛史: なぜ MRI を撮らないか? 撮るべ

きキーワードはなにか。． 第 76 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演
会， 軽井沢， 2017.11

Ⅱ：論文

① 原著論文

1. 御子柴郁夫, 野村泰之, 嶋原俊太郎, 齋藤磨理, 岸野明洋, 木村優介, 岸田杏子, 戸井輝夫, 増田毅, 齋藤雄一郎, 大島猛史：最 MRI を撮るべきキーワードはなにか：当初抹消性めまいが疑われた後下小脳動脈(PICA) 梗塞の 1 例. *Equilibrium Res*, 79(2) 71-79, 2020
2. Ryohei Asai, Sohei Ishii, Ikuo Mikoshiba, Tomohiko Kazama, Hiroumi Matsuzaki, Takeshi Oshima, Taro Matsumoto : Functional recurrent laryngeal nerve regeneration using a silicon tube containing a collagen gel in a rat model : *PLoS One*. Aug 27;15(8), 2020
3. 岸田杏子, 野村泰之, 地家真紀, 御子柴郁夫, 岸野明洋, 木村優介, 三浦正稔, 戸井輝夫, 増田毅, 嶋原俊太郎, 大島猛史：ハンドモデルによる内耳形態の学習効果：「バンバン, フッ, カチャッ」メソッド：
Equilibrium Res, 78(3) 157-163, 2019
4. 御子柴郁夫, 嶋原俊太郎：急性めまいを起こす Acute vestibular syndrome における末梢前庭障害の特徴は：日大医誌 78 (2):83–86, 2019