ラットの腓腹筋における注入アテロコラーゲンの組織内動態 —声帯内アテロコラーゲン注入に関する基礎的研究として—

松井 真人, 宮野 龍太, 部坂 弘彦
上出 洋介, 森山 寛

Intratissue Dynamics of Atelocollagen Injected into Rat Gastrocnemius : Study on Intracordal Injection Therapy with Atelocollagen in Animal Experiments

Masato Matsui, M.D., Ryuta Miyano, M.D., Hirohiko Hesaka, M.D.,
Yousuke Kamide, M.D., and Hiroshi Moriyama, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Jikei University School of Medicine, Tokyo

In the treatment of unilateral laryngeal paralysis, we have been performing intracordal injection therapy with atelocollagen under observation with a flexible fiberscope on an outpatient basis. However, further study is required to determine the optimal injection sites and concentrations of atelocollagen. With the objective of evaluating the clinical effects of this therapy, we studied the intratissue dynamics of atelocollagen injected to rats. Using 18 Wistar rats, atelocollagen was injected into paralyzed and normal gastrocnemius and subdermal tissue at different concentrations, and the intratissue dynamics was investigated at regular intervals for 12 months. This study revealed the following. (1) The changes in the concentration of the atelocollagen and its reaction with tissue differ depending on the injection site. (2) The invasion of the inter-muscle bundle space by atelocollagen, which is thought to be due to muscular movement, occurs only in non-paralyzed (normal) gastrocnemius. (3) There is a tendency for the amount of remaining atelocollagen to be larger when the concentration injected is higher. The stability of the atelocollagen of the cross-linking type is thought to be considerable. However, it is necessary to conduct a separate study to evaluate whether the cross-linking agent causes damage to tissue. On the basis of the results reported above, it is concluded that the efficacy of current intracordal injection therapy with atelocollagen can be improved by using 3%, non-cross-linking atelocollagen and by studying the optimal sites and distance intervals for injection.

Key words : unilateral laryngeal paralysis, atelocollagen, intratissue dynamics,
injection sites, cross-linking agent

I. はじめに

われわれは一側性喉頭麻痺患者に対し、外来において軟性ファイバースコープ下で声帯内アテロコラーゲン注入術を施行している¹⁾。しかし、その注入部位や適正濃度などについてはいまだ

東京慈恵会医科大学耳鼻咽喉科学教室
別刷請求：〒162 東京都新宿区津久戸町5-1
東京厚生年金病院耳鼻咽喉科 松井真人
投稿受付：1995年5月26日

検討の段階であり²⁻⁵⁾, 臨床経験によるところが大きいのが現状である。そこで, 生体におけるアテロコラーゲンの組織内動態を観察し, 臨床でのアテロコラーゲン注入術への基礎的考察を加えるため, 声帯筋のモデルとして今回ラットの腓腹筋を用い, 神経を麻痺させた筋肉内と正常な筋肉内にアテロコラーゲンを注入し, その局所の停滞, 筋束間への侵入現象, 炎症細胞浸潤, 異物反応の程度などを, 濃度差や注入部位の違いにより経時的に観察した。

II. 方 法

1) ラット(wistar 系)18匹(250~300 g)に対し100 g 当たり 5 mg の pentobarbital sodium (ネンブタール®)を腹腔内注射後, 左脛骨神経を膝窩部より剖出した上で2~3 mm 切断除去し, その支配を受ける片側の腓腹筋を麻痺させる。

2) 約3週間後, 麻痺側と非麻痺側の腓腹筋を筋膜上で剖出し, それぞれのラットにおいて同濃度のアテロコラーゲンを0.3 ml ずつ30 G 針で注入する。

3) 対照として背部皮下にも注入する。

4) 注入後の経時的变化を, 麻痺筋, 非麻痺筋, 皮下においてマッソン染色で組織学的に比較検討する。

なお, 使用するアテロコラーゲンの濃度は, 1%, 3%, 3.5%の3種類とした。3.5%アテロコラーゲンはグルタルアルデヒドで再架橋された米国コラーゲン社製ザイブラスト®(架橋型)を使用し, 1%および3%アテロコラーゲンは高研社製コーケンアテロコラーゲンインプラント®(非架橋型)を使用した。観察期間は注入後1週, 2週, 1か月, 3か月, 6か月, 12カ月经過した時点で解剖し, その組織所見を検討した。

III. 結 果

1. 麻痺腓腹筋の濃度別経時的变化

3.5%アテロコラーゲン(米国コラーゲン社製ザイブラスト®)は, 注入後1か月では比較的大きな塊として残存し得るが(図1), 早期よりリンパ球を主体とした炎症細胞浸潤を認め, 特に1か月から3か月においては炎症細胞浸潤は著

図1 麻痺筋 3.5% 1か月後
注入したアテロコラーゲン(矢印)が一塊として残存している(Masson, ×10)。

図2 麻痺筋 3.5% 1か月後
細胞浸潤が強く, 異物巨細胞も多数出現している(Masson, ×200)。

図3 麻痺筋 3.5% 12か月後
アテロコラーゲン周囲の筋細胞が脂肪変性(矢印)している(Masson, ×40)。

しく, 異物巨細胞も多数出現していた(図2)。しかし, 6か月以降はほぼ消失し, 12か月ではアテロコラーゲン周囲の筋細胞が脂肪変性して

図4 麻痺筋 3% 12カ月後
3.5%に比し容量が減少し、扁平な形態(矢印)を呈している(Masson, $\times 10$)。

図5 麻痺筋 1% 12カ月後
薄く長い形態だが、肉眼的に確認できるレベル(矢印)で存在する(Masson, $\times 10$)。

完全な異物として残存していた(図3)。

3%アテロコラーゲン(高研社製コーケンアテロコラーゲンインプラント®)では3.5%よりも若干容量が減少したものの(図4), 筋線維方向に長く存在する形態をとっていた。また炎症細胞浸潤は異物巨細胞を含め3.5%と比較すると軽度であった。1%ではさらに薄く長くなるものの, 12カ月後でも肉眼的にも確認できるレベルで存在していた(図5)。炎症細胞浸潤や異物反応は, 3%と同様に3.5%と比較すると軽度であった。

2. 非麻痺腓腹筋の濃度別経時的变化

3.5%では麻痺筋に比べ注入したアテロコラーゲンの残存量は若干少ないが, 観察期間内では常に一塊として存在していた。炎症細胞浸潤については, 麻痺筋と同様3カ月までかなり強く認められ, 6カ月以降はほぼ消失し, 12カ月で

図6 非麻痺筋 3.5% 12カ月後
アテロコラーゲン周囲の脂肪変性(矢印)が顕著である(Masson, $\times 40$)。

図7 筋束間への侵入現象

a) 非麻痺筋 1% 3カ月後

b) 非麻痺筋 1% 6カ月後

注入アテロコラーゲンの筋束間への侵入現象が認められる(Masson, $\times 60$)。

は周囲の脂肪変性も顕著に認められた(図6)。3%では筋運動の影響と思われる, アテロコラーゲンの筋束間への侵入現象が認められた。この現象は, 麻痺筋や皮下では認められなかった。1%ではこの侵入現象はさらに顕著だった(図7a, b)。

図8 皮下 3.5% 1ヵ月後
注入アテロコラーゲン内に宿主の線維芽細胞がすでに入り込んでいる。異物巨細胞も認められる。(Masson, $\times 200$)

図10 皮下 1% 1週後
早期から細胞浸潤が強く、異物巨細胞や多数の微小血管を認める (Masson, $\times 200$)。

図9 皮下 3.5% 12ヵ月後
宿主による取り込みと思われる容量の減少が認められる (Masson, $\times 40$)。

図11 皮下 3% 12ヵ月後
一塊として残存しているのが確認できる (Masson, $\times 40$)。

3. 皮下注入の濃度別経時変化

3.5%の架橋型であっても筋肉内注入に比べ早期から線維芽細胞が入り込む様子が認められ(図8),時間の経過とともに容量が減少していた(図9)。3%や1%の非架橋型においても,筋肉内注入とは異なり1週目から炎症細胞浸潤が強くなり,すでに異物巨細胞も出現しており,周囲を取り囲む微小血管を多数認めた(図10)。また時間の経過とともにアテロコラーゲンの容量が減少し,宿主のコラーゲンとの区別が難しくなった。

3%においては12ヵ月後でも肉眼的に一塊として確認できたが(図11),特に1%においては6ヵ月で,宿主のコラーゲンと注入したアテロコラーゲンの区別がほとんどできず,12ヵ月では肉眼的に完全に消失した。

IV. 考 察

アテロコラーゲンはコラーゲン分子をペプシン処理して,分子間を架橋した抗原性の大部分を有しているテロペプチド部分を除去した,極めて抗原性の少ない物質である。このアテロコラーゲンを架橋剤を用いて再架橋させたものが架橋型アテロコラーゲンであり,その処理をしないものが非架橋型アテロコラーゲンである。このことから物質の性状では濃度とは別に架橋型のほうがより堅固であると考えられる。しかし用いられる架橋剤がグルタルアルデヒドなどであるために,組織傷害などの問題が生じることを考慮しなければならない。

今回の結果より,筋収縮のある正常筋肉内にアテロコラーゲンを注入した場合は,その筋運動によると思われる周囲の筋束間へのアテロコ

ラーゲンの侵入現象を認めるのに対し、麻痺した筋肉内に注入した場合は、筋束間への侵入現象は発生しにくく、容量の減少はあるものの肉眼的レベルで残り得ると言える。この場合の容量の減少は、濃度差や架橋、非架橋の差による宿主からの取り込みやすさ、あるいは注入部位よりの逆流などが考えられ、それらに対する検討が必要と思われる。また、筋肉内と皮下での違いのように、注入部位の組織学的反応の違いにより、残存量の差が生じることが考えられる。

これを臨床に置き換えると声帯筋内と粘膜固有層では異なる経過を示すことが予想される。今回の結果からは、麻痺した声帯筋内であれば注入したアテロコラーゲンの周囲への拡散は起こりにくいものと推測され、粘膜波動を妨げないという意味からも、粘膜固有層よりは声帯筋内への注入が最も良いと考えられる。しかし症例によっては、声帯筋あるいは披裂部が若干運動しているものもあり、非麻痺筋と同じような周囲への拡散も起こり得ると言える。よって症例の違いによる注入の効果いかなんでは、声帯筋内と粘膜固有層への注入を併用するなど、注入部位を再検討することも必要と思われる。

アテロコラーゲンの濃度については濃い順により多く残存する傾向にあるが、3.5%(ザイプラスト®)は架橋型であるために堅固なものと考えられる。ただし架橋剤であるグルタルアルデヒドは組織傷害の問題があり、これが注入後の組織の柔軟性の欠如や石灰化を促進する可能性があり、polyepoxy compoundなどの他の架橋剤^{6,7)}を使用した架橋型コラーゲンが検討される必要がある。

以上のことから、今回使用した3.5%架橋型、3%、1%非架橋型アテロコラーゲンの中では、組織傷害が少なく、かつ入手しやすいという観点から、現在主に使用されている3%非架橋型アテロコラーゲンが、現段階では最も良いと考えられ、症例により筋肉内と粘膜固有層への注入を併用したり、期間をあけて注入を繰り返すことなどにより、さらに治療効果の向上が期待できると考えられる。

V. ま と め

1) ラット (wistar 系) 18匹を用い、麻痺筋、非麻痺筋および皮下におけるアテロコラーゲンの濃度別の組織内動態について、経時的な検討を加えた。

2) 注入部位によりアテロコラーゲンの消長や組織反応に差異を認めた。

3) 非麻痺筋においてのみ筋運動によると思われるアテロコラーゲンの筋束間への侵入現象を認めた。

4) 濃度の濃いアテロコラーゲンがより多く残存する傾向にあるが、3.5%(ザイプラスト®)は架橋型であるために堅固なものと考えられた。ただし架橋剤による組織傷害については別に検討すべきと思われた。

5) この実験結果を臨床にあてはめて考察すると、今回使用した現段階で市販されているアテロコラーゲンでは、3%の非架橋型を用い、麻痺した声帯筋内に注入するのが最も良いと考えられた。しかし効果が不十分な場合は、再注入やその注入間隔、さらには粘膜固有層への注入の併用などを個々の症例において検討することにより、治療効果の向上が期待できると考えられた。

本論文の要旨は第46回日本気管食道科学会総会(1994年10月、宇都宮市)において口演した。

文 献

- 1) 部坂弘彦, 宮野龍太, 松井真人・他: 一側性喉頭麻痺に対する局所麻酔下アテロコラーゲン注入療法. 日耳鼻, 97: 847-854, 1994.
- 2) Ford, C.N., Martin, D.W., and Warner, T.F.: Injectable collagen in laryngeal rehabilitation. Laryngoscope, 94: 513-518, 1984.
- 3) Ford, C.N., and Bless, D.M.: A preliminary study of injectable collagen in human vocal fold augmentation. Otolaryngol. Head Neck Surg., 94: 104-112, 1986.
- 4) 岡本和憲: 声門閉鎖不全に対するアテロコラーゲン注入療法に関する基礎的研究. 日耳鼻, 90: 394-403, 1987.
- 5) 北原 哲, 小倉雅実, 坂田淳一・他: コラーゲン注入療法に対する基礎的研究. 日気食会報, 41: 417-421, 1990.
- 6) Kligman, A.M., and Armstrong, R.C.: Histologic response to intradermal Zyderm and

日気食会報, 47 (1), 1996

Zyplast (Glutaraldehyde cross-linked) collagen in humans. J. Dermatol. Surg. Oncol., 12 : 351-357, 1986.

7) 鈴木康之：コラーゲン注入療法による尿失禁治療の基礎研究と臨床応用。慈恵医大誌, 108 : 629-639, 1993.