ヒト声帯の粘膜固有層における膠原線維の分布 —免疫組織化学的検討—

田村悦代・北原 哲・佐藤道哉・井上鐵三

Collagen Type Distribution in Human Vocal Fold Lamina Propria —Immunohistochemical Investigation—

Etsuyo Tamura, Satoshi Kitahara, Michiya Sato
and Tetsuzo Inouye

The lamina propria of the human vocal fold consists of three morphologically different layers. Previous investigations have revealed age-related changes in the histological structure of this apparatus. The authors tried to define the role of the lamina propria in vocal fold vibration. Using an enzyme-immunohistochemical method, the distribution of three different collagens, type I, type III and type IV in the lamina propria was examined. Type III collagen was found in all lamina propria layers. The majority of type I collagen was found in the deep layer, especially in the anterior and posterior parts of the vocal fold. The localization of each type of collagen was related to the degree of vibratory movements during phonation.

Key words : 声帯, 膠原線維, 免疫組織, 化学, 型分布

はじめに

振動体としての声帯に対する研究は、超高速映画^{1~5)}や筋電図^{6~8)}、ストロボスコーピー⁹⁾などによる動的な解析おこなわれる一方、組織学的な研究により層構造を成しているといわれている¹⁰⁾。つまり、主に発声時の声帯振動に関与しているとされる上皮と粘膜固有層浅層からなるカバーとよばれる部分と、あまり振動に関与していない、より深部の固有層中間層、深層からなる移行部と、ボディとよばれる筋層に分けられるといわれる。しかしながら、これらの研究は主に加齢や性に関する検討にとどまるものであった¹¹⁾。

そこで、われわれは振動体としての声帯の可撓性に関与し、声帯振動に影響すると思われる粘膜固有層の主な線維成分である、膠原線維について、その型別分布を、型特異的抗コラーゲン抗体による免疫組織化学的手技を用いて調べ、声帯振動と粘膜固有層との関わり合いについて考察した。

材料および方法

1. 材 料

1991年7月から9月までの3カ月間に、膠原病など免疫不全疾患以外で死亡し、本学校病理学教室での剖検例のうち遺族より承諾を得た0才から80才、平均年齢54才の正常

喉頭8例を図1のように、一側では前連合付近、声帯膜様部中央、声帯突起直前の3カ所の前額断、他側では声帯上面より約3mm下方の水平断で、厚さ6 μ mの凍結切片を作製し、以下の方法で検索した。

2. 方 法

1) 抗 体

型特異的抗コラーゲン抗体として、タイプI抗コラーゲン抗体(ラビットポリクローナル抗体, アドバンス社)とタイプIIIおよびIV抗コラーゲン抗体(マウスモノクローナル抗体, 大島, 和歌山県)を用いた。

2) 免疫組織化学染色法

間接法(酵素抗体法)にて表1の手順に従い、二重染色し検索した。材料を6 μ mの凍結切片作製後①、アセトン固定し③、水洗、PBSによる洗浄をそれぞれ、5分間施行した。次に、5%正常ウサギ血清加PBSで20分処理し⑤、一次抗体として、タイプIIIおよびIV抗コラーゲン抗体を湿箱中にて1時間反応させ⑥、PBSで3回洗浄後、二次抗体である、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG(ダコ・ジャパン(株))を室温30分反応させた⑧。発色は、0.05M pro-panediol buffer 100mlにnaphthol AS-BI phosphate 50mg, Fast Red TR salt 100mgを加えた発色液に、内因性アルカリフォスファターゼ活性阻害のために、levamisoleを加えて行なった⑩。水洗後、0.1M グリシン塩酸緩衝液で、2時間洗浄した⑫。つぎに、

図1 A: 前連合付近
B: 膜様部中央
C: 声帯突起直前
D: 声帯上面より約3 mm 下方

表1 酵素抗体二重染色法のフローチャート

①未固定凍結切片（クリオスタット薄切）	
②風 乾	30分
③アセトン固定	4℃, 20分
④水洗, PBS	各5分
⑤非特異染色ブロック	20分
⑥一次抗体反応（各抗コラーゲン抗体）	室温1時間
⑦PBSにて洗浄	3回10分
⑧二次抗体反応	30分
⑨PBSにて洗浄	3回10分
⑩発色（レバミゾール添加アゾ色素）	
⑪水 洗	5分
⑫0.1M グリシン塩酸緩衝液	2時間
※④～⑩繰り返す	

水洗, PBS 洗浄をそれぞれ5分間施行後, 5%正常ブタ血清加PBS, 5%正常ウサギ血清加PBSで20分処理⑤, 一次抗体として, タイプIおよびIII抗コラーゲン抗体と1時間反応させた⑥. PBS 洗浄後, 二次抗体であるアルカリフォスファターゼ標識抗ラビットIgGおよび抗マウスIgGに30分反応させた⑧. 発色は, 第一回目の発色液のうち, 色素をFast Blue BBに変えて, 青色にした⑩. 水洗後, さらに蒸留水によって洗浄し, 水性封入液にて封入した. また, 対照実験としては, 一次抗体の代りにPBSを用いて陰性コントロールとした.

表2 タイプIコラーゲンの局在部位

	前黄斑部 付 近	膜 様 部 中 央	後黄斑部 付 近
浅 層	(±)	(-)	(±)
中 間 層	(++)	(-)	(++)
深 層		(±)	

M: 声帯筋, I: 粘膜固有層深部

C: 粘膜固有層浅層+上皮

斜線部: タイプIが多く存在

星印: タイプIが散在

結 果

1. タイプIコラーゲンとタイプIIIコラーゲンの分布

声帯粘膜固有層の膠原線維のうち, タイプIコラーゲンは, タイプI抗コラーゲン抗体に反応し青色に, タイプIIIコラーゲンは, タイプIII抗コラーゲン抗体に反応し赤色に, それぞれ発色させた. 声帯水平断切片Dでは, 粘膜固有層全体に, 赤色に発色されたタイプIIIコラーゲンを認め, タイプIコラーゲンは, 固有層の喉頭腺より深部に多く認められ, 浅層には, あまり認められなかった(図2, 3, 4). 同様の所見は, A~Cの前断切片でも認められ, 特に前黄斑部や後黄斑部付近, あるいは, 声帯上面や下面では, 著しくかった(図5). 一方, 膜様部中央付近では, 粘膜固有層深層でも, タイプIコラーゲンは散在する程度であった. これらの結果をまとめると, 表2のように, タイプIコラーゲンの分布に特徴が認められた. つまり, 発声時に振動の大きいとされる部位—膜様部中央付近—にはあまり認められず, 膜様部中央に較べて振動が小さいと思われる部位—前黄斑部および後黄斑部付近や声帯上面および下面—に多く認められた.

2. タイプIVコラーゲンの分布

タイプIIIコラーゲンを青色に, タイプIVコラーゲンを赤色に発色させた. 同様に, 切片Dでは, 固有層全体に青色のタイプIIIコラーゲンを認めた(図6). タイプIVコラー

図2 55才男性，正常右声帯水平断切片DタイプIコラーゲンを青色に，タイプⅢコラーゲンを赤色に発色させた酵素抗体二重染色像（×3）

図3 図2の切片の四角で示した部分の二重染色像（×16）
E：上皮，G：喉頭腺，M：声帯筋粘膜固有層には，タイプⅢ（赤色）が多く，喉頭腺より深部にタイプI（青色）が，混在する（矢印）。

図4 粘膜固有層深部の強拡大像（×66）

図5 同一症例の前額断切片Aの二重染色像(×3)
m.f.a.: 前黄斑部
弾性線維の集合した前黄斑部より深部に、タイプIコラーゲンが多く認められる(矢印).

図6 切片DでタイプIIIコラーゲンを青色に、タイプIVコラーゲンを赤色に発色させた酵素抗体二重染色像(×3)

図7 同一切片の強拡大像(×66)
E: 上皮, G: 喉頭腺
基底膜や血管, 腺組織に局限して、タイプIVコラーゲンが赤色に発色している(矢印).

ゲンの分布には、声帯の部位による差はみられなかったが、血管、腺組織および上皮の基底膜に限局して存在していた(図7)。

考 察

動物の体のタンパク質の30%はコラーゲンが占めるといわれており、生体内で主として不溶性の主に線維構造をとり、その機能によってI型からXII型まで分類され、生体の各臓器ごとに分布や構成に特徴がある¹²⁾。例えば、I型コラーゲンは真皮、骨、象牙質、腱、動脈および子宮壁などの組織や各臓器の間質に、III型は動脈中膜平滑筋層、内膜に存在するほか、消化管、肺、血管など主としてコンプライアンスの高い臓器に多く、これらの組織に弾性を与えている可能性があるといわれている¹³⁾。しかも、正常状態では合成されるコラーゲン型の割合はそれぞれの細胞で定まっていると考えられており¹⁴⁾、その割合の変化は細胞の表現型の変化の1つと理解することができる。例えば、ヒト真皮では胎児においてはI型、III型が等量に存在するが、新生児ではI型/III型の比が4:1に変化し、10才までは、I型に対するIII型の割合が減少し続けるといわれる¹⁵⁾。つまり、加齢とともにIII型の合成が低下するといわれている。また、ヒトの瘢痕組織では、III型の割合が正常部分の真皮より増加し、胎児期の分布に近い傾向があるともいわれている¹⁴⁾。つまり、組織修復過程では、III型の合成が増加することが推測される。

一方、喉頭におけるコラーゲンの研究はいまだおこなわれていない。しかも、声帯粘膜固有層における線維成分の大部分は、膠原線維である。そこで、粘膜固有層と声帯振動との関わり合いを理解することを目的として、免疫組織化学的手技を用いてコラーゲンの型分布を検討した。

声帯振動は、声帯下面粘膜より生ずる粘膜の波状運動と考えられており、その振動の起点や範囲について多くの報告がある。平野らは、主な振動範囲を粘膜が重層扁平上皮に被われている部分であると報告しており¹⁰⁾、湯本ら¹⁶⁾は喉頭の気管側からの観察によりヒダ状粘膜隆起の上方から声帯振動が起こったとしている。本研究での結果、細胞機能として接着の効果があるといわれるタイプIコラーゲンは、声帯膜様部中央にほとんど認められず、声門下あるいは声帯上面で、喉頭腺の出現するあたりより尾側あるいは頭側の粘膜固有層深部に多く存在していた。この傾向は声帯振動の前後の支点とも考えられる前後の黄斑部に著しく、言い換えると、声帯振動の支点あるいは、振動の少ない部位に、タイプIコラーゲンが局在していた。これらの部位は、平野らの声帯振動の主な振動範囲からはずれており、声門下では、湯本らのヒダ状粘膜隆起の位置に近接しているなど、声帯振動とのかわりが示唆された。また、粘膜固有層の多くは、組織に弾性を与えるといわれる、タイプIIIコラーゲンによって構成されており、弾性線維とともに、声帯の振動に寄与していることが推測された。いっぽう、線維形態をとらないといわれるタイプIVコラーゲン

は、血管、腺組織、上皮の基底膜などに特異的に存在し、声帯の部位による差は、認めなかった。以上により、タイプIおよびIIIコラーゲンの分布は、振動体としての声帯の機能に適合しているものと推察された。

また、従来より、声帯振動の大きな膜様部中央の遊離縁部以外では、声帯の三層構造のうち、粘膜固有層の中間層、深層の区別がしにくいといわれてきた。我々の研究でも、遊離縁部以外では、喉頭腺より深部の粘膜固有層に、膠原線維と弾性線維が混在しており、中間層、深層の区別は困難であると考えられた。その上、この部分全体にタイプIコラーゲンを多く認めたため、これら二つの層をあえて分けて記載するのを避け、固有層深部とした。

結 語

剖検より得られた正常喉頭に対して、免疫組織化学的手技をもちいた、酵素抗体二重染色法により、声帯粘膜固有層における膠原線維の型別分布を調べ、声帯振動との関わり合いについて、考察した。

1) タイプIコラーゲンは、主に声帯粘膜固有層深部に存在し、固有層浅層にはあまり認められなかった。この傾向は、声帯膜様部中央に比較して、前黄斑部および後黄斑部付近で、より強く認められた。

2) タイプIIIコラーゲンは、声帯粘膜固有層全層に、広く認められた。

3) タイプIVコラーゲンは、血管、腺組織および上皮の基底膜に認められたが、声帯の部位による差異はなかった。

4) 声帯における膠原線維の局在部位について、考察した。つまり、タイプIコラーゲンは、声帯振動の少ない部位あるいは振動の支点になる部位に、タイプIIIコラーゲンは、声帯振動の大きな部位に分布しており、膠原線維の型別分布が声帯振動に適合したものであると推察された。

謝 辞

稿を終わるに臨み、型特異的抗コラーゲン抗体を御提供下さいました、和歌山県立医科大学第一病理学教室、大島章教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の要旨は、第4回日本喉頭科学会(平成4年3月13・14日 名古屋)において発表した。

文 献

- 1) Sonesson B: A method of studying the vibratory movements of the vocal cords, Preliminary report. J Laryngol Oto 73: 732~737, 1956.
- 2) Timcke R et al: Laryngeal vibrations. Measurements of the glottic wave. I. The normal vibratory cycle. Arch Otolaryngol 68: 1~19, 1958.
- 3) Tsuiki Y et al: A study on the motion of the vocal cords during vocalization by means of high speed motion pictures. VI International

- Congress of Broncho-esophagology, Kyoto, Japan, 1958.
- 4) 広戸幾一郎：発声機構面よりみた喉頭の病態生. 耳鼻臨床 39: 229~291, 1966.
 - 5) 松下英明：高速度映画による摘出喉頭における声帯振動に関する実験的研究. 耳鼻 15: 127~142, 1969.
 - 6) 進 武幹：内喉頭筋の作動様式に関する筋電図学的研究. 耳鼻臨床 55: 472~493, 1962.
 - 7) 広戸幾一郎：喉頭筋の機能. 耳鼻臨床 57: 1~9, 1964.
 - 8) 平野 実：声帯振動の基本的パターン. 日耳鼻 77: 108~111, 1974.
 - 9) 斎藤成司：発声機構の基礎的研究および喉頭内腔への臨床的アプローチ. 耳鼻 27: 883~930, 1977.
 - 10) 平野 実ほか：振動体としての声帯構造. 76: 1341~1348, 1973.
 - 11) 平野 実ほか：声帯の成長，発達と老化. 耳鼻臨床 74: 8; 1791~1802, 1981.
 - 12) 野田春彦ほか：現代化学—コラーゲン物語 (18) コラーゲン I 型の機能, 36~40, 東京化学同人, 東京, 1988.
 - 13) 藤原作平ほか：コラーゲンの代謝と疾患—コラーゲンの多様性. 110~133, 講談社, 東京, 1989.
 - 14) 大島 章ほか：collagen の染め分け, 第15回組織細胞化学講習会, 組織細胞化学1990, 156~163, 学際企画, 1990.
 - 15) Meigel NW et al: Dermal architecture and collagen type distribution. Arch Derm Res 259: 1~10, 1977.
 - 16) 湯本英二ほか：気管側からみた正常声帯の振動状態. 耳鼻臨床 82: 10; 1473~1477, 1989.
-
- 別刷請求先 〒359 埼玉県所沢市並木 3-2
防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座 田村悦代