声帯内注入材料に関する基礎的研究

—免疫組織化学的検討—

田村悦代・北原哲・中之坊学・佐藤道哉
古川太一・野原理・井上鐵三

Basic Study of Implants for Vocal Fold Augmentation —Immunohistochemical Investigation—

Etsuyo Tamura, Satoshi Kitahara, Manabu Nakanoboh,
Michiya Satoh, Taichi Furukawa, Osamu Nohara
and Tetsuzo Inoue

Injectable bovine collagen has been used for vocal fold augmentation in human subjects. The purpose of this study was to examine the wound healing and tissue reaction of canine vocal folds in which collagen was injected. Two forms of bovine collagen, cross-linked and not cross-linked, were injected into vocal folds of dogs; the animals were killed 9 weeks and 17 weeks after injection. Immunohistochemical study in three growth factors, basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor- β (TGF- β) and platelet-derived growth factor (PDGF), was performed. Not cross-linked collagen delayed normal wound healing process and implants tended to be absorbed in a long-term. On the other hand, cross-linked collagen did not disturb the wound healing process and tended to persist in the tissue with good stability.

Key words : 声帯内注入術, 注入材料, 免疫組織化学, 創傷治癒, 成長因子

はじめに

Brünings¹⁾ にはじまった声帯内注入術は、非観血的 vocal rehabilitation として、注入法や注入物質の変遷を繰り返しながら現在に至っている。たとえば、注入経路は、間接喉頭鏡下、直達鏡下、喉頭顕微鏡下²⁾、経皮^{3, 4)} ファイバースコープ下⁵⁾ など、症例に応じて、選択することが可能である。しかし、注入材料については、多くの報告があるにもかかわらず、未だ理想的な物質がないといわれている。最近まで、欧米ではテフロンが、本邦ではシリコンが使用されてきたが、注入後の組織内での変化に問題があり、これらに代わって、コラーゲンの使用が普及し始めた^{6, 7)}。当初使用されていた未架橋型注入用コラーゲンは組織内における安定性にやや問題があり、欧米では線維構造が保持しやすいという点で、架橋型注入用コラーゲンの使用が始まっている⁸⁾。われわれも、本邦で開発された架橋型注入用コラーゲンをマウスの筋肉内に注入して、その組織反応を経時的に観察し、既に第45回日本気管食道学会および第6回日本喉頭科学会にて報告した。

今回はさらに、架橋型注入用コラーゲンの声帯内注入術への適応について、従来より観察された異物反応を中心と

した組織内変化のみならず、コラーゲン注入術における組織反応を創傷治癒の観点から、細胞成長因子をパラメーターとして免疫組織化学的に検討してみた。

方 法

1. コラーゲン・ゲルの観察

注入用コラーゲンである、3%および6.5%未架橋型アテロコラーゲンと6.5%架橋型アテロコラーゲン（高研社製）を48時間、37℃で湿箱内で加温し、ゲル化した状態を2.5%グルタルアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液で、4℃、2昼夜固定後、0.1Mリン酸緩衝液で洗浄し、1%オスミウム酸で2時間後固定した。エタノール脱水後、液体炭酸ガスによる臨界点乾燥、イオンスパッタリングで金をコーティングし、日本電子JSM-5200走査電子顕微鏡にて観察した。

2. 動物実験

1) 実験動物

実験には、成犬（体重：12~17kg）を5匹用いた。実験の準備として、pentobarbital sodium（ネブタール）25mg/kgの静脈麻酔下に頸部外切開にて、輪状軟骨より5cm末梢側で、左側反回神経を1cm切除した。

2) コラーゲン注入

反回神経切断後2カ月後、再び、静脈麻酔下に、両側声帯にアテロコラーゲン（高研社製）を0.2ccずつ注入した。用いたアテロコラーゲンは、従来と同じ分子間架橋のない濃度6.5%のものと、分子間架橋のある濃度6.5%の2種類である。注入後の観察期間は、未架橋型、架橋型それぞれ9週、17週とした。

3) 観察

喉頭顕微鏡下に喉頭を観察した後に、ネブタール50 mg/kgを静注し、心停止を確認後、喉頭を摘出した。摘出した喉頭の声帯膜様部中央における凍結および10%パラフィン固定の前額断切片、注入コラーゲン・ゲル部分の透過型電子顕微鏡用資料を作製し、以下の手順で検討した。

①HE染色

パラフィン切片、HE染色にて異物反応や線維化の有無を検討した。

②免疫組織化学的検討

細胞成長因子として、a) 血管新生を促進する線維芽細胞増殖因子 Fibroblast growth factor（以下、FGFと略す）、b) 線維芽細胞の増殖促進、走化作用を促す血小板由来増殖因子 Platelet-derived growth factor（以下、PDGFと略す）、c) コラーゲン合成を促進させるトランスフォーミング増殖因子 Transforming growth factor- β （以下、TGF- β と略す）の3種類について検討した。用いた一次抗体は、PDGFは、抗PDGF抗体（マウスモノクローナル抗体、 $\times 100$ 、持田製薬）、TGF- β は抗TGF- β_{1+2} 抗体（ラビットポリクローナル抗体、 $\times 70$ 、キング醸造）、FGFは、抗塩基性型FGF抗体⁹⁾（マウスモノクローナル抗体、 $\times 893$ 、金沢医大・第二生化学・西川克三）であり、染色はPDGFとTGF- β は凍結切片にて間接法（表1）で、FGFはパラフィン切片でLSAB法（表2）でおこなった。

③コラーゲン・ゲルの超微構造

注入9週後の6.5%未架橋型コラーゲン・ゲル部分を2.5%グルタルアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液で4℃、一夜、固定後、0.1Mリン酸緩衝液で、一夜、洗浄し、1%オスミウム酸で2時間、後固定をおこなった。エタノール

表1 免疫組織染色のフローチャート（間接法）

1	凍結切片作製、風乾	
2	固定	
3	PBS洗浄	
4	5%正常血清処理	20分
5	1次抗体	室温 1時間
6	PBSにて洗浄	3回 10分
7	標識2次抗体	室温 30分
8	PBSにて洗浄	3回 10分
9	発色（DAB）	
10	水洗	5分
11	核染色	
12	脱水・透徹・封入	

表2 免疫組織染色のフローチャート（LSAB法）

1	脱パラフィン、水洗	
2	0.6%過酸化水素メタノール溶液	45分
3	水洗	10分
4	5%normal goat serum	20分
5	1次抗体	室温 1時間
6	PBSにて洗浄	3回 10分
7	ビオチン化2次抗体	室温 30分
8	PBSにて洗浄	3回 10分
9	ストレプトアビジン	室温 30分
10	PBSにて洗浄	3回 10分
11	発色（DAB）	
12	水洗	5分
13	核染色（マイヤーのヘマトキシリン）	2分
14	色出し	
15	脱水・透徹・封入

図1 加温前のアテロコラーゲン

- a) 3.5%未架橋型
- b) 6.5%未架橋型
- c) 6.5%架橋型

で脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。超薄後、150メッシュにのせて、酢酸ウラン・クエン酸鉛の二重染色後、日本電子 JEM-1010 透過型電子顕微鏡で観察した。

結 果

1. コラーゲン・ゲルの観察

加温前は、図1のように、3.5%未架橋型アテロコラーゲンは透明で、6.5%アテロコラーゲンは未架橋型も架橋型も白濁した状態であったが、加温にともない、3.5%も白濁し、粘調度は高くなり、ゲル化した。図2は、加温48時間後の未架橋型コラーゲン・ゲルの走査電顕像であるが、太い線維が、比較的整然と一定方向に並んでいた。いっぽう、図3の架橋型では、細線維が粗に束ねられた状態で、長さも方向も一定せず、網目状に絡み合っていた。

2. イヌ声帯内注入後のコラーゲンの状態

1) 6.5%未架橋型アテロコラーゲン注入例

注入9週目では、注入したアテロコラーゲンは、肉眼で確認できたが、17週目では、光学顕微鏡下でも確認できなかった。

注入9週目の声帯前額断切片のHE染色標本では、膠原線維からなる結合織によって周囲とは明らかな境界を有し、コラーゲン・ゲルの亀裂内に、線維芽細胞を認めたが、異物巨細胞の浸潤などを伴う明らかな異物反応はみられなかった。また、細胞成長因子の免疫染色標本では、FGF、TGF-

β 、PDGFのいずれでも、コラーゲン・ゲル内に認められた線維芽細胞の細胞質が褐色に発色し、陽性所見を示した(図4)。これらの所見は、反回神経麻痺の有無による差異は認められなかった。

さらに、コラーゲン・ゲル部分の透過型電子顕微鏡による観察では、ゲル内に、細長い細胞質をもつ線維芽細胞が散在し、その細胞質内には、粗面小胞体、ミトコンドリアなどの細胞小器官が認められ(図5)、細胞活動が確認された。また、ゲル内には、周期性のある横紋をもつ宿主由来と思われた膠原線維も散見された。

2) 6.5%架橋型アテロコラーゲン注入例

注入9週および17週目では、注入されたアテロコラーゲンは、肉眼で残存が確認でき、反回神経麻痺の有無による差異は認められなかった。

HE染色標本で、コラーゲン・ゲルは未架橋型に比較して一様でなく、注入9週目における線維芽細胞の浸潤は、未架橋型より著明に認められた。また、免疫染色により検討した細胞成長因子では、TGF- β が線維芽細胞の胞体に弱い陽性所見を示したが、他のFGFやPDGFでは発色せず陰性だった(図6)。

注入17週目では、HE標本で、線維芽細胞の浸潤は、ゲルの最外層にのみ認められ、細胞成長因子の検討では、いずれも発色せず陰性であった。

図2 加温後のコラーゲン・ゲルの走査電顕像(×1000)

- a) 3%未架橋型アテロコラーゲン
b) 6.5%未架橋型アテロコラーゲン

図3 加温後のコラーゲン・ゲルの走査電顕像 (×1000)
6.5%架橋型アテロコラーゲン

図4 6.5%未架橋型アテロコラーゲン注入9週後

HE : HE 染色標本 (×66)

ゲルの周囲に膠原線維からなる境界をもち、内部の亀裂に線維芽細胞に浸潤がみられる。

FGF : FGF の免疫組織染色像 (×132)

コラーゲン・ゲル内の線維芽細胞の胞体が、抗 FGF 抗体に反応して、褐色に発色している。

TGF- β : TGF- β の免疫組織染色像 (×132)

コラーゲン・ゲル内の線維芽細胞の胞体が、抗 TGF- β 抗体に反応して、褐色に発色している。

PDGF : PDGF の免疫組織染色像 (×132)

コラーゲン・ゲル内の線維芽細胞の胞体が、抗 PDGF 抗体に反応して、褐色に発色している。

図5 6.5%未架橋型アテロコラーゲン注入9週後のコラーゲン・ゲルの透過電顕像（ウラン・鉛二重染色）

a) ゲルの内部には細長い細胞質をもつ線維芽細胞が散在している。

G: ゲル, F: 線維芽細胞 (×2000)

b) a) の強拡大像

線維芽細胞の細胞質内には、細胞小器官があり、周囲のゲル内にはホストの膠原線維が認められた。

G: ゲル, N: 線維芽細胞の核, M: ミトコンドリア, rER: 粗面小胞体, Co: ホストの膠原線維 (×10000)

図6 6.5%架橋型アテロコラーゲン注入9週後

HE : HE 染色標本 (×66)

ゲルを構成する、粗な膠原線維の間隙に線維芽細胞の浸潤がみられるが、周囲に膠原線維からなる境界は認められない。

FGF : FGF の免疫組織染色像 (×132)

コラーゲン・ゲル内の線維芽細胞の胞体は、抗 FGF 抗体に反応せず、発色しない。

TGF-β : TGF-β の免疫組織染色像 (×132)

コラーゲン・ゲル内の線維芽細胞の胞体が、抗 TGF-β 抗体に軽度、反応して、薄い褐色に発色している。

PDGF : PDGF の免疫組織染色像 (×132)

コラーゲン・ゲル内の線維芽細胞の胞体が、抗 PDGF 抗体に反応せず、発色しない。

考 察

声帯内注入術の歴史は、注入材料の歴史であったと言っても過言ではない。つまり、1911年、Brüningsがパラフィンを注入して¹⁾以来、多くの注入材料の報告がある¹⁰⁻²¹⁾(表3)。しかし、Arnoldが注入材料としての条件としている¹⁵⁾、組織反応が少なく、注入後も組織内に安定しているなおかつ注入しやすい物質は、未だ開発されていない。欧米で長く使用されてきたテフロンは肉芽腫を形成するといわれ^{15, 22)}、本邦で使用されてきたシリコンは形成外科領域での注入術後の膠原病の誘発²³⁾や、発癌性^{24, 25)}が報告されて以来、声帯内注入術には、注入用コラーゲンが使われることが多くなってきた。しかし、コラーゲンにも問題がないわけでもない。

第一には、仔牛真皮より抽出されたコラーゲンを原料とするため、異種タンパクとしての抗原性がある。製品化の段階で、図7に示したコラーゲン分子から、主な抗原性を有するといわれているテロペプチドを除去し、可溶化させてはあるが、生体に対する免疫活性に關しての臨床上の不安は皆無ではない。1991年、われわれは、マクロファージの遊走阻止試験を行ない、注入用コラーゲンの抗原性を確

表3 声帯内注入物質の変遷

	報告者	注入材料
1911	Brünings	パラフィン
1952	Libersa	プラスチック
1954	Rèthi	ワセリン
1955	Arnold	粉細軟骨
1960	Goff	bone paste
1961	Arnold	タンタルム
1962	Arnold	テフロン
1965	Rubin	シリコン
1966	Harris	RTV-Silastic
1984	Ford	コラーゲン
	岩村	DMPS
1992	Brandenburg	脂肪

認している²⁶⁾、皮膚科領域の使用では、注入前の皮内テスト陰性例でも、注入後、局所に軽度のアレルギー反応をおこしたという報告もある²⁷⁾。このように、抗原性を有するにもかかわらず、現在のところ重篤な全身性の反応をおこした報告が無い理由は、抗原量としてのコラーゲン量が十分でないため、つまり低域トランスが誘導された状態であった可能性もある²⁸⁾。

第二は、注入後の組織内での変化である。1977年 Knapp らによって、注入後の組織学的変化および質量の変化⁽²⁹⁾や、形成外科領域における臨床応用について⁽³⁰⁾詳細に報告されているが、注入術に関する組織反応はこれまでは主に、異物反応を中心としておこなわれてきた。たとえば、細胞浸潤や異物巨細胞の出現などである。しかし、現代に必要とされる注入材料は、細胞浸潤や異物反応が軽微で、なおかつ組織の治癒を阻害しない物質であるべきではないかと考えられる。言い換えれば、異物反応が少ないだけでは、必要条件ではあっても十分ではないということである。そこで、われわれは、創傷治癒という観点から、免疫組織化学的手技を用いて、異物注入における創傷治癒過程を観察し、通常の治癒過程との比較をおこなった。

一般に、創傷治癒過程は、炎症期、肉芽形成期、細胞外基質形成期および再構築期に分けられるが³¹⁾、それぞれの時期は互いに重なり合って移行してゆく(図8)。そして、それぞれの時期に主に作用する細胞成長因子があるといわれている³²⁾。つまり、肉芽形成期には、血管新生を促進する FGF や線維芽細胞の増殖促進、走化作用を促す PDGF が、細胞外基質形成期には、TGF- β が作用しコラーゲン合成が促進し、その後、PDGF によるコラーゲン分解と拮抗しながら、創傷構築が完成されるといわれている。

今回、われわれが行なった実験の結果では、未架橋型アテロコラーゲン注入9週目において、創傷治癒過程の初期に多く分泌される細胞成長因子である FGF をはじめ、TGF- β や PDGF などコラーゲン・ゲル内の線維芽細胞に確認され、創傷治癒過程がなお進行中であることが推察された。さらに、細胞成長因子が陽性を示した線維芽細胞の電子顕微鏡における観察では、ミトコンドリアや粗面小

I 型コラーゲンの構造 (畑 隆一郎, 1986)

図7 タイプIコラーゲン分子

(Clark R.A.F. et. al. 1985)

図8 創傷治療の時間的経過

胞体などの細胞小器官が認められ、細胞活動が確認された。しかし、観察したコラーゲン・ゲル内には、ホスト由来と思われる膠原線維も認められたが、これらが、線維芽細胞によって新たに合成されたと推察するには、その数が少なく、注入したコラーゲン・ゲル内に従来からのホストの膠原線維が混在していたと考えるほうが妥当であると考えられた。

一方、架橋型では、コラーゲン・ゲルの走査電顕像でみられたように、コラーゲン線維が粗な網目状構造をしているために、注入後、線維芽細胞の浸潤は早い、ゲル内からの消失も早いと思われた。また、すでに注入9週目には、細胞成長因子活性はほとんど認められず、創傷治癒過程がすでに終了していたことが推察された。

これら細胞成長因子をパラメーターとして創傷治癒過程を免疫組織化学的に検討した結果をまとめると、通常では、4週目ごろには治癒過程が終了し、細胞成長因子の活性は認められないはずであるが、未架橋型アテロコラーゲンの注入後には、ホストの創傷治癒過程が遅延化し、ホストの組織反応の影響を受けやすいために、吸収などがおこりやすいのではないかと推察された。また、架橋型アテロコラーゲンの注入後は、ホストの創傷治癒が正常に進行し、今回観察した注入後9週目には、ホストの反応は終了しており、なお注入したコラーゲン・ゲルが残存していた。

以上のことから、架橋型アテロコラーゲンは、従来の未架橋型アテロコラーゲンに比較して、創傷治癒の点で、注入材料としての条件を、より満足させる物質であることが示唆された。

また、これらのコラーゲンに対する組織反応は、反回神経切断による麻痺の有無によって差異は認められず、筋収縮による影響は受けにくいことも推察された。

結 語

成犬を用いて、声帯内に、未架橋型および架橋型6.5%アテロコラーゲンを注入し、細胞成長因子をパラメーターとして、ホストの異物に対する創傷治癒過程への影響を検討した。

1. 注入9週後には、未架橋型および架橋型アテロコラーゲンはコラーゲン・ゲルとして残存していたが、注入17週目では、未架橋型は吸収され、架橋型のみ残存が確認できた。

2. 未架橋型では、注入9週目でも、コラーゲン・ゲル内の線維芽細胞に細胞成長因子活性が認められ、創傷治癒過程が遅延していることが推察された。

3. 架橋型では、注入9週目ですでに、コラーゲン・ゲル内の線維芽細胞に細胞成長因子活性が認められず、創傷治癒過程がすでに終了していたことが推察された。しかも、注入17週目にも組織内にコラーゲン・ゲルが残存していたことから、架橋型アテロコラーゲンは、ホストの創傷治癒過程に影響せずに組織内に残存する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Brünings W: Über eine neue Behandlungsmethode der Rekurrenslähmung. Verhandl Ver Deutsch Laryngol 18: 93~98, 1911.
- 2) 斉藤成司ほか: 喉頭内視鏡下の microsurgery. 日気食会報 17: 253~266, 1966.
- 3) 佐藤武男ほか: 耳鼻咽喉科領域における甲状腺癌の実態と治療. 耳鼻臨床 64: 514~522, 1971.
- 4) Hurst WB: Percutaneous injection of a vocal cord with teflon. J Laryngol Otol 86: 633~635, 1972.
- 5) 高山悦代: Flexible Fiberscope による声帯内 Silicone 注入の試み. 日気食会報 39: 40~44, 1988.
- 6) Ford CN et al: Injectable collagen in laryngeal rehabilitation. Laryngoscope 94: 313~518, 1984.
- 7) 岡本和憲: 声門閉鎖不全に対するアテロコラーゲン声帯内注入療法に関する基礎的研究. 日耳鼻 90: 394~403, 1987.
- 8) Ford CN et al: Histologic studies on the fate of soluble collagen injected into canine vocal folds. Laryngoscope 96: 1248~1257, 1986.
- 9) Matsuzaki K et al: Monoclonal antibodies against heparin-binding growth factor II/basic fibroblast growth factor that block its biological activity. Invalidity of the antibodies for tumor angiogenesis. Proc Nat Acad Sci USA 86: 9911~9915, 1989.
- 10) Libersa C: Traitement chirurgical de la paralysie laryngée en abduction. J Fr Otorhinolaryngol 1: 480~487, 1952.
- 11) Réthi A: Stimmbandfüllung in Fällen von Nichtnarbenbedingten Glottisspalten. Monatsschr Ohrenh 88: 295~300, 1954.
- 12) Arnold GE: Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia. I, Cartilage injection into a paralyzed vocal cord. Arch Otolaryngol 62: 1~17, 1955.
- 13) Goff WF: Laryngeal adductor paralysis treated by vocal cord injection of bone paste. A preliminary investigation. Trans Pacif Coast Otolaryngol Soc 41: 71~87, 1960.
- 14) Arnold GE: Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia. VI, Further studies of intracordal injection materials. Arch Otolaryngol 73: 290~294, 1961.
- 15) Arnold GE: Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia. IX, Technique of intracordal injection. Arch Otolaryngol 76: 82~92, 1962.
- 16) Rubin HJ: Pitfalls in treatment of dysphonias

- by intracordal injection of synthetics. Laryngoscope 75 : 1381~1397, 1965.
- 17) Harris HH : Clinical investigation of the use of RTV-Silastic S-5329 for paralytic dysphonia and its histological comparison to teflon in animals. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol 70 : 48~54, 1966.
- 18) 鈴木安恒ほか：声帯麻痺および声帯萎縮に対する Silastic の応用. 日気食会報 19 : 151~148, 1968.
- 19) 岩村 忍ほか：片側反回神経麻痺に対するシリコン注入治療. 基礎と臨床. 日気食会報 35 : 17~27, 1984.
- 20) Ford CN et al : Injectable collagen in laryngeal rehabilitation. Laryngoscope 94 : 513~518, 1984.
- 21) Brandenburg JH et al : Vocal cord augmentation with autogenous fat. Laryngoscope 102 : 495~500, 1992.
- 22) Dedo HH et al : Histologic evaluation of Teflon granulomas of human vocal cords. Acta Otolaryngol 93 : 475~484, 1982.
- 23) Sheryl AN et al : Post-mammoplasty connective tissue disease. Arthritis Rheum 25 : 694~697, 1982.
- 24) Snyderman RK et al : Statistical study of malignancies found before, during, or after routine breast plastic operations. Plast Reconstr Surg 25 : 253~256, 1960.
- 25) Berkel H et al : Breast augmentation: A risk factor for breast cancer?. New Eng J Med 326 : 1649~1653, 1992.
- 26) 田村悦代ほか：注入用コラーゲンの抗原性に関する検討. 耳鼻 37 : 1408~1413, 1991.
- 27) Charriere G et al : Reactions to bovine collagen implant. Clinical and immunologic study in 705 patients. J Am Acad Dermatol 21 : 1203~1208, 1989.
- 28) 矢野純一：免疫Ⅱ. アレルギーの機序, 319~331, 岩波書店, 東京, 1975.
- 29) Knapp TR et al : Injectable collagen for soft tissue augmentation. Plast Reconstr Surg 60 : 398~405, 1977.
- 30) Knapp TR et al : Behavior of solubilized collagen as a bioimplant. J Surg Res 23 : 96~105, 1977.
- 31) Clark RA : Cutaneous tissue repair. Basic biologic considerations. I. 13 : 701~725, 1985.
- 32) 藤田寛子ほか：創傷治癒と成長因子. 細胞工学 9 : 896~900, 1990.
-
- 別刷請求先 〒359 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